

(11) Número de Publicação: **PT 1181319 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/28 (2007.10) **C12N 5/20** (2007.10)
C12N 15/13 (2007.10) **C12N 15/63** (2007.10)
A61K 39/395 (2007.10) **A61P 37/00** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2000.05.25**

(30) Prioridade(s): **1999.05.28 US 322875**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.02.27**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.04.22**
134/2009

(73) Titular(es):

GENENTECH, INC.

1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA
94080-4990

US

(72) Inventor(es):

AVI J. ASHKENAZI
ANAN CHUNTHARAPAI
KELLY H. DODGE
KYUNG JIN KIM

US

US

US

US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS QUIMÉRICOS CONTRA DR4 E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"Anticorpos quiméricos contra DR4 e suas utilizações"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se genericamente a anticorpos contra DR4 tal como definido nas reivindicações.

ANTECEDENTES DO INVENTO

Crê-se que o controlo do número de células em mamíferos seja determinado, em parte, por um equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular. Uma forma de morte celular, por vezes referida como morte celular necrótica, é tipicamente caracterizada como uma forma patológica de morte celular resultante de algum traumatismo ou dano celular. Em contraste, existe outra forma "fisiológica" de morte celular que habitualmente prossegue de modo ordenado ou controlado. Esta forma ordenada ou controlada de morte celular é frequentemente referida como "apoptose" (ver, p. ex., Barr *et al.*, *Bio/Technology* 12:487-493, 1994; Steller *et al.*, *Science* 267: 1445-1449, 1995). A morte celular apoptótica ocorre naturalmente em muitos processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário e a selecção clonal no sistema imunitário (Itoh *et al.*, *Cell* 66: 233-243, 1991). Níveis diminuídos de morte celular apoptótica foram associados a uma variedade de condições patológicas, incluindo cancro, lúpus e infecção por herpesvírus (Thompson, *Science* 267: 1456-1462, 1995). Níveis aumentados de morte celular apoptótica podem estar associados a uma variedade de outras condições patológicas, incluindo SIDA, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, retinite pigmentosa, degeneração cerebelar, anemia aplástica, enfarte do miocárdio, trombose, lesão de reperfusão e doença do fígado induzida por toxinas (ver, Thompson, *supra*).

A morte celular apoptótica é tipicamente acompanhada de uma ou mais alterações morfológicas e bioquímicas características nas células, tais como condensação do citoplasma, perda de microvilosidades da membrana plasmática, segmentação do núcleo, degradação do ADN cromossómico ou perda

da função mitocondrial. Crê-se que uma variedade de sinais extrínsecos e intrínsecos desencadeie ou induza tais alterações morfológicas e bioquímicas celulares (Raff, *Nature* 356: 397-400, 1992; Steller, *supra*; Sachs *et al.*, *Blood* 82: 15, 1993). Por exemplo, estes podem ser desencadeados por estímulos hormonais, tais como hormonas glucocorticóides para timócitos imaturos, bem como a retirada de certos factores de crescimento (Watanabe-Fukunaga *et al.*, *Nature* 356: 314-317, 1992). Também, foi relatado que alguns oncogenes identificados tais como *myc*, *rel* e *E1A*, e supressores tumorais, tais como *p53*, têm um papel na indução de apoptose. Igualmente, tem sido observado que certos fármacos quimioterapêuticos e algumas formas de radiação têm actividade indutora de apoptose (Thompson, *supra*).

Várias moléculas, tais como o factor de necrose tumoral- α ("TNF- α "), factor de necrose tumoral- β ("TNF- β " ou "linfotóxina- α "), linfotóxina- β ("LT- β "), ligando de CD30, ligando de CD27, ligando de CD40, ligando de OX-40, ligando de 4-1BB, ligando de Apo-1 (também referido como ligando de Fas ou ligando de CD95), ligando de Apo-2 (também referido como TRAIL) foram identificadas como membros da família de citocinas do factor de necrose tumoral ("TNF") (ver, p. ex., Gruss e Dover, *Blood* 85: 3378-3404, 1995; WO 97/25428 publicado a 17 de Julho de 1997; WO 97/01633 publicado a 16 de Janeiro de 1997; Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 12687-12690, 1996; Wiley *et al.*, *Immunity* 3: 673-682, 1995; Browning *et al.*, *Cell* 72: 847-856, 1993; Armitage *et al.* *Nature* 357: 80-82, 1992). Entre estas moléculas, foi relatado que TNF- α , TNF- β , ligando de CD30, ligando de 4-1BB, ligando de Apo-1 e ligando de Apo-2 (TRAIL) estão envolvidas em morte celular apoptótica. Foi relatado que tanto TNF- α como TNF- β induzem morte celular apoptótica em células tumorais susceptíveis (Schmid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1881, 1986; Dealtry *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17: 689, 1987). Zheng *et al.* relataram que TNF- α está envolvido na apoptose pós-estimulação de células T positivas para CD8 (Zheng *et al.*, *Nature* 377: 348-351, 1995). Outros investigadores relataram que o ligando de CD30 pode estar envolvido na deleção de células T autorreactivas no timo (Amakawa *et al.*, "Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death", Res. N.º 10, 1995).

Mutações nos genes do receptor Fas/Apo-1 ou do ligando de ratinho (designados *lpr* e *gld*, respectivamente) foram associadas a alguns distúrbios auto-imunes, indicando que o ligando de Apo-1 pode ter um papel na regulação da deleção clonal de linfócitos autorreactivos na periferia (Krammer et al., *Curr. Op. Immunol.* 6: 279-289, 1994; Nagata et al., *Science* 267: 1449-1456, 1995). Foi também relatado que o ligando de Apo-1 induz apoptose pós-estimulação em linfócitos T positivos para CD4 e em linfócitos B e pode estar envolvido na eliminação de linfócitos activados quando a sua função já não é necessária (Krammer et al., *supra*; Nagata et al., *supra*). Foi relatado que anticorpos monoclonais de ratinho agonistas que se ligam especificamente ao receptor Apo-1 exibem uma actividade de morte celular que é comparável ou semelhante à de TNF- α (Yonehara et al., *J. Exp. Med.* 169: 1747-1756, 1989).

Crê-se que a indução de várias respostas celulares mediadas pela tal família de citocinas TNF seja iniciada através da sua ligação a receptores celulares específicos. Foram identificados dois receptores de TNF distintos de aproximadamente 55 kDa (TNFR1) e 75 kDa (TNFR2) (Hohman et al., *J. Biol. Chem.* 264: 14927-14934, 1989; Brockhaus et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3127-3131, 1990; EP 417563, publicada a 20 de Março de 1991) e os ADNc humano e de ratinho correspondentes a ambos os tipos de receptor foram isolados e caracterizados (Loetscher et al., *Cell* 61: 351, 1990; Schall et al., *Cell* 61: 361, 1990; Smith et al., *Science* 248: 1019-1023, 1990; Lewis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2830-2834, 1991; Goodwin et al., *Mol. Cell. Biol.* 11: 3020-3026, 1991). Polimorfismos extensos foram associados a ambos os genes de receptores de TNF (ver, p. ex., Takao et al., *Immunogenetics* 37: 199-203, 1993). Ambos os TNFR partilham a estrutura típica de receptores da superfície celular incluindo regiões extracelulares, transmembranares e intracelulares. As porções extracelulares de ambos os receptores verificam-se também naturalmente como proteínas solúveis de ligação a TNF (Nophar, Y. et al., *EMBO J.* 9: 3269, 1990; e Kohno, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8331, 1990). Mais recentemente, a clonagem de receptores solúveis de TNF recombinantes foi

relatada por Hale *et al.* (*J. Cell. Biochem.* Suplemento 15F, 1991, pág. 113 (P424)).

A porção extracelular dos TNFR de tipo 1 e tipo 2 (TNFR1 e TNFR2) contém um padrão repetitivo na sequência de aminoácidos de quatro domínios ricos em cisteína (CRD) designados 1 a 4, a começar no terminal NH₂. Cada CRD tem cerca de 40 aminoácidos de comprimento e contém 4 a 6 resíduos de cisteína em posições que são bem conservadas (Schall *et al.*, *supra*; Loetscher *et al.*, *supra*; Smith *et al.*, *supra*; Nophar *et al.*, *supra*; Kohno *et al.*, *supra*). Em TNFR1, os limites aproximados das quatro CRD são como se segue: CRD1 - aminoácidos 14 a cerca de 53; CRD2 - aminoácidos de cerca de 54 a cerca de 97; CRD3 - aminoácidos de cerca de 98 a cerca de 138; CRD4 - aminoácidos de cerca de 139 a cerca de 167. Em TNFR2, CRD1 inclui os aminoácidos 17 a cerca de 55; CRD2 - aminoácidos de cerca de 55 a cerca de 97; CRD3 - aminoácidos de cerca de 98 a cerca de 140 e CRD4 - aminoácidos de cerca de 141 a cerca de 179 (Banner *et al.*, *Cell* 73: 431-435, 1993). O potencial papel das CRD na ligação do ligando é também descrito por Banner *et al.*, *supra*.

Um padrão repetitivo semelhante de CRD existe também em várias outras proteínas da superfície celular, incluindo o factor de crescimento dos nervos p75 (NGFR) (Johnson *et al.*, *Cell* 47: 545, 1986; Radeke *et al.*, *Nature* 325: 593, 1987), o antigénio de células B CD40 (Stamenkovic *et al.*, *EMBO J.* 8: 1403, 1989), o antigénio de células T OX40 (Mallet *et al.*, *EMBO J.* 9: 1063, 1990) e o antigénio Fas (Yonehara *et al.*, *supra* e Itoh *et al.*, *Cell* 66: 233-243, 1991). As CRD verificam-se também nas proteínas T2 semelhantes a TNFR solúvel (sTNFR) dos poxvírus Shope e mixoma (Upton *et al.*, *Virology* 160: 20-29, 1987; Smith *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 335, 1991; Upton *et al.*, *Virology* 184: 370, 1991). O alinhamento óptimo destas sequências indica que as posições dos resíduos de cisteína estão bem conservadas. Estes receptores são por vezes colectivamente referidos como membros da superfamília de receptores TNF/NGF. Estudos recentes sobre p75NGFR mostraram que a deleção de CRD1 (Welcher, A.A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 159-163, 1991) ou uma inserção de 5 aminoácidos neste domínio (Yan, H. e Chao, M.V., *J. Biol. Chem.* 266: 12099-12104, 1991) tinha pouco ou nenhum efeito na

ligação de NGF (Yan, H. e Chao, M.V., *supra*). O NGFR p75 contém um trecho rico em prolina de cerca de 60 aminoácidos, entre as suas regiões CRD4 e transmembranar, que não está envolvido na ligação de NGF (Peetre, C. *et al.*, *Eur. J. Hematol.* 41: 414-419, 1988; Seckinger, P. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264: 11966-11973, 1989; Yan, H. e Chao, M.V., *supra*). Uma região semelhante rica em prolina verifica-se em TNFR2 mas não em TNFR1.

Itoh *et al.* divulgam que o receptor Apo-1 pode sinalizar uma morte celular apoptótica semelhante à sinalizada pelo TNFR1 de 55 kDa (Itoh *et al.*, *supra*). Foi também relatado que a expressão do antigénio Apo-1 é infra-regulada juntamente com a de TNFR1 quando as células são tratadas com TNF- α ou anticorpo monoclonal de ratinho anti-Apo-1 (Krammer *et al.*, *supra*; Nagata *et al.*, *supra*). Assim, alguns investigadores colocaram a hipótese de que linhas celulares que co-expressam ambos os receptores Apo-1 e TNFR1 podem mediar a morte celular através de vias de sinalização comuns (Id.).

A família de ligandos TNF identificados até à data, com a excepção da linfoxina- α , são tipicamente proteínas transmembranares de tipo II, cujo terminal C é extracelular. Em contraste, a maioria dos receptores na família de receptores TNF (TNFR) identificados até à data é tipicamente de proteínas transmembranares de tipo I. No entanto, tanto na família de ligandos como de receptores de TNF a homologia identificada entre os membros da família verificou-se principalmente no domínio extracelular ("ECD"). Várias das citocinas da família TNF, incluindo TNF- α , ligando de Apo-1 e ligando de CD40 são clivadas proteoliticamente na superfície celular; a proteína resultante em cada caso forma tipicamente uma molécula homotrimérica que funciona como uma citocina solúvel. As proteínas da família de receptores TNF são também habitualmente clivadas proteoliticamente para libertar ECD de receptores solúveis que podem funcionar como inibidores das citocinas cognatas.

Recentemente, foram identificados outros membros da família TNFR. Tais membros recentemente identificados da família TNFR incluem CAR1, HVEM e osteoprotegerina (OPG) (Brojatsch *et al.*, *Cell* 87: 845-855, 1996; Montgomery *et al.*,

Cell 87: 427-436, 1996; Marsters *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272: 14029-14032, 1997; Simonet *et al.*, *Cell* 89: 309-319, 1997). Ao contrário de outras moléculas conhecidas semelhantes a TNFR, Simonet *et al.*, *supra*, relatam que OPG não contém uma sequência transmembranar hidrófoba.

Em Marsters *et al.*, *Curr. Biol.* 6: 750, 1996, os investigadores descrevem um polipéptido humano de sequência nativa inteira, designado Apo-3, que exhibe semelhança com a família TNFR nas suas repetições extracelulares ricas em cisteína e se assemelha a TNFR1 e CD95 por conter uma sequência de domínio de morte citoplasmático (ver também Marsters *et al.*, *Curr. Biol.* 6: 1669, 1996). Apo-3 foi também referido por outros investigadores como DR3, wsl-1 e TRAMP (Chinnaiyan *et al.*, *Science* 274: 990, 1996; Kitson *et al.*, *Nature* 384: 372, 1996; Bodmer *et al.*, *Immunity* 6: 79, 1997).

Pan *et al.* divulgaram outro membro da família de receptores de TNF referido como "DR4" (Pan *et al.*, *Science* 276: 111-113, 1997). O ADNc de DR4 codifica um enquadramento de leitura aberto de 468 aminoácidos com características típicas de um receptor da superfície celular. Pan *et al.* descrevem um putativo péptido sinal presente no início da molécula (aminoácidos -23 a -1), com a proteína madura que se prevê comece no aminoácido 24 (Ala). Os resíduos 108 a 206 contêm duas pseudo-repetições ricas em cisteína que se assemelham às regiões correspondentes em TNFR-1 (quatro repetições), DR3 (quatro repetições), Fas (três repetições) e CAR1 (duas repetições). A seguir ao domínio transmembranar está uma região intracelular contendo um trecho de 70 aminoácidos com semelhança com os domínios de morte de TNFR1, DR3, Fas e CAR1. O transcrito de DR4 foi detectado em baço, leucócitos do sangue periférico, intestino delgado e timo. Adicionalmente, a expressão de DR4 foi também verificada em células K562 de eritroleucemia, células de carcinoma da mama MCF7 e células T activadas. Pan *et al.* divulgam ainda que se crê que DR4 seja um receptor para o ligando conhecido como ligando de Apo-2 ou TRAIL.

Em Sheridan *et al.*, *Science* 277: 818-821, 1997 e Pan *et al.*, *Science* 277: 815-818, 1997, é descrita outra molécula que se crê ser um receptor para o ligando de Apo-2 (TRAIL). Essa

molécula é referida como Apo-2 (foi também alternativamente referida como DR5) (ver também, WO98/51793 publicado a 19 de Novembro de 1998; WO98/41629 publicado a 24 de Setembro de 1998). Essa molécula foi ainda referida como TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 ou KILLER (Screaton *et al.*, *Curr. Biol.* 7: 693-696, 1997; Walczak *et al.*, *EMBO J.* 16: 5386-5387, 1997; Wu *et al.*, *Nature Genetics* 17: 141-143, 1997; WO98/35986 publicado a 20 de Agosto de 1998; EP 870827 publicado a 14 de Outubro de 1998; WO98/46643 publicado a 22 de Outubro de 1998; WO99/02653 publicado a 21 de Janeiro de 1999; WO99/09165 publicado a 25 de Fevereiro de 1999; WO99/11791 publicado a 11 de Março de 1999). Tal como DR4, está relatado que DR5 contém um domínio de morte citoplasmático e é capaz de sinalizar apoptose. A estrutura cristalina do complexo formado entre Apo-2L/TRAIL e DR5 é descrita em Hymowitz *et al.*, *Molecular Cell* 4: 563-571, 1999.

Em Sheridan *et al.*, *supra*, é divulgado um receptor designado DcR1 (ou alternativamente, Apo-2DcR) como sendo um potencial receptor de engodo para o ligando de Apo-2 (TRAIL). Sheridan *et al.* relatam que DcR1 pode inibir a função do ligando de Apo-2 *in vitro*. Ver também, Pan *et al.*, *supra*, para divulgação sobre o mesmo receptor de engodo, referido como TRID. DCR1 foi também referido como LIT ou TRAIL-R3 (McFarlane *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272: 25417-25420, 1997; Schneider *et al.*, *FEBS Letters* 416: 329-334, 1997; Degli-Esposti *et al.*, *J. Exp. Med.* 186: 1165-1170, 1997; e Mongkolsapaya *et al.*, *J. Immunol.* 160: 3-6, 1998).

Em Marsters *et al.*, *Curr. Biol.* 7: 1003-1006, 1997) é divulgado um receptor referido como DcR2. Marsters *et al.* relatam que DcR2 contém uma região citoplasmática com um domínio de morte truncado e pode funcionar como um receptor de Apo-2L inibidor *in vitro*. DCR2 é também designado TRUND2 ou TRAIL-R4 (Pan *et al.*, *FEBS Letters* 424: 41-45, 1998; Degli-Esposti *et al.*, *Immunity* 7: 813-820, 1997).

Para uma revisão da família de citocinas TNF e seus receptores, ver Gruss e Dower, *supra*.

Tal como actualmente se entende, o programa de morte celular contém pelo menos três elementos importantes -

activadores, inibidores e efectores; em *C. elegans*, estes elementos são codificados respectivamente por três genes, *Ced-4*, *Ced-9* e *Ced-3* (Steller, *Science* 267: 1445, 1995; Chinnaiyan et al., *Science* 275: 1122-1126, 1997). Dois dos membros da família TNFR, TNFR1 e Fas/Apo1 (CD95), podem activar a morte celular apoptótica (Chinnaiyan e Dixit, *Current Biology* 6: 555-562, 1996; Fraser e Evan, *Cell* 85: 781-784, 1996). Sabe-se também que TNFR1 medeia a activação do factor de transcrição NF- κ B (Tartaglia et al., *Cell* 74: 845-853, 1993; Hsu et al., *Cell* 84: 299-308, 1996). Para além de alguma homologia do ECD, estes dois receptores partilham homologia no seu domínio intracelular (ICD) numa interface de oligomerização conhecida como o domínio de morte (Tartaglia et al., *supra*; Nagata, *Cell* 88: 355, 1997). Os domínios de morte são também verificados em várias proteínas de metazoários que regulam a apoptose, nomeadamente a proteína de *Drosophila*, Reaper, e as proteínas de mamífero referidas como FADD/MORT1, TRADD e RIP (Cleaveland e Ihle, *Cell* 81: 479-482, 1995). Após ligação do ligando e agrupamento dos receptores, crê-se que TNFR1 e CD95 recrutem FADD para um complexo de sinalização da indução de morte. Supostamente CD95 liga-se a FADD directamente, enquanto TNFR1 se liga a FADD indirectamente através de TRADD (Chinnaiyan et al., *Cell* 81: 505-512, 1995; Boldin et al., *J. Biol. Chem.* 270: 387-391, 1995; Hsu et al., *supra*; Chinnaiyan et al., *J. Biol. Chem.* 271: 4961-4965, 1996). Foi relatado que FADD serve como uma proteína adaptadora que recruta a protease relacionada com *Ced-3*, MACH α /FLICE (caspase 8), para o complexo de sinalização de morte (Boldin et al., *Cell* 85: 803-815, 1996; Muzio et al., *Cell* 85: 817-827, 1996). MACH α /FLICE parece ser o gatilho que inicia uma cascata de proteases apoptóticas, incluindo a enzima conversora da interleucina-1 β (ICE) e CPP32/Yama, que pode executar alguns aspectos críticos do programa de morte celular (Fraser e Evan, *supra*).

Foi recentemente divulgado que a morte celular programada envolve a actividade de membros de uma família de cisteína-proteases relacionados com o gene de morte celular de *C. elegans*, *ced-3*, e com a enzima conversora de IL-1 de mamífero, ICE. A actividade das proteases ICE e CPP32/Yama pode ser inibida através do produto do gene do vírus da varíola bovina, *crmA* (Ray et al., *Cell* 69: 597-604, 1992;

Tewari et al., *Cell* 81: 801-809, 1995). Estudos recentes mostram que CrmA pode inibir morte celular induzida por TNFR1 e CD95 (Enari et al., *Nature* 375: 78-81, 1995; Tewari et al., *J. Biol. Chem.* 270: 3255-3260, 1995).

Tal como revisto recentemente por Tewari et al., TNFR1, TNFR2 e CD40 modulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias e co-estimuladoras, receptores de citocinas e moléculas de adesão celular através da activação do factor de transcrição NF- κ B (Tewari et al., *Curr. Op. Genet. Develop.* 6: 39-44, 1996). NF- κ B é o protótipo de uma família de factores de transcrição diméricos cujas subunidades contêm regiões Rel conservadas (Verma et al., *Genes Develop.* 9: 2723-2735, 1996; Baldwin, *Ann. Rev. Immunol.* 14: 649-681, 1996). Na sua forma latente, NF- κ B é complexado com membros da família de inibidores I κ B; após inactivação do I κ B em resposta a certos estímulos, o NF- κ B libertado entra no núcleo onde se liga a seqüências de ADN específicas e activa a transcrição de genes.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona anticorpos contra DR4 que são capazes de se ligar especificamente a DR4. Os anticorpos contra DR4 preferidos são capazes de modular actividades biológicas associadas a DR4 e/ou ligando de Apo-2 (TRAIL), em particular, apoptose, e são assim úteis no tratamento de várias doenças e condições patológicas, incluindo cancro ou doenças imunitárias relacionadas.

Assim, num aspecto, o presente invento proporciona um anticorpo quimérico anti-DR4 isolado que compreende:

- (a) um domínio variável da cadeia leve, em que o referido domínio variável compreende os resíduos de aminoácido 20 a 126 de SEQ ID NO:9;
- (b) o domínio CH1 da cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácido 127 a 233 de SEQ ID NO:9;
- (c) um domínio variável da cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 145 ou 22 a 145 de SEQ ID NO:12; e
- (d) os domínios CH1, CH2 e CH3 da cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 146 a 476 de SEQ ID NO:12.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona ácido nucleico isolado codificando o anticorpo quimérico anti-DR4 tal como definido acima, vectores compreendendo o ácido nucleico e células hospedeiras compreendendo os vectores.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona um método de produção de um anticorpo quimérico anti-DR4 compreendendo a cultura da célula hospedeira acima definida e recuperação do anticorpo a partir da cultura da célula hospedeira.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona a utilização de um anticorpo quimérico anti-DR4 tal como definido acima na preparação de um medicamento para indução de apoptose em células de cancro de mamífero, por exemplo em que as referidas células de mamífero compreendem células de cancro do cólon, células de cancro do pulmão de células pequenas, células de cancro do pulmão de células não pequenas, células de adenocarcinoma do pulmão ou células de carcinoma de células escamosas do pulmão.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:2) de um ADNc para DR4 humano e a sua sequência de aminoácidos derivada (SEQ ID NO:1). As sequências nucleotídica e de aminoácidos respectivas para DR4 humano são também relatadas em Pan *et al.*, *Science* 276: 111, 1997.

A Figura 2 mostra a análise FACS da ligação a DR4 por dois anticorpos anti-DR4, 4E7.24.3 ("4E7") e 4H6.17.8 ("4H6") (ilustrada pelas linhas a cheio) em comparação com controlos de IgG (linhas ponteadas). Ambos os anticorpos reconheceram o receptor DR4 expresso em células humanas 9D.

A Figura 3 é um gráfico mostrando a percentagem (%) de apoptose induzida em células 9D pelos anticorpos contra DR4, 4E7.24.3 e 4H6.17.8.

A Figura 4 é um diagrama de barras mostrando a percentagem (%) de apoptose em comparação com Apo-2L, em células 9D pelos anticorpos contra DR4, 4E7.24.3 e 4H6.17.8,

na presença ou ausência de anticorpos de cabra anti-Fc de IgG de ratinho.

A Figura 5 é um diagrama de barras ilustrando a capacidade do anticorpo contra DR4, 4H6.17.8, para bloquear a apoptose induzida por Apo-2L em células 9D.

A Figura 6 é um gráfico mostrando resultados de um ELISA testando a ligação dos anticorpos contra DR4, 4E7.24.3 e 4H6.17.8, a DR4 e a outros receptores de Apo-2L conhecidos referidos como Apo-2, DcR1 e DcR2.

A Figura 7 mostra as afinidades de ligação dos anticorpos contra DR4, 4E7, 4H6 e 5G11.17.1 ("5G11"), a DR4-IgG, tal como determinado num ensaio KinExATM. As afinidades de ligação, p. ex., de imunoadesinas de DR4 e DR5 a Apo-2L são mostradas para comparação.

A Figura 8A mostra gráficos ilustrando a percentagem (%) de apoptose (tal como determinado através de análise FACS) induzida em células 9D por várias concentrações dos anticorpos contra DR4 1H5.25.9 ("1H5"), 4G7.18.8 ("4G7") e 5G11, na ausência ou presença de anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho ou complemento de coelho.

A Figura 8B mostra gráficos ilustrando a actividade apoptótica (tal como determinado através de análise FACS) dos anticorpos contra DR4, 4G7 e 5G11, em células 9D na presença de anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho ou complemento de coelho.

A Figura 9 mostra a actividade apoptótica dos anticorpos contra DR4, 4H6, 4E7, 4G7, 4G10.20.6 ("4G10"), 3G1.17.2 ("3G1"), 5G11, 1H8.17.5 ("1H8") e 1H5.24.9 ("1H5") em células de tumor pulmonar SKMES-1 na presença de anticorpos de cabra anti-Fc de IgG de ratinho.

A Figura 10A mostra a actividade apoptótica dos anticorpos contra DR4, 4G7 e 5G11 em células de tumor pulmonar SKMES-1 na presença ou ausência de anticorpos de cabra anti-Fc de IgG de ratinho.

A Figura 10B mostra a actividade apoptótica dos anticorpos contra DR4, 4G7 and 5G11, em células de tumor pulmonar SKMES-1 na presença ou ausência de complemento de coelho.

A Figura 11A mostra a actividade apoptótica dos anticorpos contra DR4, 4G7 e 5G11, em células de tumor do cólon HCT116 na presença ou ausência de anticorpos de cabra anti-Fc de IgG de ratinho.

A Figura 11B mostra a actividade apoptótica dos anticorpos contra DR4, 4G7 e 5G11, em células tumorais do cólon HCT116 na presença ou ausência de complemento de coelho.

A Figura 12 mostra os resultados de um ensaio PARP.

A Figura 13 mostra os efeitos dos anticorpos contra DR4, 4G7 e 5G11, no crescimento de tumores do cólon HCT116 em ratinhos nus atímicos, medidos através do volume tumoral.

A Figura 14 mostra os efeitos dos anticorpos contra DR4, 4G7 e 5G11, no crescimento de tumores do cólon HCT116 em ratinhos nus atímicos, medidos através do peso tumoral.

As Figuras 15 e 16 mostram os efeitos dos anticorpos contra DR4, 4G7 e 4H6, no crescimento de tumores do cólon Colo205 em ratinhos nus atímicos, medidos através do volume tumoral.

A Figura 17 proporciona uma tabela identificando os anticorpos contra DR4, 1H5.24.9; 1H8.17.5; 3G1.17.2; 4E7.24.3; 4G7.18.8; 4H6.17.8; 4G10.20.6 e 5G11.17.1, bem como várias propriedades e actividades identificadas com cada respectivo anticorpo.

As Figuras 18A-18C mostram a cadeia leve do anticorpo quimérico anti-DR4 4H6 e incluem a sequência polinucleotídica codificadora (SEQ ID NO:7) e a sua sequência de ADN complementar (SEQ ID NO:8) e a putativa sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:9) que compreende a sequência de sinal (derivada do vector) (identificada como os resíduos de aminoácido 1 a 19 de SEQ ID NO:9); a cadeia leve do domínio

variável (identificada como os resíduos de aminoácido 20 a 126 de SEQ ID NO:9); e o domínio constante CH1 da cadeia capa humana (identificado como os resíduos de aminoácido 127 a 233 de SEQ ID NO:9). São também mostradas as respectivas regiões Estruturais (FR1, FR2, FR3 e FR4) e CDR (CDR1, CDR2, CDR3); as respectivas regiões estão sublinhadas.

As Figuras 18D-18H mostram a cadeia pesada do anticorpo quimérico anti-DR4 4H6 e incluem a sequência polinucleotídica codificadora (SEQ ID NO:10) e a sua sequência de ADN complementar (SEQ ID NO:11) e a putativa sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:12) que compreende a sequência de sinal (derivada do vector) (identificada como os resíduos de aminoácido 1 a 19 de SEQ ID NO:12); o domínio variável da cadeia pesada (identificado como os resíduos de aminoácido 20 a 145 de SEQ ID NO:12); e os domínios constantes CH1, CH2 e CH3 da IgG1 humana (identificados como os resíduos de aminoácido 146 a 476 de SEQ ID NO:12). Mostra-se que o resíduo de aminoácidos na posição 20 (que corresponde ao primeiro aminoácido do domínio variável da cadeia pesada de murídeo do 4H6) é um resíduo de ácido glutâmico. Observa-se que no domínio variável da cadeia pesada de murídeo de 4H6 nativo sequenciado a partir do hibridoma 4H6.17.8, o primeiro aminoácido é um resíduo de glutamina e não ácido glutâmico. São também mostradas as respectivas regiões Estruturais (FR1, FR2, FR3 e FR4) e CDR (CDR1, CDR2, CDR3); as respectivas regiões estão sublinhadas.

A Figura 19 mostra os efeitos (morte celular *in vitro* de células SK-MES-1) do anticorpo quimérico 4H6 ("Ch4H6") (mais anticorpo de cabra anti-Fc de IgG humana), tal como determinado através de coloração de violeta cristal. São também mostrados os efeitos do anticorpo monoclonal 4H6 de murídeo ("4H6"), F(ab)'2 de 4H6 e Apo2L.

A Figura 20 mostra os efeitos ADCC do anticorpo quimérico 4H6 ("c4H6") (mais anticorpo de cabra anti-Fc de IgG humana) em células Colo205, tal como medidos num ensaio de libertação de ⁵¹Cr.

A Figura 21 mostra os efeitos do anticorpo quimérico 4H6 ("ch-4H6") no crescimento de tumores do cólon Colo205 em

ratinhos nus atímicos, tal como medidos através do volume tumoral. São também mostrados os efeitos do anticorpo monoclonal de murídeo ("4H6") e IgG1.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

I. Definições

Tal como aqui se utiliza, o termo "ligando de Apo-2" ou "Apo-2L" (também conhecido como TRAIL) refere-se a um membro específico da família de ligandos do factor de necrose tumoral (TNF) que, entre outras coisas, induz apoptose numa variedade de linhagens celulares (ver WO 97/25428 publicado a 17 de Julho de 1997; WO97/01633 publicado a 16 de Janeiro de 1997; Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 12687, 1996; Marsters *et al.*, *Curr. Biol.* 6: 79, 1997; Wiley, S. *et al.*, *Immunity* 3: 637, 1995).

Um receptor para Apo-2L foi identificado e referido como DR4, um membro da família de receptores de TNF que contém um "domínio de morte" citoplasmático capaz de se envolver no aparelho de suicídio celular (ver Pan *et al.*, *Science* 276: 111, 1997). DR4 foi também descrito em WO98/32856 publicado a 30 de Julho de 1998. O termo "Receptor de Morte 4" ou "DR4" (do inglês "Death Receptor") quando aqui utilizado engloba DR4 de sequência nativa e variantes de DR4 (que são definidas mais adiante). Estes termos englobam DR4 expresso numa variedade de mamíferos, incluindo humanos. O DR4 pode ser expresso endogenamente tal como ocorre naturalmente numa variedade de linhagens de tecidos humanos, ou pode ser expresso através de métodos recombinantes ou sintéticos. Um "DR de sequência nativa" compreende um polipéptido possuindo a mesma sequência de aminoácidos que um DR4 derivado da natureza. Assim, um DR4 de sequência nativa pode ter a sequência de aminoácidos do DR4 de ocorrência natural de qualquer mamífero. Tal DR4 de sequência nativa pode ser isolado da natureza ou pode ser produzido através de meios recombinantes ou sintéticos. O termo "DR4 de sequência nativa" engloba especificamente formas do DR4 truncadas ou segregadas de ocorrência natural (p. ex., uma forma solúvel contendo, por exemplo, uma sequência do domínio extracelular), formas variantes de ocorrência natural (p. ex., formas de processamento alternativo) e variantes

alélicas de ocorrência natural do DR4. Numa concretização do presente invento, o DR4 de sequência nativa é um DR4 de sequência nativa maduro ou inteiro compreendendo os aminoácidos 1 a 468 da Fig. 1 (SEQ ID NO:1).

Os termos “domínio extracelular” ou “ECD” aqui referem-se a uma forma de DR4 que é essencialmente livre dos domínios transmembranar e citoplasmático de DR4. Vulgarmente, o ECD de DR4 terá menos de 1% de tais domínios transmembranar e/ou citoplasmático e, de preferência, terá menos de cerca de 0,5% de tais domínios. Opcionalmente, o ECD de DR4 compreenderá os resíduos de aminoácido 1 a 218 ou os resíduos 24 a 218 da Fig. 1 (SEQ ID NO:1).

“Variante de DR4” significa um DR4 biologicamente activo possuindo pelo menos cerca de 80% ou 85% de identidade da sequência de aminoácidos com o DR4 possuindo a sequência de aminoácidos deduzida mostrada na Fig. 1 (SEQ ID NO:1) para uma sequência nativa inteira ou sequência do domínio extracelular do DR4 humano. Tais variantes de DR4 incluem por exemplo, polipéptidos DR4 em que é adicionado ou suprimido um ou mais resíduos de aminoácido (i.e., fragmentos), no terminal N ou C da sequência da Fig. 1 (SEQ ID NO:1). Vulgarmente, uma variante de DR4 terá pelo menos cerca de 80% de identidade da sequência de aminoácidos, de preferência pelo menos cerca de 90% de identidade da sequência de aminoácidos e ainda de preferência pelo menos cerca de 95% de identidade da sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos da Fig. 1 (SEQ ID NO:1).

A “percentagem (%) de identidade da sequência de aminoácidos” em relação às sequências de DR4 (ou sequências de anticorpos contra DR4) aqui identificada é definida como a percentagem de resíduos de aminoácido numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácido na sequência de DR4 (ou sequência de anticorpo contra DR4), após alinhamento das sequências e introdução de intervalos, se necessário, para alcançar a percentagem máxima de identidade de sequência e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequência. O alinhamento para fins de determinação da percentagem de identidade da sequência de aminoácidos pode ser alcançado de vários modos que estão

dentro dos conhecimentos na especialidade, por exemplo, utilizando suporte lógico de computador publicamente disponível tal como ALIGNTM, Megalign (DNASTAR) ou ALIGN-2 (de autoria de Genentech, Inc. e apresentado em U.S. Copyright Office a 10 de Dezembro de 1991). O suporte lógico ALIGN-2 está disponível ao público em Genentech, Inc. O programa ALIGN-2 deve ser compilado para utilização num sistema operativo UNIX, de preferência UNIX V4.0D digital. Todos os parâmetros da comparação de sequências estão definidos pelo programa ALIGN-2 e não variam. Os peritos na especialidade podem determinar os parâmetros apropriados para a medição do alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para alcançar um alinhamento máximo ao longo de todo o comprimento das sequências a comparar.

"Isolado", quando utilizado para descrever os vários polipéptidos aqui divulgados, significa um polipéptido que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que tipicamente interfeririam com utilizações de diagnóstico ou terapêuticas do polipéptido e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em concretizações preferidas, o polipéptido será purificado (1) até um grau suficiente para se obter pelo menos 15 resíduos da sequência de aminoácidos N-terminal ou interna através da utilização de um sequenciador de copo rotativo ou (2) até à homogeneidade através de SDS-PAGE sob condições não redutoras ou redutoras utilizando azul de Coomassie ou, de preferência, coloração de prata. O polipéptido isolado inclui polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do DR4 ou do anticorpo contra DR4 não estará presente. Vulgarmente, no entanto, o polipéptido isolado será preparado através de pelo menos um passo de purificação.

Uma molécula de ácido nucleico "isolada" é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual está vulgarmente associada na fonte natural do ácido nucleico do polipéptido. Uma molécula de ácido nucleico isolada está numa forma ou disposição diferente da qual se encontra na natureza.

As moléculas de ácido nucleico isoladas são portanto distintas da molécula de ácido nucleico tal como existe em células naturais. No entanto, uma molécula de ácido nucleico isolada inclui uma molécula de ácido nucleico contida em células que vulgarmente expressam o polipéptido onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está numa localização cromossómica diferente da das células naturais.

O "rigor" das reacções de hibridação é facilmente determinável por um perito na especialidade e é geralmente um cálculo empírico dependente do comprimento da sonda, da temperatura de lavagem e da concentração de sais. Em geral, sondas maiores requerem temperaturas mais elevadas para uma ligação apropriada, enquanto sondas mais curtas necessitam de temperaturas inferiores. A hibridação depende geralmente da capacidade do ADN desnaturado para se re-ligar quando estão presentes cadeias complementares num ambiente abaixo da sua temperatura de fusão. Quanto mais elevado o grau de identidade desejado entre a sonda e a sequência hibridável, maior a temperatura relativa que pode ser utilizada. Como resultado, segue-se que temperaturas relativas mais elevadas tenderão a tornar as condições reaccionais mais rigorosas, enquanto temperaturas mais baixas as reduzem. Para detalhes adicionais e explicação do rigor das reacções de hibridação, ver Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley Interscience Publishers, 1995).

As "condições rigorosas" ou "condições de elevado rigor", tal como definidas aqui, podem ser identificadas por aquelas que: (1) empregam baixa força iónica e elevada temperatura para lavagem, por exemplo cloreto de sódio 0,015 M/citrato de sódio 0,0015 M/dodecilsulfato de sódio a 0,1% a 50°C; (2) empregam durante a hibridação um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, formamida a 50% (vol/vol) com albumina de soro bovino a 0,1%/Ficoll a 0,1%/polivinilpirrolidona a 0,1%/tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 6,5 com cloreto de sódio 750 mM, citrato de sódio 75 mM a 42°C; ou (3) empregam formamida a 50%, SSC 5× (NaCl 0,75 M, citrato de sódio 0,075 M), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sódio a 0,1%, solução de Denhardt 5×, ADN de esperma de salmão sujeito a ultra-sons (50 µg/ml), SDS a 0,1%, e sulfato de dextrano a 10% a 42°C, com lavagens a 42°C em SSC

0,2× (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida a 50% a 55°C, seguido de uma lavagem de elevado rigor consistindo em SSC 0,1× contendo EDTA a 55°C.

As “condições moderadamente rigorosas” podem ser identificadas tal como descrito por Sambrook et al., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 e incluem a utilização de solução de lavagem e de condições de hibridação (p. ex., temperatura, força iónica e % de SDS) menos rigorosas que as descritas acima. Um exemplo de condições moderadamente rigorosas é a incubação de um dia para o outro a 37°C numa solução compreendendo: formamida a 20%, SSC 5× (NaCl 150 mM, citrato trissódico 15 mM), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,6), solução de Denhardt 5×, sulfato de dextrano a 10% e 20 mg/ml de ADN de esperma de salmão desnaturado e fragmentado, seguido de lavagem dos filtros em SSC 1× a cerca de 37-50°C. O perito na especialidade reconhecerá como ajustar a temperatura, força iónica, etc. conforme necessário para acomodar factores tais como o comprimento da sonda e semelhantes.

“Sequências de controlo” da expressão referem-se a sequências de ADN necessárias para a expressão de uma sequência de codificação operativamente ligada num determinado organismo hospedeiro. As sequências de controlo que são adequadas para procariotas incluem, por exemplo, um promotor, opcionalmente uma sequência operadora, e um local de ligação ao ribossoma. Sabe-se que as células eucarióticas utilizam promotores, sinais de poliadenilação e estimuladores.

O ácido nucleico está “operativamente ligado” quando é colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, o ADN para uma pré-sequência ou comando de secreção é operativamente ligado a ADN para um polipéptido se este for expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou estimulador é operativamente ligado a uma sequência de codificação se este afectar a transcrição da sequência; ou um local de ligação ao ribossoma é operativamente ligado a uma sequência de codificação se este estiver posicionado de modo a permitir a tradução. Geralmente, “operativamente ligado” significa que as sequências de ADN a ligar são contíguas e, no caso de um

comando de secreção, contíguas e em fase de leitura. No entanto, os estimuladores não têm de ser contíguos. A ligação é alcançada através de ligação em locais de restrição convenientes. Se tais locais não existirem, são utilizados adaptadores ou ligantes oligonucleotídicos sintéticos de acordo com a prática convencional.

Os termos "aminoácido" e "aminoácidos" referem-se a todos os L- α -aminoácidos de ocorrência natural. Esta definição pretende incluir norleucina, ornitina e homocisteína. Os aminoácidos são identificados através das designações de uma letra ou de três letras:

Asp	D	ácido aspártico	Ile	I	isoleucina
Thr	T	treonina	Leu	L	leucina
Ser	S	serina	Tyr	Y	tirosina
Glu	E	ácido glutâmico	Phe	F	fenilalanina
Pro	P	prolina	His	H	histidina
Gly	G	glicina	Lys	K	lisina
Ala	A	alanina	Arg	R	arginina
Cys	C	cisteína	Trp	W	triptofano
Val	V	valina	Gln	Q	glutamina
Met	M	metionina	Asn	N	asparagina

Na Listagem das Sequências e nas Figuras, são empregues outras designações de uma letra ou de três letras para referir e identificar dois ou mais aminoácidos ou nucleótidos numa dada posição na sequência. Por exemplo, no resíduo de aminoácido 20 em SEQ ID NO:12, é empregue a designação de três letras "Xaa" para identificar que no resíduo 20, o aminoácido pode ser um resíduo de glutamina ou ácido glutâmico. Nas sequências nucleotídicas referidas no Exemplo 16 e na Figura 18D, a designação "w" indica que o nucleótido pode ser um "a" ou "t"; "k" indica que o nucleótido pode ser "g" ou "t"; "b" indica que o nucleótido pode ser "g" ou "t" ou "c"; "y" indica que o nucleótido pode ser "c" ou "t"; "r" indica que o nucleótido pode ser "a" ou "g"; "s" indica que o nucleótido pode ser "g" ou "c"; "m" indica que o nucleótido pode ser "a" ou "c"; e "n" indica que o nucleótido pode ser "a" ou "t" ou "c" ou "g".

Os termos “agonista” e “agonístico” quando aqui utilizados referem-se ou descrevem uma molécula que é capaz de substancialmente induzir, promover ou estimular, directamente ou indirectamente, a actividade biológica ou a activação de DR4. Opcionalmente, um “anticorpo agonista de DR4” é um anticorpo que tem actividade comparável à do ligando para DR4, conhecido como ligando de Apo-2 (TRAIL).

Os termos “antagonista” e “antagonístico” quando aqui utilizados referem-se ou descrevem uma molécula que é capaz de substancialmente contrariar, reduzir ou inibir, directamente ou indirectamente, a actividade biológica de DR4 ou a activação de DR4.

O termo “anticorpo” é utilizado no sentido mais amplo e cobre especificamente anticorpos monoclonais anti-DR4 simples (incluindo anticorpos agonistas, antagonistas e neutralizantes ou bloqueadores) e composições de anticorpos anti-DR4 com especificidade poliepitópica. “Anticorpo” tal como aqui se utiliza inclui moléculas de imunoglobulina ou anticorpo intactas, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (i.e., anticorpos biespecíficos formados a partir de pelo menos de dois anticorpos intactos) e fragmentos de imunoglobulina (tais como Fab, F(ab')₂, ou Fv), desde que exibam qualquer uma das propriedades agonistas ou antagonistas aqui descritas desejadas.

Os anticorpos são tipicamente proteínas ou polipéptidos que exibem especificidade de ligação a um antigénio específico. Os anticorpos nativos são habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas, compostas por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Tipicamente, cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada através de uma ligação dissulfureto covalente, embora o número de ligações dissulfureto varie entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulinas. Cada cadeia pesada e leve tem também regularmente espaçadas pontes dissulfureto intercadeias. Cada cadeia pesada tem numa extremidade um domínio variável (V_H) seguido de vários domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável numa extremidade (V_L) e um domínio constante na sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio

constante da cadeia pesada e o domínio variável da cadeia leve está alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Crê-se que determinados resíduos de aminoácido formem uma interface entre os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves (Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 186: 651-663, 1985; Novotny e Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4592-4596, 1985). As cadeias leves dos anticorpos de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, designados κ e λ , com base nas sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes. Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e várias destas podem ainda ser divididas em subclasses (isotipos), p. ex., IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Os domínios constantes das cadeias pesadas que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são designados alfa, delta, épsilon, gama e mu, respectivamente.

Os "fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, geralmente a região de ligação ao antigénio ou variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv, diácorpos, moléculas de anticorpo de cadeia simples e anticorpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticorpo.

O termo "variável" é aqui utilizado para descrever certas porções dos domínios variáveis que diferem na sequência entre os anticorpos e são utilizados na ligação e especificidade de cada anticorpo particular ao seu antigénio particular. No entanto, a variabilidade não é habitualmente uniformemente distribuída ao longo dos domínios variáveis dos anticorpos. Está tipicamente concentrada em três segmentos designados regiões determinantes de complementaridade (CDR) ou regiões hipervariáveis nos domínios variáveis tanto das cadeias leves como das pesadas. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são designadas a estrutura (FR). Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves nativas compreendem cada um, quatro regiões FR, adoptando grandemente uma configuração em folha β , ligadas por três CDR, que formam

voltas que se ligam e nalguns casos fazendo parte da estrutura em folha β . As CDR em cada cadeia são mantidas juntas em íntima vizinhança através das regiões FR e, com as CDR da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação ao antígeno dos anticorpos (ver Kabat, E.A. et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987). Os domínios constantes não estão envolvidos directamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efectoras, tais como participação do anticorpo em toxicidade celular dependente de anticorpos.

O termo "anticorpo monoclonal" tal como aqui se utiliza refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogénea, i.e., os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos excepto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que possam estar presentes em quantidades mínimas. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único local antigénico. Para além disso, em contraste com preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que incluem tipicamente anticorpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antígeno.

Os anticorpos monoclonais daqui incluem anticorpos quiméricos, híbridos e recombinantes produzidos através de processamento de um domínio variável (incluindo hipervariável) de um anticorpo anti-DR4 com um domínio constante (p. ex., anticorpos "humanizados"), ou de uma cadeia leve com uma cadeia pesada, ou de uma cadeia de uma espécie com uma cadeia de outra espécie, ou fusões com proteínas heterólogas, independentemente da espécie de origem ou da designação da classe ou subclasse de imunoglobulina, bem como fragmentos de anticorpo (p. ex., Fab, F(ab')₂ e Fv), desde que exibam a actividade biológica desejada. Ver, p. ex., Pat. U.S. N.º 4816567 e Mage et al., em "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", págs. 79-97 (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987).

Assim, o adjectivo "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente

homogênea de anticorpos e não deve ser entendido como requerendo a produção do anticorpo através de qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a utilizar de acordo com o presente invento podem ser produzidos através do método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler e Milstein, *Nature* 256: 495, 1975, ou podem ser produzidos através de métodos de ADN recombinante tais como os descritos na Pat. U.S. N.º 4816567. Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas fágicas geradas utilizando, por exemplo, as técnicas descritas em McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-554, 1990, por exemplo.

As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (p. ex., de murídeo) são imunoglobulinas quiméricas específicas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos destas (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de ligação ao antígeno dos anticorpos) que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Na maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, rato ou coelho possuindo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Nalguns casos, resíduos da região estrutural de Fv (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Para além disso, o anticorpo humanizado pode compreender resíduos que não se verificam nem no anticorpo receptor nem na CDR importada nem nas sequências estruturais. Estas modificações são feitas para refinar e otimizar mais o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todo de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado compreenderá também optimamente pelo menos uma porção de uma região ou domínio constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana.

Um “anticorpo humano” é um que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde à de um anticorpo produzido por um humano e/ou foi produzido utilizando qualquer uma das técnicas para produção de anticorpos humanos tal como aqui divulgadas. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado compreendendo resíduos não humanos de ligação ao antigénio. Anticorpos humanos podem ser produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na especialidade. Numa concretização, o anticorpo humano é seleccionado a partir de uma biblioteca fágica, em que a biblioteca fágica expressa anticorpos humanos (Vaughan *et al.* *Nature Biotechnology* 14: 309-314, 1996; Sheets *et al.* *PNAS (USA)* 95: 6157-6162, 1998; Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381, 1991; Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581, 1991). Anticorpos humanos podem também ser produzidos através da introdução de *loci* de imunoglobulinas humanas em animais transgénicos, p. ex., ratinhos nos quais os genes das imunoglobulinas endógenas foram parcialmente ou completamente inactivados. Após confronto, observa-se a produção de anticorpos humanos, que se assemelha muito à observada em humanos em todos os aspectos, incluindo o rearranjo genético, a montagem e o repertório de anticorpos. Esta abordagem está descrita, por exemplo, nas Patentes U.S. N^{os} 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5661016 e nas seguintes publicações científicas: Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783, 1992; Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859, 1994; Morrison, *Nature* 368: 812-13, 1994; Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14: 845-51, 1996; Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826, 1996; Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, 1995. Alternativamente, o anticorpo humano pode ser preparado através da imortalização de linfócitos B humanos produtores de um anticorpo dirigido contra um antigénio alvo (tais linfócitos B podem ser recuperados de um indivíduo ou podem ter sido imunizados *in vitro*). Ver, p. ex., Cole *et al.*, “Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy”, Alan R. Liss, pág. 77, 1985; Boerner *et al.*, *J. Immunol.* 147(1): 86-95, 1991; e Patente U.S. N.º 5750373.

O termo “região Fc” é utilizado para definir a região C-terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina que pode ser gerada através de digestão com papaína de um anticorpo intacto. A região Fc pode ser uma região Fc de sequência nativa ou uma região Fc variante. Embora os limites da região

Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina possam variar, a região Fc da cadeia pesada da IgG humana é habitualmente definida como estendo-se de um resíduo de aminoácido cerca da posição Cys226, ou de cerca da posição Pro230, até ao terminal carboxilo da região Fc (utilizando aqui o sistema de numeração de acordo com Kabat *et al.*, *supra*). A região Fc de uma imunoglobulina compreende geralmente dois domínios constantes, um domínio CH2 e um domínio CH3, e opcionalmente compreende um domínio CH4.

Por "cadeia da região Fc" entenda-se aqui uma das duas cadeias polipeptídicas de uma região Fc.

O "domínio CH2" de uma região Fc de IgG humana (também referido como domínio "Cy2") prolonga-se habitualmente de um resíduo de aminoácido cerca da posição 231 até um resíduo de aminoácido cerca da posição 340. O domínio CH2 é único por não estar intimamente emparelhado com outro domínio. Em vez disso, estão interpostas duas cadeias de hidratos de carbono ramificadas ligadas em N entre os dois domínios CH2 de uma molécula de IgG nativa intacta. Foi especulado que os hidratos de carbono podiam proporcionar um substituto para o emparelhamento domínio-domínio e ajudar a estabilizar o domínio CH2. Burton, *Molec. Immunol.* 22: 161-206, 1985. O domínio CH2 aqui pode ser um domínio CH2 de sequência nativa ou um domínio CH2 variante.

O "domínio CH3" compreende o trecho de resíduos terminal C ao domínio CH2 de uma região Fc (i.e., desde um resíduo de aminoácido cerca da posição 341 até um resíduo de aminoácido cerca da posição 447 de uma IgG). A região CH3 daqui pode ser um domínio CH3 de sequência nativa ou um domínio CH3 variante (p. ex., um domínio CH3 com uma "protuberância" introduzida numa cadeia deste e uma "cavidade" correspondente introduzida na outra cadeia deste; ver Patente U.S. N.º 5821333). Tais domínios CH3 variantes podem ser utilizados para produzir anticorpos multiespecíficos (p. ex., biespecíficos) tal como aqui descritos.

A "região charneira" é geralmente definida como estendo-se desde cerca de Glu216, ou de cerca de Cys226, a cerca de Pro230 da IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.* 22: 161-206,

1985). As regiões charneira de outros isotipos de IgG podem ser alinhadas com a sequência de IgG1 colocando o primeiro e o último resíduos de cisteína que formam ligações S-S intercadeias pesadas nas mesmas posições. A região charneira daqui pode ser uma região charneira de sequência nativa ou uma região charneira variante. As duas cadeias polipeptídicas de uma região charneira variante mantêm geralmente pelo menos um resíduo de cisteína por cadeia polipeptídica, de modo a que as duas cadeias polipeptídicas da região charneira variante formem uma ligação dissulfureto entre as duas cadeias. A região charneira preferida aqui é uma região charneira humana de sequência nativa, p. ex., uma região charneira de IgG1 humana de sequência nativa.

Uma "região Fc funcional" possui pelo menos uma "função efectora" de uma região Fc de sequência nativa. "Funções efectoras" exemplares incluem ligação de Clq; citotoxicidade dependente do complemento (CDC); ligação ao receptor de Fc; citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC); fagocitose; infra-regulação dos receptores da superfície celular (p. ex., receptor de células B; BCR), etc. Tais funções efectoras requerem geralmente que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (p. ex., um domínio variável do anticorpo) e possam ser ensaiadas utilizando vários ensaios conhecidos na especialidade para avaliação de tais funções efectoras do anticorpo.

Uma "região Fc de sequência nativa" compreende uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência de aminoácidos de uma região Fc verificada na natureza. Uma "região Fc variante" compreende uma sequência de aminoácidos que difere da de uma região Fc de sequência nativa em virtude da modificação de pelo menos um aminoácido. De preferência, a região Fc variante tem pelo menos uma substituição de aminoácidos em comparação com a região Fc de sequência nativa ou com a região Fc de um polipéptido original, p. ex., de cerca de uma a cerca de dez substituições de aminoácidos e de preferência de cerca de uma a cerca de cinco substituições de aminoácidos numa região Fc de sequência nativa ou na região Fc do polipéptido original. A região Fc variante daqui possuirá de preferência pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com uma região Fc de sequência nativa e/ou com uma

região Fc de um polipéptido original, e de maior preferência pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência com estas, sendo preferível pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência com estas.

“Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos” e “ADCC” referem-se a uma reacção mediada por células na qual células citotóxicas não específicas que expressam receptores de Fc (FcR) (p. ex., células Assassinas Naturais (NK), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem o anticorpo ligado numa célula alvo e causam subsequentemente a lise da célula alvo. As células primárias para mediação de ADCC, células NK, expressam apenas FcγRIII, enquanto os monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR em células hematopoiéticas está resumida na Tabela 3 da página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92, 1991. Para avaliar a actividade de ADCC de uma molécula de interesse, pode ser efectuado um ensaio *in vitro* de ADCC, tal como o descrito nas Patentes U.S. N^{os} 5500362 ou 5821337. Células efectoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células Assassinas Naturais (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a actividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, p. ex., num modelo animal tal como o divulgado em Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95: 652-656, 1998.

“Células efectoras humanas” são leucócitos que expressam um ou mais FcR e realizam funções efectoras. De preferência, as células expressam pelo menos FcγRIII e realizam a função ADCC efectora. Exemplos de leucócitos humanos que medeiam ADCC incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC), células naturais assassinas (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; sendo preferidas as células PBMC e NK. As células efectoras podem ser isoladas a partir de uma fonte nativa destas, p. ex., do sangue ou PBMC tal como aqui descrito.

Os termos “receptor de Fc” e “FcR” são utilizados para descrever um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Para além disso, um FcR preferido é um que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses FcγRI,

FcγRII, e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e formas alternativamente processadas destes receptores. Os receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um “receptor activador”) e FcγRIIB (um “receptor inibidor”), que possuem sequências de aminoácidos semelhantes que diferem primariamente nos domínios citoplasmáticos destes. O receptor activador FcγRIIA contém um motivo de activação imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O receptor inibidor FcγRIIB contém um motivo de inibição imunorreceptor baseado em tirosina (ITIM) no seu domínio citoplasmático (revisto em Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234, 1997). Os FcR são revistos em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92, 1991; Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34, 1994; e de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41, 1995). Outros FcR, incluindo aqueles a identificar no futuro, estão aqui englobados pelo termo “FcR”. O termo inclui também o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência das IgG maternas para o feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587, 1976; e Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249, 1994).

“Citotoxicidade dependente do complemento” e “CDC” referem-se à lise de um alvo na presença de complemento. A via de activação do complemento é iniciada através da ligação do primeiro componente do sistema do complemento (C1q) a uma molécula (p. ex., um anticorpo) complexada com um antigénio cognato. Para avaliar a activação do complemento, pode ser realizado um ensaio de CDC, p. ex., tal como descrito em Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163, 1996.

Um anticorpo de “afinidade madura” é um com uma ou mais alterações numa ou mais CDR deste que resultam numa melhoria na afinidade do anticorpo ao antigénio, em comparação com um anticorpo original que não possua essa alteração ou alterações. Os anticorpos com afinidade madura preferidos terão afinidades nanomolares ou mesmo picomolares para o antigénio alvo. Os anticorpos com afinidade madura são produzidos através de procedimentos conhecidos na especialidade. Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783, 1992, descrevem a maturação da afinidade através de baralhamento dos domínios VH e VL. A mutagénesis aleatória de resíduos de CDR e/ou estruturais é descrita por: Barbas *et al.*, *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813, 1994; Schier *et al.*, *Gene* 169:

147-155, 1995; Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155: 1994-2004, 1995; Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7): 3310-9, 1995; e Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896, 1992.

“Biologicamente activo” e “actividade biológica desejada” para os fins daqui significam possuir a capacidade de modular a actividade de DR4 ou a activação de DR4, incluindo por exemplo, apoptose (de um modo agonista ou estimulador ou de um modo antagonista ou bloqueador) em pelo menos um tipo de célula de mamífero *in vivo* ou *ex vivo* ou a ligação ao ligando de Apo-2 (TRAIL).

Os termos “apoptose” e “actividade apoptótica” são utilizados num sentido amplo e referem-se à forma ordenada ou controlada de morte celular em mamíferos que é tipicamente acompanhada por uma ou mais alterações celulares características, incluindo condensação do citoplasma, perda das microvilosidades da membrana plasmática, segmentação do núcleo, degradação do ADN cromossómico ou perda da função mitocondrial. Esta actividade pode ser determinada e medida, por exemplo, através de ensaios de viabilidade celular, análise de FACS ou electroforese de ADN, as quais são todas conhecidas na especialidade.

Os termos “cancro”, “canceroso” e “maligno” referem-se ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Exemplos de cancro incluem mas não se limitam a carcinoma, incluindo adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais particulares de tais cancros incluem cancro de células escamosas, cancro do pulmão de células pequenas, cancro do pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão, carcinoma de células escamosas do pulmão, cancro gastrointestinal, linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, cancro pancreático, glioblastoma, cancro cervical, glioma, cancro do ovário, cancro do fígado tal como carcinoma hepático e hepatoma, cancro da bexiga, cancro da mama, cancro do cólon, cancro colorrectal, carcinoma do endométrio ou do útero, carcinoma das glândulas salivares, cancro do rim tal como carcinoma das células renais e tumores de Wilms, carcinoma das células basais, melanoma, cancro da próstata,

cancro da vulva, cancro da tiróide, cancro testicular, cancro esofágico e vários tipos de cancro da cabeça e do pescoço.

O termo “doença relacionada com imunidade” significa uma doença na qual um componente do sistema imunitário de um mamífero causa, medeia ou contribui de outro modo para uma morbilidade no mamífero. Estão também incluídas doenças nas quais a estimulação ou intervenção da resposta imunitária tem um efeito melhorador na progressão da doença. Incluídas dentro deste termo estão as doenças auto-imunes, doenças inflamatórias mediadas pelo sistema imunitário, doenças inflamatórias não mediadas pelo sistema imunitário, doenças infecciosas e doenças de imunodeficiência. Exemplos de doenças relacionadas com imunidade e inflamatórias, algumas das quais são mediadas pelo sistema imunitário ou por células T, que podem ser tratadas de acordo com o presente invento incluem lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide, artrite crónica juvenil, espondiloartropatias, esclerose sistémica (esclerodermia), miopatias inflamatórias idiopáticas (dermatomiosite, polimiosite), síndrome de Sjogren, vasculite sistémica, sarcoidose, anemia hemolítica auto-imune (pancitopenia imune, hemoglobinúria paroxismal nocturna), trombocitopenia auto-imune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada pelo sistema imunitário), tiroidite (doença de Grave, tiroidite de Hashimoto, tiroidite linfocítica juvenil, tiroidite atrófica), diabetes *mellitus*, doença renal mediada pelo sistema imunitário (glomerulonefrite, nefrite tubulo-intersticial), doenças desmielinizantes dos sistemas nervosos central e periférico tais como esclerose múltipla, polineuropatia desmielinizante idiopática ou síndrome de Guillain-Barré, e polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica, doenças hepatobiliares tais como hepatite infecciosa (hepatite A, B, C, D, E e outros vírus não hepatotrópicos), hepatite auto-imune crónica activa, cirrose biliar primária, hepatite granulomatosa e colangite esclerosante, doenças pulmonares inflamatórias e fibróticas tais como doença inflamatória dos intestinos (colite ulcerosa: doença de Crohn), enteropatia sensível ao glúten e doença de Whipple, doenças de pele auto-imunes ou mediadas pelo sistema imunitário incluindo doenças da pele vesiculares, eritema multiforme e dermatite de contacto, psoríase, doenças alérgicas tais como asma, rinite alérgica, dermatite atópica,

hipersensibilidade alimentar e urticária, doenças imunológicas do pulmão tais como pneumonias eosinófilas, fibrose pulmonar idiopática e pneumonite de hipersensibilidade, doenças associadas a transplantação incluindo rejeição de enxertos e doença de enxerto-versus-hospedeiro. As doenças infecciosas incluem SIDA (infecção por VIH), hepatite A, B, C, D e E, infecções bacterianas, infecções fúngicas, infecções de protozoários e infecções parasitárias.

“Doença auto-imune” é aqui utilizado num sentido amplo, e geral para se referir a distúrbios ou condições em mamíferos nos quais a destruição de tecidos normais ou saudáveis surge de respostas imunitárias humorais ou celulares de cada mamífero aos seus próprios constituintes de tecidos. Exemplos incluem, mas não se limitam a, lúpus eritematoso, tiroidite, artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla, diabetes auto-imune e doença inflamatória dos intestinos (IBD).

Um “agente inibidor do crescimento” quando aqui utilizado refere-se a um composto ou composição que inibe o crescimento de uma célula *in vitro* e/ou *in vivo*. Assim, o agente inibidor do crescimento pode ser um que reduza significativamente a percentagem de células na fase S. Exemplos de agentes inibidores do crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (num local diferente da fase S), tais como agentes que induzem paragem em G1 e paragem na fase M. Bloqueadores clássicos da fase M incluem os vincas (vincristina e vinblastina), TAXOL®, e inibidores da topo II tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposido e bleomicina. Os agentes que param em G1 também abrangem paragem na fase S, por exemplo, agentes alquilantes de ADN tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo e ara-C. Mais informação pode ser verificada em “The Molecular Basis of Cancer”, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, intitulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” de Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente na pág. 13.

O termo “pró-fármaco” tal como se utiliza neste pedido refere-se a uma forma precursora ou derivada de uma substância farmacologicamente activa que é menos citotóxica para células

de cancro em comparação com o fármaco original e é capaz de ser enzimaticamente activada ou convertida na forma original mais activa. Ver, p. ex., Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, págs. 375-382, "615th Meeting Belfast", 1986 e Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", "Directed Drug Delivery", Borchardt et al., (ed.), págs. 247-267, Humana Press, 1985. Os pró-fármacos deste invento incluem, mas não se limitam a pró-fármacos contendo fosfato, pró-fármacos contendo tiofosfato, pró-fármacos contendo sulfato, pró-fármacos contendo péptidos, pró-fármacos modificados D-aminoácidos, pró-fármacos glicosilados, pró-fármacos contendo beta-lactamas, pró-fármacos opcionalmente substituídos contendo fenoxiacetamida ou pró-fármacos opcionalmente substituídos contendo fenilacetamida, pró-fármacos de 5-fluorocitosina e outros de 5-fluorouridina que podem ser convertidos no fármaco livre citotóxico mais activo. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivados numa forma de pró-fármaco para utilizar neste invento incluem, mas não se limitam aos agentes quimioterapêuticos descritos abaixo.

O termo "agente citotóxico" tal como aqui se utiliza refere-se a uma substância que inibe ou impede a função de células e/ou causa a destruição de células. O termo pretende incluir isótopos radioactivos (p. ex., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapêuticos e toxinas tais como toxinas de molécula pequena ou toxinas enzimaticamente activas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes destas.

Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento de condições como cancro. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes tais como tiotepa e ciclofosfamida (CYTOXANTM); sulfonatos de alquilo tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilmelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano); briostatina; calistatina;

CC-1065 (incluindo os seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictiina; espongistatina; mostardas azotadas tais como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracilo; nitrosureias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tais como os antibióticos de enediina (p. ex., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina γ_1^I e caliqueamicina θ_1^I , ver, p. ex., Agnew, *Chem. Intl. Ed. Engl.* 33: 183-186, 1994; dinemicina, incluindo dinemicina A; uma esperamicina; bem como o cromóforo neocarzinostatina e cromóforos antibióticos aparentados com a cromoproteína enediina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluindo morfolinodoxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina e desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tais como metotrexato e 5-fluorouracilo (5-FU); análogos do ácido fólico tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purinas tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; androgénios tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-supra-renais tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; substitutos do ácido fólico tais como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptínio; uma epotilona; etoglúcido;

nittrato de gálio; hidroxíureia; lentinano; lonidamina; maitansinóides tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etil-hidrazida; procarbazona; PSK[®]; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermânio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxóides, p. ex., paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Miers Squibb Oncology, Princeton, NJ) e doxetaxel (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor da topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinóico; capecitabina; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer um dos de cima. Também incluídos nesta definição estão agentes anti-hormonais que actuem regulando ou inibindo a acção hormonal em tumores tais como anti-estrogénios incluindo por exemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inibem a aromatase, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona e toremifeno (Fareston); e anti-androgénios tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelina; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer um dos de cima.

O termo "citoquina" é um termo genérico para proteínas libertadas por uma população celular que actuam sobre outra célula como mediadores intercelulares. Exemplos de tais citoquinas são as linfoquinas, monoquinas e hormonas polipeptídicas tradicionais. Incluídas entre as citoquinas estão hormonas do crescimento tais como a hormona do crescimento humana, N-metionil-hormona do crescimento humana e hormona do crescimento bovina; hormona da paratiróide; tiroxina; insulina; pró-insulina; relaxina; pró-relaxina; hormonas glicoproteicas tais como a hormona estimuladora do

folículo (FSH), hormona estimuladora da tiróide (TSH), e hormona luteinizante (LH); factor de crescimento hepático; factor de crescimento de fibroblastos; prolactina; lactogéneo placentário; factor de necrose tumoral-alfa e -beta; substância inibidora de *mulleriana*; péptido associado à gonadotrofina de ratinho; inibina; activina; factor de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); factores de crescimento dos nervos tais como NGF-alfa; factor de crescimento das plaquetas; factores de crescimento transformantes (TGF) tais como TGF-alfa e TGF-beta; factor de crescimento semelhante a insulina-I e II; eritropoietina (EPO); factores osteoindutores; interferões tais como interferão-alfa, -beta e -gamma; factores estimuladores de colónias (CSF) tais como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulócitos-macrófagos (GM-CSF); e CSF de granulócitos (G-CSF); interleucinas (IL) tais como IL-1, IL-1-alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; um factor de necrose tumoral tal como TNF-alfa ou TNF-beta; e outros factores polipeptídicos incluindo LIF e ligando *kit* (KL). Tal como aqui se utiliza o termo citoquina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura de células recombinantes e equivalentes biologicamente activos das citoquinas de sequência nativa.

Os termos "tratar", "tratamento" e "terapia" tal como aqui utilizados referem-se a terapia curativa, terapia profilática e terapia preventiva.

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um fármaco eficaz para tratar uma doença ou distúrbio num mamífero. No caso de cancro, a quantidade terapeuticamente eficaz do fármaco pode reduzir o número de células de cancro; reduzir o tamanho do tumor; inibir (i.e., atrasar até certo ponto e de preferência parar) a infiltração das células de cancro em órgãos periféricos; inibir (i.e., atrasar até certo ponto e de preferência parar) metástase tumoral; inibir, até certo ponto, o crescimento tumoral; e/ou aliviar até certo ponto um ou mais dos sintomas associados ao distúrbio. Até ao ponto em que o fármaco pode impedir o crescimento e/ou matar células de cancro existentes, este pode ser citostático e/ou citotóxico. Para a terapia de cancro, a eficácia *in vivo* pode, por exemplo, ser medida através da

avaliação do fardo ou volume tumoral, do tempo para progressão da doença (TTP) e/ou da determinação das velocidades de resposta (RR).

O termo "mamífero" tal como aqui se utiliza refere-se a qualquer mamífero classificado como mamífero, incluindo humanos, vacas, cavalos, cães e gatos. Numa concretização preferida do presente invento, o mamífero é um humano.

II. Composições e Métodos do Invento

A. Anticorpos contra DR4

O presente invento refere-se a anticorpos quiméricos anti-DR4 tal como exposto nas reivindicações. Estes anticorpos podem ser agonistas, antagonistas ou anticorpos de bloqueio.

1. Anticorpos Policlonais

Os anticorpos podem compreender anticorpos policlonais. Os métodos de preparação de anticorpos policlonais são conhecidos dos peritos na especialidade. Os anticorpos policlonais podem ser criados num mamífero, por exemplo, através de uma ou mais injeções de um agente imunizante e, se desejado, um adjuvante. Tipicamente, o agente imunizante e/ou adjuvante serão injectados no mamífero através de múltiplas injeções subcutâneas ou intraperitoneais. O agente imunizante pode incluir o polipéptido DR4 (ou um ECD de DR4) ou uma proteína de fusão deste. Pode ser útil conjugar o agente imunizante com uma proteína que se saiba ser imunogénica no mamífero a imunizar. Exemplos de tais proteínas imunogénicas incluem mas não se limitam a hemocianina da lapa, albumina do soro, tiroglobulina bovina e inibidor da tripsina de soja. Exemplos de adjuvantes que podem ser empregues incluem adjuvante completo de Freund e adjuvante MPL-TDM (monofosforil-lípido A, dicorinomicolato de trealose sintético). O protocolo de imunização pode ser seleccionado por um perito na especialidade sem demasiada experimentação. O mamífero pode então ser sangrado e o soro ser ensaiado quanto ao título de anticorpo contra DR4. Se desejado, o mamífero pode ser reforçado até o título do anticorpo aumentar ou atingir um patamar.

2. Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos podem, alternativamente, ser anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando métodos de hibridoma tais como os descritos por Kohler e Milstein, *Nature* 256: 495, 1975. Num método de hibridoma, um ratinho, *hamster* ou outro animal hospedeiro apropriado, é tipicamente imunizado com um agente imunizante para desencadear linfócitos que produzam ou sejam capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente ao agente imunizante. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

O agente imunizante incluirá tipicamente o polipéptido DR4 (ou o ECD de DR4) ou uma proteína de fusão deste, tal como uma proteína de fusão ECD de DR4-IgG. O agente imunizante pode alternativamente compreender um fragmento ou uma porção de DR4 possuindo um mais aminoácidos que participam na ligação de Apo-2L a DR4. Numa concretização preferida, o agente imunizante compreende uma sequência do domínio extracelular de DR4 fundida com uma sequência de IgG, tal como descrito no Exemplo 1.

Geralmente, são utilizados linfócitos do sangue periférico ("PBL") se forem desejadas células de origem humana ou são utilizadas células do baço ou de nódulos linfáticos se forem desejadas fontes de mamíferos não humanos. Os linfócitos são então fundidos com uma linha celular imortalizada utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", Academic Press, 1986, págs. 59-103). As linhas celulares imortalizadas são habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origem em roedor, bovino e humano. Habitualmente, são empregues linhas celulares de mieloma de rato ou ratinho. As células de hibridoma podem ser cultivadas num meio de cultura adequado que contenha de preferência uma ou mais substâncias que inibam o crescimento ou a sobrevivência das células imortalizadas não fundidas. Por exemplo, se as células parentais não possuírem a enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (HGPRT ou

HPRT), o meio de cultura dos hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"), cujas substâncias impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

As linhas celulares imortalizadas preferidas são as que se fundem eficientemente, suportam um elevado nível de expressão estável de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo selecionadas e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Linhas celulares imortalizadas mais preferidas são linhas de mieloma de murídeo, que podem ser obtidas, por exemplo, em Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia e em American Type Culture Collection, Manassas, Virgínia. Um exemplo de uma tal linha celular de mieloma de murídeo é P3X63AgU.1 descrita no Exemplo 2 abaixo. Foram também descritas linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma de ratinho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001, 1984; Brodeur *et al.*, "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", Marcel Dekker, Inc., New York, 1987 págs. 51-63).

O meio de cultura no qual as células de hibridoma são cultivadas pode então ser ensaiado quanto à presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra DR4. De preferência, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada através de imunoprecipitação ou através de um ensaio de ligação *in vitro*, tal como um radioimunoensaio (RIA) ou um ensaio imunossorvente enzimático (ELISA). Tais técnicas e ensaios são conhecidos na especialidade. A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada através de análise Scatchard de Munson e Pollard, *Anal. Biochem.* 107: 220, 1980.

Após a identificação das células de hibridoma desejadas, os clones podem ser subclonados através de procedimentos de diluição limitante e criados através de métodos padrão (Goding, *supra*). Meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo, Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ou RPMI-1640. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser criadas *in vivo* como ascites num mamífero.

Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones podem ser isolados ou purificados a partir do meio de cultura ou do fluido de ascites através de procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulinas tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Os anticorpos monoclonais podem também ser produzidos através de métodos de ADN recombinante, tais como os descritos na Patente U.S. N.º 4816567. O ADN codificando os anticorpos monoclonais do presente invento pode ser prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (p. ex., através da utilização de sondas oligonucleotídicas que sejam capazes de se ligar especificamente a genes codificando as cadeias pesadas e leves de anticorpos de murídeo). As células de hibridoma servem como fonte preferida de tal ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfectados para células hospedeiras tais como células COS de símio, células de ovário de *hamster* chinês (CHO) ou células de mieloma que de outro modo não produzem proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O ADN pode também ser modificado, por exemplo, através da substituição da sequência de codificação para domínios constantes de cadeias pesadas e leves humanas em vez das sequências homólogas de murídeo (Patente U.S. N.º 4816567; Morrison *et al.*, *supra*) ou através de ligação covalente à sequência de codificação da imunoglobulina de toda ou parte da sequência de codificação para um polipéptido não imunoglobulina. Tal polipéptido não imunoglobulina pode substituir os domínios constantes de um anticorpo do presente invento ou pode substituir os domínios variáveis de um local de combinação com o antigénio de um anticorpo do presente invento para criar um anticorpo bivalente quimérico.

Tal como descrito nos Exemplos abaixo, foram identificados e preparados vários anticorpos monoclonais anti-DR4 alguns dos quais são o objecto das reivindicações. Certos desses anticorpos, aqui referidos como 4E7.24.3, 4H6.17.8, 1H5.25.9, 4G7.18.8 e 5G11.17.1, foram depositados na ATCC. Numa concretização, os anticorpos monoclonais do presente invento terão as mesmas características biológicas que os

anticorpos monoclonais segregados pela linha ou linhas celulares de hibridoma referidas acima que foram depositadas na ATCC. O termo "características biológicas" é utilizado para referir actividades ou propriedades *in vitro* e/ou *in vivo* do anticorpo monoclonal, tais como a capacidade para se ligar especificamente a DR4 ou para bloquear, induzir ou estimular a activação de DR4 (ou actividades relacionadas com DR4). Por exemplo, um anticorpo bloqueador pode bloquear a ligação do ligando de Apo-2 a DR4 ou bloquear a apoptose induzida pelo ligando de Apo-2 numa célula de mamífero (tal como uma célula de cancro). Tal como divulgado no presente fascículo (ver Figura 6), o anticorpo monoclonal 4E7.24.3 caracteriza-se como ligando-se especificamente a DR4 (e possuindo alguma reactividade cruzada com Apo-2), sendo capaz de induzir apoptose e não sendo capaz de bloquear DR4. O anticorpo monoclonal 4H6.17.8 caracteriza-se como ligando-se especificamente a DR4 (e possuindo alguma reactividade cruzada com Apo-2), sendo capaz de induzir apoptose e sendo capaz de bloquear a ligação do ligando de Apo-2 a DR4. Tal como aqui divulgado, o anticorpo 4H6.17.8 exibiu uma actividade anticancerosa mais potente que o anticorpo 4E7.24.3 num modelo de tumor *in vivo*. Contudo, o anticorpo 4E7.24.3 exibiu actividade antitumoral mesmo não sendo capaz de bloquear a ligação do ligando de Apo-2 a DR4. Esta observação sugere que um anticorpo anti-DR4 possuindo um epítopo que é o mesmo que o local de ligação do ligando de Apo-2 em DR4, ou alternativamente, se sobrepõe ao local de ligação do ligando de Apo-2 em DR4 ou cria uma conformação espacial que impede que o ligando de Apo-2 se ligue a DR4, não é essencial ou necessário para actividade apoptótica ou antitumoral. No entanto, um anticorpo contra DR4 possuindo um tal epítopo ou conformação espacial pode exhibir uma maior eficiência ou potência de tal actividade apoptótica ou antitumoral. As propriedades e actividades dos anticorpos 1H5.25.9, 4G7.18.8 e 5G11.17.1 são também descritas nos Exemplos abaixo (e também referidas na Fig. 17). Opcionalmente, os anticorpos monoclonais do presente invento ligar-se-ão ao mesmo epítopo ou epítopos que os anticorpos 4E7.24.3, 4H6.17.8, 1H5.25.9, 4G7.18.8 e/ou 5G11.17.1 aqui divulgados. Isto pode ser determinado através da condução de vários ensaios, tal como aqui descrito e nos Exemplos. Por exemplo, para determinar se um anticorpo monoclonal tem a mesma especificidade que os

anticorpos contra DR4 especificamente aqui referidos, pode-se comparar a sua actividade em ensaios de bloqueio de DR4 ou ensaios de indução de apoptose, tais como os descritos nos Exemplos abaixo.

Tal como melhor descrito nos Exemplos abaixo, os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas do anticorpo monoclonal de murídeo 4H6.17.8 foram sequenciados e foi construída uma forma quimérica do anticorpo 4H6.17.8 (aqui referida como "anticorpo quimérico 4H6"). O presente invento contempla que os anticorpos quiméricos anti-DR4 reivindicados terão utilidade terapêutica e/ou de diagnóstico, tal como aqui descrito. Os anticorpos quiméricos, híbridos ou recombinantes anti-DR4 (bem como, por exemplo, diacorpos ou triacorpos descritos mais abaixo) podem compreender um anticorpo possuindo as cadeias pesadas e leves inteiras (tais como, p. ex., as cadeias leves e pesadas mostradas nas Figuras 18A-18H) ou fragmentos destas, tais como o fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ ou Fv, um monómero ou dímero de tal cadeia leve ou cadeia pesada, uma cadeia simples Fv na qual tal cadeia ou cadeias pesadas ou leves são unidas através de uma molécula ligante, ou possuindo domínios variáveis (ou domínios hipervariáveis) de tal cadeia ou cadeias leves ou pesadas combinados com outro tipos ainda de domínios de anticorpo.

No presente invento, o anticorpo contra DR4 compreende uma cadeia leve, em que a cadeia leve inclui um domínio variável compreendendo os aminoácidos 20 a 126 das Figuras 18A-18C (SEQ ID NO:9). A cadeia leve em tal anticorpo contra DR4 pode compreender opcionalmente uma sequência de sinal compreendendo os aminoácidos 1 a 19 das Figuras 18A-18C (SEQ ID NO:9). Os anticorpos do presente invento compreendem ainda um domínio CH1 humano compreendendo os aminoácidos 127 a 233 das Figuras 18A-18C (SEQ ID NO:9), uma cadeia pesada, em que a cadeia pesada inclui um domínio variável compreendendo os aminoácidos 20 a 145 das Figuras 18D-18H (SEQ ID NO:12) ou os aminoácidos 22 a 145 das Figuras 18D-18H (SEQ ID NO:12). A cadeia pesada em tal anticorpo contra DR4 pode compreender opcionalmente uma sequência de sinal compreendendo os aminoácidos 1 a 19 das Figuras 18D-18H (SEQ ID NO:12). Os anticorpos do presente invento compreendem ainda os domínios

CH1, CH2 e CH3 humanos compreendendo os aminoácidos 146 a 476 da Figuras 18D-18H (SEQ ID NO:12).

Está contemplado que as várias regiões ou domínios das sequências de anticorpo aqui descritas, incluindo as sequências do domínio variável (ou domínio hipervariável) (identificadas nas Figuras 18A-18H) das cadeias leves e/ou pesadas do anticorpo monoclonal de murídeo 4H6, podem ser modificadas em termos da composição de aminoácidos. Por exemplo, está contemplado que pode ser feita uma ou mais substituições conservativas de aminoácidos nos domínios variáveis proporcionados nas Figuras 18A-18C ou nas Figuras 18D-18H. Está contemplado que as modificações de aminoácidos podem ser feitas em qualquer uma ou mais de uma das regiões CDR ou estruturais identificadas nos domínios variáveis mostrados nas Figuras 18A-18H.

Tal modificação ou modificações da sequência de aminoácidos dos anticorpos aqui descritas podem, por exemplo, ser desejáveis para melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. Variantes da sequência de aminoácidos do anticorpo podem ser preparadas através da introdução de mudanças de nucleótidos apropriadas no ácido nucleico do anticorpo ou através de síntese peptídica. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções e/ou inserções e/ou substituições de resíduos dentro das sequências de aminoácidos do anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição é feita para se alcançar a construção final, desde que a construção final possua as características desejadas. As mudanças de aminoácidos podem também alterar os processos pós-tradução do anticorpo, tais como a alteração do número ou posição de locais de glicosilação. Tais alterações podem ser feitas no anticorpo original e/ou podem ser introduzidas na sequência de aminoácidos do anticorpo modificada no momento em que essa sequência é produzida.

Um método útil para identificação de certos resíduos ou regiões do anticorpo que são localizações preferidas para mutagênese é designado "mutagênese de varrimento de alanina" tal como descrito por Cunningham e Wells, *Science* 244: 1081-1085, 1989. Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo é

identificado (p. ex., resíduos com carga positiva tais como arg, asp, his, lys e glu) e substituído por um aminoácido neutro ou com carga negativa (de preferência alanina ou polialanina) para afectar a interacção dos aminoácidos com o antigénio. As localizações de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são então refinadas através da introdução de mais ou de outras variantes em, ou para, os locais de substituição. Assim, embora o local para a introdução de uma variação na sequência de aminoácidos seja predeterminado, a natureza da mutação *per se* não necessita de ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação num dado local, é conduzida mutagénese de varrimento de ala ou aleatória no codão ou região alvo e os anticorpos expressos são pesquisados quanto à propriedade ou actividade desejada.

As inserções na sequência de aminoácidos incluem fusões amino-terminais e/ou carboxi-terminais variando em comprimento de um resíduo a polipéptidos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-sequência de um ou múltiplos resíduos de aminoácido. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionilo N-terminal ou o anticorpo fundido com um agente citotóxico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão com o terminal N ou C do anticorpo com uma enzima (p. ex., para ADEPT) ou um polipéptido que aumenta a semivida do anticorpo.

Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácidos. Estas variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácidos na molécula de anticorpo substituído por um resíduo diferente. Os locais de maior interesse para mutagénese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas estão também contempladas alterações estruturais. As substituições conservativas são mostradas na Tabela 1 sob o cabeçalho de "substituições preferidas". Se tais substituições resultarem numa alteração na actividade ou propriedades biológicas, então alterações mais substanciais, denominadas "substituições exemplares" na Tabela 1, ou tal como melhor descrito abaixo em referência às classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos pesquisados.

Tabela 1

Resíduo Original	Substituições Exemplificativas	Substituições Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	Leu

Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são alcançadas através de selecção de substituições que difiram significativamente no seu efeito na manutenção (a) da estrutura do esqueleto polipeptídico na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no local alvo, ou (c) do volume da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com base nas propriedades comuns da cadeia lateral:

- 1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- 2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

- 3) ácidos: asp, glu;
- 4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- 5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: gly, pro;
e
- 6) aromáticos: trp, tyr, phe.

As substituições não conservativas implicarão a permuta de um membro de uma destas classes por outro de outra classe.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação correcta do anticorpo pode também ser substituído, geralmente com serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e impedir ligação cruzada aberrante. Inversamente, pode ser adicionada uma ou mais ligações de cisteína ao anticorpo para melhorar a sua estabilidade.

Um tipo particularmente preferido de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo original (p. ex., um anticorpo humanizado ou humano). Geralmente, a variante ou variantes resultantes seleccionadas para posterior desenvolvimento terão uma actividade ou propriedades biológicas melhoradas relativamente ao anticorpo original a partir do qual são geradas. Um modo conveniente de criação de tais variantes de substituição envolve a maturação da afinidade utilizando apresentação fágica. Resumidamente, vários locais da região hipervariável (p. ex., 6-7 locais) são mutados para gerar todas as substituições de aminoácidos possíveis em cada local. Os anticorpos assim gerados são apresentados de um modo monovalente a partir de partículas fágicas filamentosas como fusões com o produto do gene III de M13 empacotado em cada partícula. As variantes apresentadas por fagos são então pesquisadas quanto à sua actividade biológica (p. ex., afinidade de ligação) tal como aqui divulgado. Para identificar locais da região hipervariável candidatos para modificação, pode ser efectuada mutagenese de varrimento de alanina para identificar os resíduos da região hipervariável que contribuem significativamente para a ligação ao antigénio. Alternativamente ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristalina do complexo

antigénio-anticorpo para identificar pontos de contacto entre o anticorpo e o antigénio. Tais resíduos de contacto e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas aqui elaboradas. Uma vez geradas tais variantes, o painel das variantes é sujeito a pesquisa tal como aqui descrito e os anticorpos com propriedades superiores num ou mais ensaios relevantes podem ser seleccionados para posterior desenvolvimento.

Numa concretização, o anticorpo contra DR4 pode compreender uma cadeia leve e/ou pesada compreendendo uma sequência do domínio variável possuindo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90% e, de maior preferência, pelo menos 95% de identidade da sequência de aminoácidos com uma ou mais das sequências do domínio variável, domínio hipervariável ou estruturais aqui identificadas para o anticorpo 4H6.

Os anticorpos do presente invento incluem anticorpos contra DR4 "de ligação cruzada". O termo "ligação cruzada" tal como se aqui utiliza refere-se à ligação de pelo menos duas moléculas de IgG uma com a outra para formar uma (ou única) molécula. Os anticorpos contra DR4 podem ser ligados de forma cruzada utilizando várias moléculas ligantes, de preferência, os anticorpos contra DR4 são ligados de modo cruzado utilizando uma molécula anti-IgG, complemento, modificação química ou engenharia molecular. É apreciado pelos peritos na especialidade que o complemento tem uma afinidade relativamente elevada para moléculas de anticorpo quando os anticorpos se ligam à membrana da superfície celular. Assim, crê-se que o complemento pode ser utilizado como molécula de ligação cruzada para ligar dois ou mais anticorpos anti-DR4 ligados à membrana da superfície celular. Entre os vários isotipos de Ig de murídeo, sabe-se que IgM, IgG2a e IgG2b (tais como os anticorpos 1H5, 4G7 e 5G11) fixam o complemento. Os anticorpos descritos nos Exemplos abaixo, pertencentes às classes IgG2 de murídeo, foram assim testados quanto à actividade apoptótica na presença de complemento de coelho. A actividade apoptótica, *in vitro*, dos anticorpos de ligação cruzada (que foi comparável à de Apo-2L) sugere que o complemento ou ligantes cruzados IgG-Fc podem ser úteis na indução de oligomerização de tais anticorpos contra DR4 para, p. ex., apoptose de células de cancro. A ligação cruzada dos

vários outros anticorpos anti-DR4 é também descrita nos Exemplos utilizando anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho ou anticorpo de cabra anti-Fc de IgG humana. Observa-se que para os estudos *in vivo* descritos nos Exemplos, era ainda observada actividade apoptótica apesar dos anticorpos contra DR4 administrados não terem sido ligados de modo cruzado antes da administração.

Os anticorpos do presente invento podem compreender opcionalmente anticorpos diméricos, bem como formas multivalentes de anticorpos. Os peritos na especialidade podem construir dímeros ou formas multivalentes através de técnicas conhecidas na especialidade e utilizando os anticorpos contra DR4 daqui.

Os anticorpos podem também compreender anticorpos monovalentes. Os métodos para preparação de anticorpos monovalentes são bem conhecidos na especialidade. Por exemplo, um método envolve a expressão recombinante da cadeia leve de imunoglobulina e uma cadeia pesada modificada. A cadeia pesada é truncada geralmente em qualquer ponto da região Fc de modo a prevenir ligação cruzada das cadeias pesadas. Alternativamente, os resíduos de cisteína relevantes são substituídos por outro resíduo de aminoácido ou são suprimidos de modo a impedir a ligação cruzada.

Métodos *in vitro* são também adequados para preparação de anticorpos monovalentes. A digestão de anticorpos para produzir fragmentos destes, particularmente fragmentos Fab, pode ser alcançada utilizando técnicas de rotina conhecidas na especialidade. Por exemplo, a digestão pode ser efectuada utilizando papaína. Exemplos de digestão com papaína são descritos em WO 94/29348 publicado a 12/22/94 e Patente U.S. N.º 4342566. A digestão com papaína de anticorpos produz tipicamente dois fragmentos de ligação ao antigénio idênticos, designados fragmentos Fab, cada um com um único local de ligação ao antigénio, e um fragmento Fc residual. O tratamento com pepsina produz um fragmento $F(ab')_2$ que possui dois locais de combinação com o antigénio e é ainda capaz de se ligar de forma cruzada ao antigénio.

Os fragmentos Fab produzidos na digestão do anticorpo contêm também os domínios constantes da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH_1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos no terminal carboxilo do domínio CH_1 da cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região charneira do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui para Fab' em que o resíduo ou resíduos de cisteína dos domínios constantes possuem um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ foram originalmente produzidos como pares de fragmentos Fab' que possuem cisteínas de charneira entre eles. São também conhecidas outras ligações químicas de fragmentos de anticorpo.

Podem também ser produzidos fragmentos Fv de cadeia simples, tal como descrito em Iliades *et al.*, *FEBS Letters* 409: 437-441, 1997. A ligação de tais fragmentos de cadeia simples utilizando vários ligantes está descrita em Kortt *et al.*, *Protein Engineering* 10: 423-433, 1997.

Para além dos anticorpos descritos acima, está contemplado que anticorpos quiméricos ou híbridos podem ser preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos na química de síntese proteica, incluindo aqueles envolvendo agentes de ligação cruzada. Por exemplo, podem ser construídas imunotoxinas utilizando uma reacção de permuta de dissulfureto ou através da formação de uma ligação tioéter. Exemplos de reagentes adequados para este fim incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato.

Os anticorpos contra DR4 podem ainda compreender anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. As formas humanizadas de anticorpos não humanos (p. ex., de murídeo) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos destas (tais como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ ou outras subsequências de anticorpos de ligação ao antigénio) que contenham uma sequência mínima derivada da imunoglobulina não humana. Os anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, rato ou coelho possuindo a

especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Nalguns casos, resíduos estruturais de Fv da imunoglobulina humana são substituídos pelos resíduos não humanos correspondentes. Os anticorpos humanizados podem também compreender resíduos que não se verificam nem no anticorpo receptor nem nas sequências de CDR ou estruturais importadas. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todo de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis em que todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado compreenderá também optimamente pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana (Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525, 1986; Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329, 1988; e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596, 1992).

Os métodos para humanização de anticorpos não humanos são bem conhecidos na especialidade. Geralmente, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos nele de uma fonte que é não humana. Estes resíduos de aminoácido não humanos são frequentemente referidos como resíduos de "importação"; que são tipicamente tomados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente efectuada seguindo o método de Winter e colegas (Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525, 1986; Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-327, 1988; Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534-1536, 1988), através de substituição de CDR de roedor ou de sequências de CDR para as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Assim, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente U.S. N.º 4816567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedores.

A escolha dos domínios variáveis humanos, tanto da leve como da pesada, a utilizar na produção de anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade.

De acordo com o método do "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é pesquisada contra toda a biblioteca de sequências conhecidas do domínio variável humano. A sequência humana que estiver mais próxima da do roedor é então aceite como estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2296-2308, 1993; Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987). Outro método utiliza uma estrutura particular derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular das cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289, 1992; Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2623-2632, 1993).

É ainda importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção da elevada afinidade para o antígeno e de outras propriedades biológicas favoráveis. Para alcançar este objectivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados através de um processo de análise das sequências originais e vários produtos humanizados conceptuais utilizando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Os modelos de imunoglobulina tridimensionais estão vulgarmente disponíveis e são familiares aos peritos na especialidade. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e mostram estruturas conformacionais tridimensionais prováveis das sequências de imunoglobulina candidatas seleccionadas. A inspecção destas apresentações permite a análise do provável papel dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, i.e., a análise dos resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata para se ligar ao seu antígeno. Deste modo, resíduos de FR podem ser seleccionados e combinados a partir da sequência de consenso e de importação de modo a que seja alcançada a característica do anticorpo desejada, tal como uma maior afinidade para o antígeno ou antígenos alvo. Em geral, os resíduos de CDR estão directamente e muito substancialmente envolvidos na influência sobre a ligação ao antígeno (ver, WO 94/04679 publicado a 3 de Março de 1994).

Os anticorpos monoclonais humanos podem ser produzidos através de uma adaptação do método de hibridoma descrito por

Kohler e Milstein através da utilização de linfócitos B humanos como parceiro de fusão. Linfócitos B humanos produtores de um anticorpo de interesse podem, por exemplo, ser isolados a partir de um indivíduo humano, após obtenção do consentimento informado. Por exemplo, o indivíduo pode estar a produzir anticorpos contra um auto-antígeno tal como ocorre com certos distúrbios tais como lúpus eritematoso sistémico (Shoenfeld *et al.*, *J. Clin. Invest.* 70: 205, 1982), púrpura trombocitopénica mediada pelo sistema imunitário (ITP) (Nugent *et al.*, *Blood* 70(1): 16-22, 1987) ou cancro. Alternativamente ou adicionalmente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Por exemplo, pode-se expor *in vitro* linfócitos do sangue periférico humano isolados a um agente lisotrófico (p. ex., éster L-leucina-O-metílico, éster dimetílico de ácido L-glutâmico ou éster L-leucil-L-leucina-O-metílico) (Patente US N.º 5567610, Borrebaeck *et al.*); e/ou linfócitos do sangue periférico humano sem células T podem ser tratados *in vitro* com adjuvantes tais como 8-mercaptopguanosina e citocinas (Patente US N.º 5229275, Goroff *et al.*).

Os linfócitos B recuperados a partir do sujeito ou imunizados *in vitro* são então geralmente imortalizados para gerar um anticorpo monoclonal humano. As técnicas para imortalização dos linfócitos B incluem, mas não se limitam a: (a) fusão do linfócito B humano com mielomas humanos e de murídeo ou células de heteromieloma de ratinho-humano; (b) transformação viral (p. ex., com um vírus de Epstein-Barr; ver Nugent *et al.*, *supra*, por exemplo); (c) fusão com uma linha celular linfoblastóide; ou (d) fusão com células de linfoma.

Os linfócitos podem ser fundidos com células de mieloma utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e criadas num meio de cultura adequado que contém de preferência uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma não fundidas originais. Por exemplo, se as células de mieloma originais não possuírem a enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina,

aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que previnem o crescimento de células deficientes em HGPRT. Linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma de ratinho-humano adequadas foram descritas (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001, 1984; Brodeur et al., "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). O meio de cultura no qual as células de hibridoma são criadas é ensaiado quanto à produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio. De preferência, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos através de células de hibridoma é determinada através de imunoprecipitação ou através de um ensaio de ligação *in vitro*, tal como um radioensaio (RIA) ou um ensaio imunossorvente enzimático (ELISA).

Após serem identificadas as células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou actividade desejadas, os clones podem ser subclonados através de procedimentos de diluição limitante e criados através de métodos padrão (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascites ou soro através de procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tais como, por exemplo, cromatografia de proteína A, electroforese de gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Anticorpos humanos podem também ser gerados utilizando um hospedeiro não humano, tal como um ratinho, que seja capaz de produzir anticorpos humanos. Tal como observado acima, estão actualmente disponíveis ratinhos transgénicos que são capazes, após imunização, de produzir um repertório inteiro de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulinas endógenas. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de união da cadeia pesada do anticorpo (J_H) em ratinhos quiméricos e mutantes da linha germinal resulta na completa inibição da produção de anticorpos endógenos. A transferência da série de genes humanos de imunoglobulina da linha germinal para tal ratinho mutante da linha germinal resultará na produção de anticorpos

humanos após confronto com o antigénio. Ver, p. ex., Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551, 1993; Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258, 1993; Bruggermann et al., *Year in Immuno.* 7: 33, 1993; Patente US N.º 5591669; Patente US N.º 5589369; e Patente US N.º 5545807. Anticorpos humanos podem também ser preparados utilizando ratinhos SCID-hu (Duchosal et al., *Nature* 355: 258-262, 1992).

Noutra concretização, o anticorpo humano pode ser seleccionado a partir de uma biblioteca de apresentação fágica de anticorpos humanos. A preparação de bibliotecas de anticorpos ou fragmentos destes é bem conhecida na especialidade e pode ser utilizado qualquer um dos métodos conhecidos para construir uma família de vectores de transformação que possam ser introduzidos em células hospedeiras. As bibliotecas de cadeias leves e pesadas de anticorpos em fagos (Huse et al., *Science* 246: 1275, 1989) ou de proteínas de fusão em fagos ou fagemídeos podem ser preparadas de acordo com procedimentos conhecidos. Ver, por exemplo, Vaughan et al., *Nature Biotechnology* 14: 309-314, 1996; Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7978-7982, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, 1991; Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381-388, 1992; Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4457-4461, 1992; Griffiths et al., *EMBO Journal* 13: 3245-3260, 1994; de Kruif et al., *J. Mol. Biol.* 248: 97-105, 1995; WO 98/05344; WO 98/15833; WO 97/47314; WO 97/44491; WO 97/35196; WO 95/34648; Patente US N.º 5712089; Patente US N.º 5702892; Patente US N.º 5427908; Patente US N.º 5403484; Patente US N.º 5432018; Patente US N.º 5270170; WO 92/06176; WO 99/06587; Patente US N.º 5514548; WO 97/08320; e Patente US N.º 5702892. O antigénio de interesse é peneirado contra a biblioteca fágica utilizando procedimentos conhecidos no campo para selecção de anticorpos em fagos que se ligam ao antigénio alvo.

Os anticorpos contra o receptor DR4, tal como aqui descrito, possuirão opcionalmente uma ou mais actividades ou propriedades biológicas desejadas. Tais anticorpos contra DR4 podem incluir mas não se limitam a anticorpos quiméricos, humanizados, humanos e com afinidade madura. Tal como descrito acima, os anticorpos contra DR4 podem ser construídos ou

modificados utilizando várias técnicas para se alcançarem estas actividades ou propriedades desejadas. Numa concretização, o anticorpo contra DR4 terá uma afinidade de ligação ao receptor DR4 de pelo menos 10^5 M^{-1} , de preferência pelo menos no intervalo de 10^6 M^{-1} a 10^7 M^{-1} , de maior preferência, pelo menos no intervalo de 10^8 M^{-1} a 10^{12} M^{-1} e ainda de preferência, pelo menos no intervalo de 10^9 M^{-1} a 10^{12} M^{-1} . A afinidade de ligação do anticorpo contra DR4 pode ser determinada sem demasiada experimentação testando o anticorpo contra DR4 de acordo com técnicas conhecidas na especialidade, incluindo análise Scatchard (ver Munson *et al.*, *supra*) e o ensaio KinExATM (ver Exemplo 9). Opcionalmente, o anticorpo contra DR4 pode ser ensaiado quanto à afinidade de ligação utilizando o ensaio KinExATM descrito no Exemplo 9 e determinando a afinidade de ligação do anticorpo contra DR4 para a construção de receptor DR4-IgG, tal como descrito no Exemplo 9.

Noutra concretização, o anticorpo contra DR4 do presente invento pode ligar-se ao mesmo epítipo em DR4 ao qual se liga Apo-2L, ou ligar-se a um epítipo em DR4 que coincida ou se sobreponha com o epítipo em DR4 ao qual se liga Apo-2L. O anticorpo contra DR4 pode também interagir de modo a criar uma conformação espacial que impeça a ligação do ligando de Apo-2 a DR4. A propriedade de ligação ao epítipo de um anticorpo contra DR4 do presente invento pode ser determinada utilizando técnicas conhecidas na especialidade. Por exemplo, o anticorpo contra DR4 pode ser testado num ensaio *in vitro*, tal como um ensaio de inibição competitiva, para determinar a capacidade do anticorpo contra DR4 para bloquear ou inibir a ligação de Apo-2L a DR4. Opcionalmente, o anticorpo contra DR4 pode ser testado num ensaio de inibição competitiva para determinar a capacidade do anticorpo contra DR4 para inibir a ligação de um polipéptido Apo-2L (tal como descrito no Exemplo 17) a uma construção DR4-IgG (tal como descrito no Exemplo 1) ou a uma célula expressando DR4. Opcionalmente, o anticorpo contra DR4 será capaz de bloquear ou inibir a ligação de Apo-2L a DR4 em pelo menos 50%, de preferência em pelo menos 75% e ainda de preferência em pelo menos 90%, o que pode ser determinado, por exemplo, num ensaio de inibição competitiva *in vitro* utilizando uma forma solúvel de ligando de Apo-2 (TRAIL) e um ECD de DR4-IgG (tal como descrito no Exemplo 1). A propriedade

de ligação ao epítopo de um anticorpo contra DR4 pode também ser determinada utilizando ensaios *in vitro* para testar a capacidade do anticorpo contra DR4 para bloquear a apoptose induzida por Apo-2L. Por exemplo, o anticorpo contra DR4 pode ser testado no ensaio descrito no Exemplo 4 para determinar a capacidade do anticorpo contra DR4 para bloquear a apoptose induzida por Apo-2L em células 9D (ou outras células de cancro expressando o receptor DR4). Opcionalmente, o anticorpo contra DR4 será capaz de bloquear ou inibir a apoptose induzida por Apo-2L num tipo de célula de cancro de mamífero em pelo menos 50%, de preferência em pelo menos 75% e ainda de preferência em pelo menos 90% ou 95%, o que pode ser determinado, por exemplo, num ensaio *in vitro* descrito no Exemplo 4.

Noutra concretização, o anticorpo contra DR4 compreenderá um anticorpo agonista possuindo actividade comparável ao ligando de Apo-2 (TRAIL). De preferência, um tal anticorpo contra DR4 agonista induzirá apoptose em pelo menos num tipo de cancro ou linha celular tumoral ou tumor primário. A actividade apoptótica de um anticorpo contra DR4 agonista pode ser determinada utilizando ensaios *in vitro* ou *in vivo* conhecidos. Exemplos de tais ensaios *in vitro* e *in vivo* estão descritos em pormenor na secção Exemplos abaixo. A actividade apoptótica *in vitro* pode ser determinada utilizando técnicas conhecidas tais como ligação de Anexina V. A actividade apoptótica *in vivo* pode ser determinada, p. ex., através da medição da redução do peso ou volume tumoral.

3. Anticorpos Biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, de preferência humanos ou humanizados, que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois antigénios diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação é para o DR4, a outra é para qualquer outro antigénio e de preferência para uma proteína ou um receptor ou uma subunidade de receptor da superfície celular.

Os métodos para a produção de anticorpos biespecíficos são conhecidos na especialidade. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos baseia-se na co-expressão de dois pares de cadeia pesada/cadeia leve de

imunoglobulina, em que as duas cadeias pesadas têm diferentes especificidades (Milstein e Cuello, *Nature* 305: 537-539, 1983). Devido à combinação aleatória de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma potencial mistura de dez moléculas de anticorpo diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correcta. A purificação da molécula correcta é habitualmente alcançada através de passos de cromatografia de afinidade. São divulgados procedimentos semelhantes em WO 93/08629, publicado a 13 de Maio de 1993 e em Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655-3659, 1991.

Os domínios variáveis do anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação anticorpo-antigénio) podem ser fundidos com sequências dos domínios constantes de imunoglobulina. A fusão é de preferência com um domínio constante da cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões charneira, CH2 e CH3. É preferível ter a primeira região constante da cadeia pesada (CH1) contendo o local necessário para a ligação da cadeia leve presente em pelo menos uma das fusões. Os ADN codificando as fusões da cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, da cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vectores de expressão separados e são co-transfectados para um organismo hospedeiro adequado. Para mais detalhes sobre a criação de anticorpos biespecíficos ver, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121: 210, 1986.

4. Anticorpos Heteroconjugados

Os anticorpos heteroconjugados estão também dentro do âmbito do presente invento. Os anticorpos heteroconjugados são compostos por dois anticorpos covalentemente unidos. Tais anticorpos foram propostos, por exemplo, para direccionar células do sistema imunitário para células indesejadas (Patente U.S. N.º 4676980) e para tratamento de infecção por VIH (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Está contemplado que os anticorpos possam ser preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos na química da síntese proteica, incluindo aqueles envolvendo agentes de ligação cruzada. Por exemplo, podem ser construídas imunotoxinas utilizando uma reacção de permuta de dissulfureto ou através da formação de uma ligação

tioéter. Exemplos de reagentes adequados para este fim incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato e os divulgados, por exemplo, na Patente U.S. N.º 4676980.

5. Triacorpos

Os triacorpos estão também dentro do âmbito do presente invento. Tais anticorpos são descritos por exemplo em Iliades *et al.*, *supra* e Kortt *et al.*, *supra*.

6. Outras Modificações

Estão aqui contempladas outras modificações dos anticorpos contra DR4. Os anticorpos do presente invento podem ser modificados através da conjugação do anticorpo com um agente citotóxico (tal como uma molécula de toxina) ou uma enzima activadora de um pró-fármaco que converta um pró-fármaco (p. ex., um agente quimioterapêutico de peptidilo, ver WO 81/01145) num fármaco anticanceroso activo. Ver, por exemplo, WO 88/07378 e Patente U.S. N.º 4975278. Esta tecnologia é também referida como "Terapia de Pró-Fármacos Mediada por Enzimas Dependente de Anticorpos" (ADEPT).

O componente enzima do imunoconjugado útil para ADEPT inclui qualquer enzima capaz de actuar num pró-fármaco de um modo a convertê-lo na sua forma mais activa, a forma citotóxica. Enzimas que são úteis no método deste invento incluem, mas não se limitam a, fosfatase alcalina útil para a conversão de pró-fármacos contendo fosfato em fármacos livres; arilsulfatase útil para converter pró-fármacos contendo sulfato em fármacos livres; citosina-desaminase útil para converter 5-fluorocitosina não tóxica no fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteases, tais como a protease de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L), que são úteis para converter pró-fármacos contendo péptidos em fármacos livres; caspases tais como caspase-3; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para converter pró-fármacos que contenham substituintes D-aminoácidos; enzimas que clivam hidratos de carbono tais como beta-galactosidase e neuraminidase úteis para converter pró-fármacos glicosilados em fármacos livres; beta-lactamase útil para converter

fármacos derivados com beta-lactamas em fármacos livres; e penicilina-amidases, tais como penicilina V-amidase ou penicilina G-amidase, úteis para converter fármacos derivados nos seus azotos das aminas com grupos fenoxiacetilo ou fenilacetilo, respectivamente, em fármacos livres. Alternativamente, podem ser utilizados anticorpos com actividade enzimática, também conhecidos na especialidade como "abzimas", para converter os pró-fármacos do presente invento em fármacos activos livres (ver, p. ex., Massey, *Nature* 328: 457-458, 1987). Conjugados anticorpo-abzima podem ser preparados tal como aqui descrito para distribuição da abzima a uma população de células tumorais.

As enzimas podem ser covalentemente ligadas aos anticorpos através de técnicas bem conhecidas na especialidade tais como a utilização de reagentes de ligação cruzada heterobifuncionais. Alternativamente, podem ser construídas proteínas de fusão compreendendo pelo menos a região de ligação ao antigénio de um anticorpo do presente invento ligada a pelo menos uma porção funcionalmente activa de uma enzima do presente invento utilizando técnicas de ADN recombinante bem conhecidas na especialidade (ver, p. ex., Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604-608, 1984).

Estão contempladas outras modificações de anticorpos. Por exemplo, o anticorpo pode estar ligado a um de uma variedade de polímeros não proteínáceos, p. ex., polietilenoglicol, polipropilenoglicol, polioxialquilenos ou copolímeros de polietilenoglicol e polipropilenoglicol. O anticorpo pode também estar aprisionado em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou através de polimerização interfacial (por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), em sistemas de distribuição de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16^a edição, Oslo, A., Ed., 1980. Para aumentar a semivida sérica do anticorpo, pode-se incorporar um epítipo de ligação ao receptor de salvação no anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo) tal como descrito na Patente U.S. 5739277, por

exemplo. Tal como aqui se utiliza, o termo "epítopo de ligação ao receptor de salvação" refere-se a um epítopo da região Fc de uma molécula de IgG (p. ex., IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄) que seja responsável pelo aumento da semivida sérica *in vivo* da molécula de IgG.

7. Métodos recombinantes

O presente invento proporciona também ácidos nucleicos isolados codificando anticorpos contra DR4 tal como aqui divulgados, vectores e células hospedeiras compreendendo o ácido nucleico e técnicas recombinantes para a produção do anticorpo.

Para produção recombinante do anticorpo, o ácido nucleico codificando-o é isolado e inserido num vector replicável para mais clonagem (amplificação do ADN) ou para expressão. O ADN codificando o anticorpo é facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (p. ex., através da utilização de sondas oligonucleotídicas que sejam capazes de se ligar especificamente a genes codificando o anticorpo). Estão disponíveis muitos vectores. Os componentes do vector incluem geralmente, mas não se limitam a um ou mais dos seguintes: uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento estimulador, um promotor e uma sequência de terminação da transcrição.

Os métodos daqui incluem métodos para a produção de anticorpos quiméricos ou recombinantes anti-DR4 que compreendem os passos de proporcionar um vector compreendendo uma sequência de ADN codificando uma cadeia leve ou cadeia pesada do anticorpo anti-DR4 (ou uma cadeia leve e uma cadeia pesada), transfecção ou transformação de uma célula hospedeira com o vector e cultura da célula ou células hospedeiras sob condições suficientes para produzir o produto anticorpo anti-DR4 recombinante. Numa concretização, está contemplado que a cadeia leve e/ou a cadeia pesada do anticorpo produzido de forma recombinante pode compreender todos ou parte dos domínios variáveis do anticorpo de murídeo 4H6 aqui divulgado.

i) Componente sequência de sinal

O anticorpo anti-DR4 deste invento pode ser produzido de forma recombinante não apenas directamente, mas também como um polipéptido de fusão com um polipéptido heterólogo, que seja de preferência uma sequência de sinal ou outro polipéptido possuindo um local de clivagem específico no terminal N da proteína ou do polipéptido maduro. A sequência de sinal heteróloga seleccionada é de preferência uma que seja reconhecida e processada (i.e., clivada através de uma peptidase de sinal) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas que não reconhecem e processam a sequência de sinal do anticorpo nativa, a sequência de sinal é substituída por uma sequência de sinal procariótica seleccionada, por exemplo, a partir do grupo dos comandos da fosfatase alcalina, penicilinase, lpp ou endotoxina II termoestável. Para secreção em levedura a sequência de sinal nativa pode ser substituída, p. ex., pelo comando da invertase de levedura, o comando do factor α (incluindo os comandos do factor α de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*) ou o comando da fosfatase ácida, o comando da glucoamilase de *C. albicans* ou a sequência de sinal descrita em WO 90/13646. Na expressão em células de mamífero, estão disponíveis sequências de sinal de mamífero bem como comandos de secreção virais, por exemplo, o sinal gD de herpes *simplex*.

O ADN para tal região precursora é ligado enquadrado com o ADN codificando o anticorpo.

ii) Componente origem de replicação

Tanto os vectores de expressão como de clonagem contêm uma sequência de ácido nucleico que permite que o vector se replique numa ou mais células hospedeiras seleccionadas. Geralmente, nos vectores de clonagem esta sequência é uma que permite que o vector se replique independentemente do ADN cromossómico do hospedeiro e inclui origens de replicação ou sequências de replicação autónoma. Tais sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, leveduras e vírus. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo 2 μ é adequada para levedura e várias origens virais (SV40, políoma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vectores de

clonagem em células de mamífero. Geralmente, a componente origem de replicação não é necessária para vectores de expressão de mamífero (a origem de SV40 pode ser tipicamente utilizada apenas por conter o promotor inicial).

iii) Componente gene de selecção

Os vectores de expressão e de clonagem podem conter um gene de selecção, também designado marcador seleccionável. Os genes de selecção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, p. ex., ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis em meios complexos, p. ex., o gene codificando a D-alanina-racemase para *Bacilli*.

Um exemplo de um esquema de selecção utiliza um fármaco para parar o crescimento de uma célula hospedeira. As células que são sucessivamente transformadas com um gene heterólogo produzem uma proteína conferindo resistência ao fármaco e sobrevivem assim ao regime de selecção. Exemplos de tal selecção dominante utilizam os fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Outros exemplos de marcadores seleccionáveis adequados para células de mamífero são os que permitem a identificação de células competentes para tomarem o ácido nucleico do anticorpo, tais como os genes de DHFR, timidina-quinase, metalotioneína-I e II, de preferência metalotioneína de primata, adenosina-desaminase, ornitina-descarboxilase, etc.

Por exemplo, as células transformadas com o gene de selecção de DHFR são identificadas, primeiro, através da cultura de todos os transformantes num meio de cultura que contenha metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada quando é empregue DHFR de tipo selvagem é a linha celular de ovário de *hamster* chinês (CHO) deficiente em actividade de DHFR.

Alternativamente, células hospedeiras (particularmente hospedeiros de tipo selvagem que contêm DHFR endógena) transformadas ou co-transformadas com sequências de ADN codificando o anticorpo anti-DR4, a proteína DHFR de tipo

selvagem e outro marcador seleccionável tal como aminoglicósido-3'-fosfotransferase (APH) podem ser seleccionadas através do crescimento celular em meio contendo um agente de selecção para o marcador seleccionável tal como um antibiótico aminoglicosídico, p. ex., canamicina, neomicina ou G418. Ver Patente U.S. N.º 4965199.

Um gene de selecção adequado para utilizar em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature* 282: 39, 1979). O gene *trp1* proporciona um marcador de selecção para uma estirpe de levedura mutante sem a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC N.º 44076 ou PEP4-1. Jones, *Genetics* 85: 12, 1977. A presença da lesão *trp1* no genoma da célula hospedeira de levedura proporciona então um ambiente eficaz para detecção da transformação através do crescimento na ausência de triptofano. De modo semelhante, estirpes de levedura deficientes em *Leu2* (ATCC 20622 ou 38626) são complementadas por plasmídeos conhecidos possuindo o gene *Leu2*.

Adicionalmente, vectores derivados de um plasmídeo circular pKD1 de 1,6 μ m podem ser utilizados para transformação de leveduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, foi relatado um sistema de expressão para produção em grande escala de quimosina de vitelo recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology* 8: 135, 1990. Foram também divulgados vectores de expressão de múltiplas cópias para secreção de albumina do soro humano recombinante madura por estirpes industriais de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology* 9: 968-975, 1991.

iv) Componente promotor

Os vectores de expressão e de clonagem contêm habitualmente um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operativamente ligado ao ácido nucleico do anticorpo. Promotores adequados para utilizar com hospedeiros procarióticos incluem o promotor *phoA*, os sistemas promotores da β -lactamase e lactose, da fosfatase alcalina, um sistema promotor do triptofano (*trp*) e promotores híbridos tais como o promotor *tac*. No entanto, outros promotores bacterianos conhecidos são adequados. Os promotores para utilizar em

sistemas bacterianos conterão também uma sequência de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente ligada ao ADN codificando o anticorpo anti-DR4.

São conhecidas sequências promotoras para eucariotas. Virtualmente todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT situada aproximadamente 25 a 30 bases a montante do local onde se inicia a transcrição. Outra sequência verificada 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT em que N pode ser qualquer nucleótido. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucarióticos está uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para adição da cauda poli-A à extremidade 3' da sequência de codificação. Todas estas sequências são adequadamente inseridas em vectores de expressão eucariótica.

Exemplos de sequências promotoras adequadas para utilizar com hospedeiros de levedura incluem os promotores para a 3-fosfoglicerato-quinase ou outras enzimas glicolíticas, tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, hexoquinase, piruvato-descarboxilase, fosfofrutoquinase, glucose-6-fosfato-isomerase, 3-fosfoglicerato-mutase, piruvato-quinase, triosefosfato-isomerase, fosfoglucose-isomerase e glucoquinase.

Outros promotores de levedura, que são promotores indutíveis possuindo a vantagem adicional de transcrição controlada através das condições de crescimento, são as regiões promotoras para a álcool-desidrogenase 2, o isocitocromo C, a fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas ao metabolismo do azoto, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização da maltose e galactose. Os vectores e promotores adequados para utilizar em expressão em levedura são ainda descritos em EP 73657. Estimuladores de levedura são também vantajosamente utilizados com promotores de levedura.

A transcrição do anticorpo anti-DR4 a partir de vectores em células hospedeiras de mamífero é controlada por exemplo, através de promotores obtidos de genomas de vírus tais como vírus de polioma, vírus da varíola aviária, adenovírus (tais como Adenovírus 2), vírus de papiloma bovino, vírus de sarcoma

aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e de preferência Vírus Símio 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamífero, p. ex., o promotor da actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, desde que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

Os promotores inicial e tardio do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição de SV40 que contém também a origem de replicação viral de SV40. O promotor inicial imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição *HindIII* E. Um sistema para expressar ADN em hospedeiros mamíferos utilizando o vírus de papiloma bovino como vector é divulgado na Patente U.S. N.º 4419446. Uma modificação deste sistema é descrita na Patente U.S. N.º 4601978. Ver também Reyes *et al.*, *Nature* 297: 598-601, 1982 sobre a expressão de um ADNc de β -interferão humano em células de ratinho sob o controlo de um promotor de timidina-quinase do vírus herpes *simplex*. Alternativamente, pode ser utilizada como promotor a repetição terminal longa do vírus do sarcoma de Rous.

v) *Componente elemento estimulador*

A transcrição de um ADN codificando o anticorpo anti-DR4 deste invento por eucariotas superiores é frequentemente aumentada através da inserção de uma sequência estimuladora no vector. São conhecidas muitas sequências estimuladoras de genes de mamífero (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina). Tipicamente, no entanto, utilizar-se-á um estimulador de um vírus de células eucarióticas. Exemplos incluem o estimulador de SV40 no lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o estimulador do promotor inicial de citomegalovírus, o estimulador de políoma no lado tardio da origem de replicação e estimuladores de adenovírus. Ver também Yaniv, *Nature* 297: 17-18, 1982 sobre elementos estimuladores para activação de promotores eucarióticos. O estimulador pode ser ligado ao vector numa posição a 5' ou 3' da sequência de codificação do anticorpo, mas de preferência situa-se num local a 5' do promotor.

vi) Componente de terminação da transcrição

Os vectores de expressão utilizados em células eucarióticas (células de levedura, fungos, insecto, plantas, animais, humanos ou nucleadas de outros organismos multicelulares) conterão também sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilização do ARNm. Tais sequências estão vulgarmente disponíveis nas regiões não traduzidas a 5' e, ocasionalmente a 3' de ADN ou ADNc eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do ARNm codificando o anticorpo multivalente. Um componente de terminação da transcrição útil é a região de poliadenilação da hormona do crescimento bovina. Ver WO 94/11026 e o vector de expressão aqui divulgado.

vii) Selecção e transformação de células hospedeiras

As células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão do ADN nos vectores daqui são as células de procariotas, de levedura ou de eucariotas superiores aqui descritas. Procariotas adequados para este fim incluem eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, *Enterobacteriaceae* tais como *Escherichia*, p. ex., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p. ex., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p. ex., *Serratia marcescans* e *Shigella*, bem como *Bacilli* tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (p. ex., *B. licheniformis* 41P divulgado em DD 266710 publicada a 12 de Abril de 1989), *Pseudomonas* tais como *P. Aeruginosa*, e *Streptomyces*. Um hospedeiro de clonagem de *E. coli* preferido é *E. coli* 294 (ATCC 31446), embora outras estirpes tais como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31537) e *E. coli* W3110 (ATCC 27325) sejam adequadas. Estes exemplos são ilustrativos em vez de limitantes.

Para além dos procariotas, micróbios eucarióticos tais como fungos filamentosos ou leveduras são hospedeiros de clonagem ou expressão adequados para vectores codificando anticorpo contra DR4. *Saccharomyces cerevisiae* ou a vulgar levedura de padeiro, é o mais vulgarmente utilizado de entre os microrganismos hospedeiros eucarióticos inferiores. No

entanto, vários outros géneros, espécies e estirpes estão vulgarmente disponíveis e são úteis aqui, tais como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedeiros de *Kluyveromyces* tais como, p. ex., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* e *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tais como *Schwanniomyces occidentalis*; e fungos filamentosos tais como, p. ex., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* e *Aspergillus* tais como *A. nidulans* e *A. niger*.

As células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpos glicosilados são derivadas de organismos multicelulares. Exemplos de células de invertebrado incluem células vegetais e de insecto. Foram identificadas numerosas estirpes de baculovírus e variantes e células hospedeiras de insecto permissivas correspondentes tais como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e *Bombyx mori*. Uma variedade de estirpes virais para transfecção está publicamente disponível, p. ex., a variante L-1 de NPV de *Autographa californica* e a estirpe Bm-5 de NPV de *Bombyx mori* e tais vírus podem ser utilizados como o vírus daqui de acordo com o presente invento, particularmente para transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

Podem também ser utilizadas como hospedeiros culturas de células vegetais de algodão, milho, batata, soja, petúnia, tomate e tabaco.

No entanto, o interesse tem sido maior em células de vertebrado e a propagação de células de vertebrado em cultura (cultura de tecidos) tornou-se um procedimento de rotina. Exemplos de linhas celulares hospedeiras de mamífero úteis são a linha de rim de macaco CV1 transformada através de SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); a linha de rim embrionário humano (293 ou células 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36: 59, 1977); células de rim de hamster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 77: 4216, 1980); células de Sertoli de ratinho (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251, 1980); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato-búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; uma linha de hepatoma humano (Hep C2); e células de mieloma ou linfoma (p. ex., células Y0, J558L, P3 e NS0) (ver Patente US N.º 5807715).

As células hospedeiras são transformadas com os vectores de expressão ou clonagem acima descritos para produção de anticorpos e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para indução de promotores, selecção de transformantes ou amplificação dos genes codificando as sequências desejadas.

viii) Cultura das células hospedeiras

As células hospedeiras utilizadas para produzir o anticorpo deste invento podem ser cultivadas numa variedade meios. Meios comercialmente disponíveis tais como meio F10 de Ham (Sigma), Meio Essencial Mínimo (MEM, (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) e Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) são adequados para cultura das células hospedeiras. Adicionalmente, qualquer um dos meios descritos em Ham et al., *Meth. Enz.* 58: 44, 1979; Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255, 1980; Pat. U.S. N^{os} 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; ou 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; ou Patente U.S. Re. 30985 pode ser utilizado como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormonas e/ou outros factores de crescimento (tais como insulina, transferrina ou factor de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleótidos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como o fármaco GENTAMYCINTM), elementos vestigiais (definidos como compostos inorgânicos habitualmente presentes

em concentrações finais no intervalo micromolar) e glicose ou uma fonte energética equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos nas concentrações apropriadas que serão conhecidas dos peritos na especialidade. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e semelhantes, são as anteriormente utilizadas com a célula hospedeira seleccionada para expressão e serão aparentes aos vulgares peritos na especialidade.

ix) Purificação

Quando se utilizam técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplasmático, ou directamente segregado para o meio. Se o anticorpo for produzido intracelularmente, como primeiro passo, são removidos os restos particulados, sejam células hospedeiras ou fragmentos lisados, por exemplo, através de centrifugação ou ultrafiltração. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167, 1992 descrevem um procedimento para isolamento de anticorpos que são segregados para o espaço periplasmático de *E. coli*. Resumidamente, a pasta celular é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) durante cerca de 30 minutos. Os restos celulares podem ser removidos através de centrifugação. Quando o anticorpo é segregado para o meio, os sobrenadantes de tais sistemas de expressão são geralmente, primeiro, concentrados utilizando um filtro de concentração de proteínas comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de proteases tal como PMSF pode ser incluído em qualquer um dos passos antecedentes para inibir a proteólise e podem ser incluídos antibióticos para prevenir o crescimento de contaminantes acidentais.

A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada utilizando, por exemplo, cromatografia de hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise e cromatografia de afinidade, sendo a cromatografia de afinidade a técnica de purificação preferida. A adequabilidade da proteína A como ligando de afinidade depende da espécie e do isotipo de qualquer região Fc de imunoglobulina que esteja presente no anticorpo. A proteína A pode ser utilizada para purificar

anticorpos que se baseiem nas cadeias pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ ou $\gamma 4$ (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13, 1983). A proteína G é recomendada para todos os isotipos de ratinho e para a $\gamma 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.* 5: 1567-1575, 1986). A matriz à qual o ligando de afinidade é ligado é muito frequentemente agarose, mas estão disponíveis outras matrizes. Matrizes mecanicamente estáveis tais como vidro de poro controlado ou poli(estirenodivinil)benzeno permitem caudais mais rápidos e tempos de processamento mais curtos dos que podem ser alcançados com agarose. Quando o anticorpo compreende um domínio C_H3 , é útil para purificação a resina Bakerbond ABXTM (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Outras técnicas para purificação de proteínas tais como o fraccionamento numa coluna de permuta iónica, precipitação em etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina, cromatografia de SEPHAROSETM numa resina de permuta aniónica ou catiónica (tal como uma coluna de poli(ácido aspártico)), cromatofocagem, SDS-PAGE e precipitação em sulfato de amónio estão também disponíveis, dependendo do anticorpo a recuperar.

B. Utilizações para Anticorpos contra DR4

Os anticorpos contra DR4 do presente invento têm várias utilidades. Por exemplo, os anticorpos agonistas de DR4 podem ser empregues em utilizações médicas para tratamento de condições patológicas em mamíferos tais como cancro ou doenças relacionadas com o sistema imunitário. Nas utilizações médicas, o anticorpo contra DR4, de preferência um anticorpo agonista, é administrado a um mamífero, sozinho ou ainda em combinação com outros agentes ou técnicas terapêuticos.

O diagnóstico em mamíferos das várias condições patológicas aqui descritas pode ser feito pelo médico assistente. Estão disponíveis na especialidade técnicas de diagnóstico que permitem, p. ex., o diagnóstico ou a detecção de cancro ou de doenças relacionadas com o sistema imunitário num mamífero. Por exemplo, os cancros podem ser identificados através de técnicas incluindo, mas não se limitando a, apalpação, análises sanguíneas, raios X, RMN e semelhantes. As doenças relacionadas com o sistema imunitário podem também ser facilmente identificadas. Em lúpus sistémico eritematoso, o mediador central da doença é a produção de anticorpos auto-

reactivos para proteínas/tecidos próprios e a subsequente criação de inflamação mediada pelo sistema imunitário. Múltiplos órgãos e sistemas são clinicamente afectados incluindo o rim, pulmão, sistema músculo-esquelético, mucocutâneo, olho, sistema nervoso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, medula óssea e sangue.

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória auto-imune sistémica crónica que envolve principalmente a membrana sinovial de múltiplas articulações com resultante lesão da cartilagem articular. A patogénese é dependente de linfócitos T e está associada à produção de factores reumatóides, auto-anticorpos dirigidos contra IgG próprias, com a resultante formação de complexos imunitários que alcançam níveis elevados no fluido articular e no sangue. Estes complexos na articulação podem induzir o infiltrado marcado de linfócitos e monócitos na sinóvia e subseqüentes alterações sinoviais marcadas; o espaço/fluido articular é infiltrado por células semelhantes com a adição de numerosos neutrófilos. Os tecidos afectados são principalmente as articulações, frequentemente num padrão simétrico. No entanto, doença extra-articular ocorre também em duas formas principais. Uma forma é o desenvolvimento de lesões extra-articulares com o surgimento de doença articular progressiva e lesões típicas de fibrose pulmonar, vasculite e úlceras cutâneas. A segunda forma de doença extra-articular é a designada síndrome de Felty que ocorre tardiamente no curso da doença AR, por vezes após a doença articular se tornar quiescente e envolve a presença de neutropenia, trombocitopenia e esplenomegalia. Isto pode ser acompanhado de vasculite em múltiplos órgãos com formação de enfartes, úlceras da pele e gangrena. Os pacientes desenvolvem também frequentemente nódulos reumatóides no tecido subcutâneo subjacente às articulações afectadas; os nódulos em estado tardio têm centros necróticos rodeados de um infiltrado celular inflamatório misto. Outras manifestações que podem ocorrer em AR incluem: pericardite, pleurite, artrite coronária, pneumonite intersticial com fibrose pulmonar, queratoconjuntivite seca e nódulos reumatóides.

A artrite reumatóide juvenil é uma doença inflamatória idiopática crónica que se inicia frequentemente antes dos 16 anos de idade. O seu fenótipo tem algumas semelhanças com a AR; alguns pacientes que são positivos para factores reumatóides são classificados como artrite reumatóide juvenil. A doença é subclassificada em três categorias principais: pauciarticular, poliarticular e sistémica. A artrite pode ser grave e é tipicamente destrutiva e conduz a ancilose articular e atraso do crescimento. Outras manifestações podem incluir uveíte anterior crónica e amiloidose sistémica.

As espondiloartropatias são um grupo de distúrbios com algumas características clínicas comuns e a associação comum com a expressão do produto do gene HLA-B27. Os distúrbios incluem: espondilite anquilosante, síndrome de Reiter (artrite reactiva), artrite associada a doença inflamatória dos intestinos, espondilite associada a psoríase, espondiloartropatia de surgimento juvenil e espondiloartropatia indiferenciada. Características distintivas incluem sacroileíte com ou sem espondilite; artrite assimétrica inflamatória; associação com HLA-B27 (um alelo serologicamente definido do locus de HLA-B de MHC de classe I); inflamação ocular e ausência de auto-anticorpos associados a outra doença reumatóide. A célula mais implicada como chave para a indução da doença é o linfócito T CD8+, uma célula que se direcciona ao antigénio apresentado por moléculas de MHC de classe I. As células T CD8+ podem reagir contra o alelo HLA-B27 de MHC de classe I como se fosse um péptido estranho expresso por moléculas de MHC de classe I. Foi posta a hipótese de um epítipo de HLA-B27 poder imitar um epítipo antigénico bacteriano ou de outros micróbios e induzir assim uma resposta de células T CD8+.

A esclerose sistémica (esclerodermia) tem uma etiologia desconhecida. Uma característica da doença é o endurecimento da pele; provavelmente esta é induzida por um processo inflamatório activo. A esclerodermia pode ser localizada ou sistémica; as lesões vasculares são comuns e os danos nas células endoteliais na microvasculatura é um acontecimento inicial e importante no desenvolvimento de esclerose sistémica; os danos vasculares podem ser mediados pelo sistema imunitário. Uma base imunológica está implicada através da

presença de infiltrados celulares mononucleares nas lesões cutâneas e da presença de anticorpos anti-nucleares em muitos pacientes. ICAM-1 está frequentemente supra-regulado à superfície celular dos fibroblastos em lesões da pele sugerindo que a interacção de células T com estas células pode ter um papel na patogénese da doença. Outros órgãos envolvidos incluem: o tracto gastrointestinal: atrofia do músculo liso e fibrose resultante em peristalse/motilidade anormal; rim: proliferação íntima subendotelial concêntrica afectando as artérias arqueadas e interlobulares pequenas com resultante fluxo sanguíneo cortical renal reduzido, resulta em proteinúria, azotemia e hipertensão; músculo-esquelético: atrofia, fibrose intersticial; inflamação; pulmão: pneumonite intersticial e fibrose intersticial; e coração: necrose da banda de contracção, cicatrização/fibrose.

Miopatias inflamatórias idiopáticas incluindo dermatomiosite, polimiosite e outras são distúrbios de inflamação crónica dos músculos de etiologia desconhecida resultando em fraqueza muscular. A lesão/inflamação muscular é frequentemente simétrica e progressiva. Auto-anticorpos estão associados à maioria das formas. Estes auto-anticorpos específicos de miosite são dirigidos contra e inibem a função de componentes, proteínas e ARN, envolvidos na síntese proteica.

A síndrome de Sjogren é devida a inflamação mediada pelo sistema imunitário e subsequente destruição funcional das glândulas lacrimais e das glândulas salivares. A doença pode estar associada ou ser acompanhada de doenças inflamatórias do tecido conjuntivo. A doença está associada à produção de auto-anticorpos contra os antígenos Ro e La, os quais são ambos pequenos complexos de ARN-proteína. As lesões resultam em queratoconjuntivite seca, xerostomia, com outras manifestações ou associações incluindo cirrose biliar, neuropatia periférica ou sensorial e púrpura palpável.

A vasculite sistémica é uma doença na qual a lesão principal é inflamação e subsequente lesão dos vasos sanguíneos que resulta em isquemia/necrose/degeneração dos tecidos fornecidos pelos vasos afectados e eventual disfunção do órgão final nalguns casos. Também pode ocorrer vasculitide

como lesão secundária ou sequela a outras doenças inflamatórias mediadas pelo sistema imunitário tais como artrite reumatóide, esclerose sistémica, etc., particularmente em doenças também associadas com a formação de complexos imunitários. Doenças no grupo da vasculite sistémica primária incluem: vasculite necrotizante sistémica: poliarterite nodosa, angiite alérgica e granulomatose, poliangiite; granulomatose de Wegener; granulomatose linfomatóide; e arterite de células gigantes. A vasculitide variada inclui: síndrome de nódulos linfáticos mucocutâneos (MLNS ou doença de Kawasaki), vasculite do SNC isolada, doença de Behet, tromboangiite obliterante (doença de Buerger) e venulite necrotizante cutânea. Crê-se que o mecanismo patogénico da maioria dos tipos de vasculite listados seja principalmente devido a deposição de complexos de imunoglobulina na parede dos vasos e a subsequente indução de uma resposta inflamatória através de ADCC, activação do complemento ou ambos.

A sarcoidose é uma condição de etiologia desconhecida que se caracteriza pela presença de granulomas epitelióides em quase todos os tecidos do corpo; o envolvimento do pulmão é muito frequente. A patogénese envolve a persistência de macrófagos activados e células linfóides nos locais da doença com subseqüentes sequelas crónicas resultantes da libertação de produtos localmente e sistemicamente activos libertados por estes tipos celulares.

A anemia hemolítica auto-imune incluindo anemia hemolítica auto-imune, pancitopenia imunitária e hemoglobínúria paroxística nocturna é um resultado da produção de anticorpos que reagem com antigénios expressos à superfície dos glóbulos vermelhos (e nalguns casos outras células sanguíneas incluindo também plaquetas) e é um reflexo da remoção daquelas células revestidas de anticorpos através de lise mediada pelo complemento e/ou mecanismos mediados por ADCC/receptor de Fc.

Em trombocitopenia auto-imune incluindo trombocitopenia púrpura e trombocitopenia mediada pelo sistema imunitário noutros quadros clínicos, a destruição/remoção de plaquetas ocorre em resultado da ligação do anticorpo ou complemento a

plaquetas e da subsequente remoção por lise do complemento, ADCC ou mecanismos mediados por receptor de Fc.

A tiroidite, incluindo doença de Grave, tiroidite de Hashimoto, tiroidite linfocítica juvenil e tiroidite atrófica são o resultado de uma resposta auto-imune contra antígenos da tiróide com produção de anticorpos que reagem com proteínas e frequentemente específicas para a glândula tiróide. Existem modelos experimentais incluindo modelos espontâneos: ratos (ratos BUF e BB) e galinhas (estirpe de galinhas obesas); modelos indutíveis: imunização de animais com tiroglobulina ou antígeno microssómico da tiróide (peroxidase da tiróide).

A diabetes *mellitus* de tipo I ou diabetes dependente de insulina é a destruição auto-imune das células β dos ilhéus pancreáticos; esta destruição é mediada por auto-anticorpos e células T autorreactivas. Os anticorpos para a insulina ou o receptor da insulina podem também produzir o fenótipo de incapacidade de resposta à insulina.

Doenças renais mediadas pelo sistema imunitário, incluindo glomerulonefrite e nefrite túbulo-intersticial, são o resultado de lesões mediadas por anticorpos ou linfócitos T no tecido renal directamente como resultado da produção de anticorpos autorreactivos ou de células T contra antígenos renais ou indirectamente como resultado da deposição de anticorpos e/ou complexos imunitários no rim que são reactivos contra outros antígenos não renais. Assim, outras doenças mediadas pelo sistema imunitário que resultem na formação de complexos imunitários podem também induzir doença renal mediada pelo sistema imunitário como sequela indirecta. Tanto mecanismos imunitários directos como indirectos resultam em resposta inflamatória que produz/induz o desenvolvimento de lesões em tecidos renais com o resultante impedimento da função do órgão e nalguns casos progressão para insuficiência renal. Tanto mecanismos imunitários humorais como celulares podem estar envolvidos na patogénese das lesões.

Crê-se que as doenças desmielinizantes dos sistemas nervosos central e periférico, incluindo Esclerose Múltipla; polineuropatia desmielinizante idiopática ou síndrome de Guillain-Barré; e Polineuropatia Desmielinizante Inflamatória

Crónica, têm uma base auto-imune e resultam em desmielinização dos nervos em resultado de danos causados a oligodendrócitos ou directamente à mielina. Em EM existem evidências que sugerem que a indução e a progressão da doença são dependentes de linfócitos T. A Esclerose Múltipla é uma doença desmielinizante que é dependente de linfócitos T e que tem um curso de relapso-remissão ou um curso crónico progressivo. A etiologia é desconhecida; no entanto, infecções virais, predisposição genética, ambiente e auto-imunidade contribuem todas. As lesões contêm infiltrados predominantemente de células da microglia, mediadas por linfócitos T e macrófagos infiltrantes; os linfócitos T CD4+ são o tipo celular predominante nas lesões. O mecanismo de morte celular dos oligodendrócitos e a subsequente desmielinização não é conhecido mas é provavelmente dirigido por linfócitos T.

Doença Inflamatória e Fibrótica do Pulmão, incluindo Pneumonias Eosinofílicas; Fibrose Pulmonar Idiopática e Pneumonite de Hipersensibilidade podem envolver uma resposta imunitária-inflamatória desregulada. A inibição dessa resposta terá benefício terapêutico.

Doença de Pele Auto-imune ou Mediada pelo Sistema Imunitário incluindo Doenças de Pele Vesiculares, Eritema Multiforme e Dermatite de Contacto são mediadas por auto-anticorpos, cuja génese é dependente de linfócitos T.

A psoríase é uma doença inflamatória mediada por linfócitos T. As lesões contêm infiltrados de linfócitos T, macrófagos e células de processamento do antígeno e alguns neutrófilos.

As doenças alérgicas, incluindo asma; rinite alérgica; dermatite atópica; hipersensibilidade alimentar; e urticária são dependentes de linfócitos T. Estas doenças são predominantemente mediadas por inflamação induzida por linfócitos T, inflamação mediada por IgE ou uma combinação de ambos.

As doenças associadas a transplantação, incluindo rejeição de Enxertos e Doença de Enxerto-versus-Hospedeiro

(GVHD) são dependentes de linfócitos T; a inibição da função dos linfócitos T é melhoradora.

Outras doenças nas quais a intervenção da resposta imunitária e/ou inflamatória tem benefício são doença Infecciosa incluindo mas não se limitando a infecção viral (incluindo mas não se limitando a SIDA, hepatite A, B, C, D, E), infecção bacteriana, infecções fúngicas e infecções protozoárias e parasitárias (moléculas (ou derivados/agonistas) que estimulam a MLR podem ser utilizadas terapêuticamente para aumentar a resposta imunitária a agentes infecciosos), doenças de imunodeficiência ((moléculas/derivados/agonistas) que estimulem a MLR podem ser utilizadas terapêuticamente para aumentar a resposta imunitária para condições herdadas, adquiridas, induzidas por infecções (tal como na infecção por VIH) ou imunodeficiência iatrogénica (i.e., tal como de quimioterapia)) e neoplasia.

O anticorpo é de preferência administrado ao mamífero num transportador; de preferência um transportador farmacêuticamente aceitável. Transportadores adequados e suas formulações são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16^a ed., 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo *et al.* Tipicamente, é utilizada uma quantidade apropriada de um sal farmacêuticamente aceitável na formulação para tornar a formulação isotónica. Exemplos de um transportador incluem solução salina, solução de Ringer e solução de dextrose. O pH da solução é de preferência de cerca de 5 a cerca de 8, e de maior preferência de cerca de 7 a cerca de 7,5. Mais transportadores incluem preparações de libertação sustida tais como matrizes semipermeáveis de polímeros hidrófobos sólidos contendo o anticorpo, cujas matrizes estão na forma de artigos moldados, p. ex., películas, lipossomas ou micropartículas. Será aparente para os peritos na especialidade que certos transportadores podem ser preferíveis dependendo, por exemplo, da via de administração e da concentração do anticorpo a administrar.

O anticorpo pode ser administrado ao mamífero através de injeção (p. ex., intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, intraportal), ou através de outros métodos tais como infusão que assegurem a sua distribuição à corrente

sanguínea numa forma eficaz. O anticorpo pode também ser administrado através de técnicas de perfusão isoladas, tais como perfusão de tecidos isolados, para exercer efeitos terapêuticos locais. É preferida a injeção local ou intravenosa.

As dosagens e os programas eficazes para administração do anticorpo podem ser determinados empiricamente e fazer tais determinações está dentro dos conhecimentos na especialidade. Os peritos na especialidade compreenderão que a dosagem de anticorpo que tem de ser administrada variará dependendo, por exemplo, do mamífero que receberá o anticorpo, da via de administração, do tipo particular de anticorpo utilizado e de outros fármacos a administrar ao mamífero. Orientações sobre a selecção das doses apropriadas para o anticorpo encontram-se na literatura sobre utilizações terapêuticas de anticorpos, p. ex., "Handbook of Monoclonal Antibodies", Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., 1985, cap. 22 e págs. 303-357; Smith et al., "Antibodies in Human Diagnosis and Therapy", Haber et al., eds., Raven Press, New York, 1977, págs. 365-389. Uma dose diária típica do anticorpo utilizado sozinho pode variar de cerca de 1 µg/kg a até 100 mg/kg de peso corporal ou mais por dia, dependendo dos factores mencionados acima.

O anticorpo pode também ser administrado ao mamífero em combinação com quantidades eficazes de um ou mais outros agentes terapêuticos. O outro ou outros agentes terapêuticos ou terapias podem incluir, mas não se limitam a, quimioterapia (agentes quimioterapêuticos), terapia de radiação, imunoadjuvantes, agente inibidores do crescimento, agentes citotóxicos e citocinas. Outros agentes que se saiba induzirem apoptose em células de mamífero podem também ser empregues e tais agentes incluem TNF-alfa, TNF-beta, ligando de CD30, ligando de 4-1BB e ligando de Apo-2, bem como outros anticorpos que possam induzir apoptose. A outra ou outras terapias podem incluir anticorpos terapêuticos (para além do anticorpo contra DR4) e tais anticorpos podem incluir anticorpos anti-receptor Her (tais como HerceptinTM), anticorpos anti-VEGF e anticorpos contra outros receptores para o ligando de Apo-2, tais como anticorpos anti-Apo-2 (DR5).

As quimioterapias contempladas pelo presente invento incluem substâncias químicas ou fármacos que se conhecem na especialidade e estão comercialmente disponíveis, tais como Doxorubicina, 5-Fluorouracilo, etoposido, camptotecina, Leucovorina, arabinósido de Citosina, Ciclofosfamida, Tiotepa, Bussulfano, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatina, Melfalano, Vinblastina e Carboplatina. A preparação e os programas de dosagem para tal quimioterapia podem ser utilizados de acordo com as instruções do fabricante ou conforme determinado empiricamente pelo perito praticante. A preparação e os programas de dosagem para tal quimioterapia estão também descritos em *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992.

A quimioterapia é de preferência administrada num transportador farmacêuticamente aceitável, tal como os descritos acima. O modo de administração da quimioterapia pode ser o mesmo empregue para o anticorpo contra DR4 ou pode ser administrada ao mamífero através de um modo diferente. Por exemplo, o anticorpo contra DR4 pode ser injectado enquanto a quimioterapia é administrada oralmente ao mamífero.

A terapia de radiação pode ser administrada ao mamífero de acordo com protocolos vulgarmente empregues na especialidade e conhecidos dos peritos na especialidade. Tal terapia pode incluir radiação de cézio, irídio, iodo ou cobalto. A terapia de radiação pode ser irradiação do corpo todo ou pode ser dirigida localmente a um local ou tecido específico dentro ou sobre o corpo. Tipicamente, a terapia de radiação é administrada em pulsos ao longo de um período de tempo de cerca de 1 a cerca de 2 semanas. A terapia de radiação pode, no entanto, ser administrada ao longo de períodos de tempo mais longos. Opcionalmente, a terapia de radiação pode ser administrada numa dose única ou em múltiplas doses sequenciais.

O anticorpo pode ser administrado sequencialmente ou simultaneamente com um ou mais outros agentes terapêuticos. As quantidades de anticorpo e de agente terapêutico dependem, por exemplo, do tipo de fármacos que é utilizado, da condição patológica a tratar e do programa e vias de administração mas

serão geralmente inferiores do que seriam se cada um fosse utilizado individualmente.

Após a administração do anticorpo ao mamífero, a condição fisiológica do mamífero pode ser monitorizada de vários modos bem conhecidos do perito praticante.

Está contemplado que os anticorpos contra DR4 antagonistas ou bloqueadores possam também ser utilizados em terapia. Por exemplo, um anticorpo contra DR4 pode ser administrado a um mamífero (tal como descrito acima) para bloquear a ligação do receptor DR4 a Apo-2L, aumentando assim a biodisponibilidade do Apo2-L administrado durante terapia de Apo2-L para induzir apoptose em cancro de cancro.

Os efeitos terapêuticos dos anticorpos contra DR4 do presente invento podem ser examinados em ensaios *in vitro* e utilizando modelos animais *in vivo*. Pode ser utilizada uma variedade de modelos animais bem conhecidos para melhor compreender o papel dos anticorpos contra DR4 aqui identificados no desenvolvimento e na patogénese por exemplo de doença relacionada com o sistema imunitário ou cancro e para testar a eficácia dos agentes terapêuticos candidatos. A natureza *in vivo* de tais modelos torna-os particularmente preditivos de respostas em pacientes humanos. Modelos animais de doenças relacionadas com o sistema imunitário incluem animais não recombinantes e recombinantes (transgénicos). Modelos animais não recombinantes incluem, por exemplo, roedores, p. ex., modelos de murídeo. Tais modelos podem ser gerados através da introdução de células em ratinhos singénicos utilizando técnicas padrão, p. ex. injeção subcutânea, injeção na veia caudal, implantação no baço, implantação intraperitoneal, implantação sob a cápsula renal.

São conhecidos modelos animais, por exemplo, para a doença de enxerto-versus-hospedeiro. A doença de enxerto-versus-hospedeiro ocorre quando células imunocompetentes são transplantadas para pacientes imunossuprimidos ou tolerantes. As células do dador reconhecem e respondem a antigénios do hospedeiro. A resposta pode variar de inflamação grave com perigo de vida a casos suaves de diarreia e perda de peso. Os modelos da doença de enxerto-versus-hospedeiro proporcionam um

meio de avaliação da reactividade das células T contra antigénios de MHC e antigénios menores de transplante. Um procedimento adequado é descrito em detalhe em "Current Protocols in Immunology", unidade 4.3.

Um modelo animal para rejeição de aloenxerto de pele é um meio de testar a capacidade das células T para mediar a destruição de tecidos *in vivo* que é indicadora e uma medida do seu papel em imunidade antiviral e tumoral. Os modelos mais comuns e aceites utilizam enxertos de pele da cauda de murídeo. Experiências repetidas mostraram que a rejeição de um aloenxerto de pele é mediada por células T, células T ajudantes e células T assassinas-efectoras e não por anticorpos (Auchincloss, H. Jr. e Sachs, D.H., "Fundamental Immunology", 2ª ed., W.E. Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992). Um procedimento adequado é descrito em detalhe em "Current Protocols in Immunology", unidade 4.4. Outros modelos de rejeição de transplantes que podem ser utilizados para testar as composições do presente invento são os modelos de transplante de coração alogénicos descritos por Tanabe, M. *et al.*, *Transplantation* 58: 23, 1994 e Tinubu, S.A. *et al.*, *J. Immunol.* 4330-4338, 1994.

Os modelos animais para hipersensibilidade de tipo retardado também proporcionam um ensaio da função imunitária mediada por células. As reacções de hipersensibilidade de tipo retardado são uma resposta imunitária *in vivo* mediada por células T caracterizada por inflamação que não alcança um pico até ter passado um período desde o confronto com um antigénio. Estas reacções ocorrem também em doenças auto-imunes específicas de tecidos tais como esclerose múltipla (EM) e encefalomielite auto-imune experimental (EAE, um modelo para EM). Um procedimento adequado está descrito em detalhe em "Current Protocols in Immunology", unidade 4.5.

Um modelo animal para artrite é artrite induzida por colagénio. Este modelo partilha características clínicas, histológicas e imunológicas de artrite reumatóide auto-imune humana e é um modelo aceitável para artrite reumatóide humana. Os modelos de ratinho e rato são caracterizados por sinovite, erosão da cartilagem e osso subcondral. Os anticorpos contra DR4 do presente invento podem ser testados quanto à actividade

contra artrite auto-imune utilizando os protocolos descritos em "Current Protocols in Immunology", acima, unidade 15.5. Ver também o modelo utilizando um anticorpo monoclonal para CD18 e integrinas VLA-4 descrito em Issekutz, A.C. *et al.*, *Immunology* 88: 569, 1996.

Foi descrito um modelo de asma no qual hiper-reactividade das vias aéreas induzida por antigénio, eosinofilia pulmonar e inflamação são induzidas através da sensibilização do animal com ovalbumina e depois confronto do animal com a mesma proteína distribuída por aerossol. Vários modelos animais (cobaia, rato, primata não humano) mostram sintomas semelhantes a asma atópica em humanos após confronto com antigénios em aerossol. Os modelos de murídeo têm muitas das características da asma humana. Procedimentos adequados para testar as composições do presente invento quanto à actividade e eficácia no tratamento de asma são descritos por Wolyniec, W.W. *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18: 777, 1998 e as referências aí citadas.

Adicionalmente, os anticorpos contra DR4 do presente invento podem ser testados em modelos animais para doenças semelhantes a psoríase. Os anticorpos contra DR4 do presente invento podem ser testados no modelo de ratinho scid/scid descrito por Schon, M.P. *et al.*, *Nat. Med.* 3: 183, 1997, no qual os ratinhos demonstram lesões histopatológicas na pele que se assemelham a psoríase. Outro modelo adequado é a quimera de pele humana/ratinho scid preparada tal como descrito por Nickoloff, B.J. *et al.*, *Am. J. Path.* 146: 580, 1995.

Vários modelos animais são bem conhecidos para testar a actividade anticancerosa de uma composição terapêutica candidata. Estes incluem xenoenxertos tumorais humanos em ratinhos nus atímicos ou ratinhos scid/scid, ou modelos genéticos de tumor de murídeo tais como ratinhos *knock-out* para p53.

Os modelos animais recombinantes (transgénicos) podem ser modificados através da introdução da porção codificadora das moléculas aqui identificadas no genoma de animais de interesse, utilizando técnicas padrão para produção

de animais transgênicos. Os animais que podem servir como alvo para manipulação transgênica incluem, sem limitação, ratinhos, ratos, coelhos, cobaias, ovelhas, cabras, porcos e primatas não humanos, p. ex., babuínos, chimpanzés e macacos. As técnicas conhecidas na especialidade para introduzir um transgene em tais animais incluem micro-injecção de pró-núcleos (Hoppe e Wanger, Patente U.S. N.º 4873191); transferência gênica mediada por retrovírus para linhas germinais (p. ex., Van der Putten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6148-615, 1985); direcçãoamento gênico em células estaminais embrionárias (Thompson *et al.*, *Cell* 56: 313-321, 1989); electroporação de embriões (Lo, *Mol. Cell Biol.* 3: 1803-1814, 1983); transferência gênica mediada por esperma (Lavitrano *et al.*, *Cell* 57: 717-73, 1989). Para revisão, ver, por exemplo, Patente U.S. N.º 4736866.

Para os objectivos do presente invento, animais transgênicos incluem os que possuem o transgene apenas em parte das suas células ("animais mosaico"). O transgene pode ser integrado como um único transgene ou em concatâmeros, p. ex., cadeias de cabeça-com-cabeça ou de cabeça-com-cauda. A introdução selectiva de um transgene num determinado tipo de células é também possível seguindo, por exemplo, a técnica de Lasko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6232-636, 1992.

A expressão do transgene em animais transgênicos pode ser monitorizada através de técnicas padrão. Por exemplo, pode ser utilizada análise *Southern blot* ou amplificação por PCR para verificar a integração do transgene. O nível de expressão do ARNm pode então ser analisado utilizando técnicas tais como hibridação *in situ*, análise *Northern blot*, PCR ou imunocitoquímica. Os animais podem ser ainda examinados quanto a sinais de patologia de doença imunitária, por exemplo, através de exame histológico para determinar a infiltração de células imunitárias em tecidos específicos ou quanto à presença de tecido canceroso ou maligno.

Alternativamente, podem ser construídos animais *knock-out* que tenham um gene deficiente ou alterado codificando um polipéptido aqui identificado, em resultado de recombinação homóloga entre o gene endógeno codificando o polipéptido e o ADN genómico alterado codificando o mesmo polipéptido

introduzido numa célula embrionária do animal. Por exemplo, pode ser utilizado ADNc codificando um determinado polipéptido para clonar ADN genómico codificando esse polipéptido de acordo com técnicas estabelecidas. Uma porção do ADN genómico codificando um polipéptido particular pode ser suprimida ou substituída por outro gene, tal como um gene codificando um marcador seleccionável que possa ser utilizado para monitorizar a integração. Tipicamente, são incluídos no vector vários quilobases de ADN flanqueador não alterado (em ambas as extremidades 5' e 3') (ver, p. ex., Thomas e Capecchi, *Cell* 51: 503, 1987 para uma descrição de vectores de recombinação homóloga). O vector é introduzido numa linha de células estaminais embrionárias (p. ex., através de electroporação) e as células nas quais o ADN introduzido se recombinau de modo homólogo com o ADN endógeno são seleccionadas (ver p. ex., Li *et al.*, *Cell* 69: 915, 1992). As células seleccionadas são então injectadas num blastocisto de um animal (p. ex., um ratinho ou rato) para formar quimeras de agregação (ver p. ex., Bradley, em "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach", E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), págs. 113-152). Um embrião quimérico pode então ser implantado numa fêmea adoptiva pseudo-grávida adequada e o embrião levado a termo para criar um animal "knock-out". A descendência ancorando o ADN recombinado homologamente nas suas linhas germinais pode ser identificada através de técnicas padrão e utilizada para criar animais nos quais todas as células do animal contêm o ADN homologamente recombinado. Os animais knock-out podem ser caracterizados, por exemplo, quanto à sua capacidade para se defenderem de certas condições patológicas e quanto ao seu desenvolvimento de condições patológicas devido à ausência do polipéptido.

Noutra concretização do presente invento, são proporcionados métodos para emprego do anticorpo em ensaios de diagnóstico. Por exemplo, os anticorpos podem ser empregues em ensaios de diagnóstico para detectar a expressão ou sobre-expressão de DR4 em células e tecidos específicos. Várias técnicas de ensaio de diagnóstico conhecidas na especialidade podem ser utilizadas, tais como ensaios de imagiologia *in vivo*, ensaios de ligação competitiva *in vitro*, ensaios em sanduíche directos ou indirectos e ensaios de imunoprecipitação conduzidos em fases heterogéneas ou

homogéneas (Zola, "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", CRC Press, Inc. 1987 págs. 147-158). Os anticorpos utilizados nos ensaios de diagnóstico podem ser marcados com uma porção detectável. A porção detectável deve ser capaz de produzir, directamente ou indirectamente, um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I , um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina, ou uma enzima, tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de rábano. Qualquer método conhecido na especialidade para conjugar o anticorpo com a porção detectável pode ser empregue, incluindo os métodos descritos por Hunter et al., *Nature* 144: 945, 1962; David et al., *Biochemistry* 13: 1014-1021, 1974; Pain et al., *J. Immunol. Meth.* 40: 219-230, 1981; e Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30: 407-412, 1982.

Os anticorpos contra DR4 são também úteis para a purificação por afinidade de DR4 a partir de cultura celular recombinante ou de fontes naturais. Neste processo, os anticorpos contra DR4 são imobilizados num suporte adequado, tal como uma resina Sephadex ou papel de filtro, utilizando métodos bem conhecidos na especialidade. O anticorpo imobilizado é então colocado em contacto com uma amostra contendo o DR4 a purificar e a partir daí o suporte é lavado com um solvente adequado que removerá substancialmente todo o material na amostra excepto o DR4, que fica ligado ao anticorpo imobilizado. Finalmente, o suporte é lavado com outro solvente adequado que libertará o DR4 do anticorpo.

Noutra concretização do presente invento, são proporcionados artigos de fabrico e estojos contendo materiais úteis para tratamento de condições patológicas ou detecção ou purificação de DR4. O artigo de fabrico compreende um recipiente com uma etiqueta. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser constituídos por uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente guarda uma composição possuindo um agente activo que é eficaz para tratamento de condições patológicas ou para detecção ou purificação de DR4. O agente activo na composição é um anticorpo contra DR4 e compreende, de preferência, anticorpos

monoclonais específicos para DR4. A etiqueta no recipiente indica que a composição é utilizada para tratamento de condições patológicas ou detecção ou purificação de DR4 e pode também indicar instruções para utilização *in vivo* ou *in vitro*, tal como as descritas acima.

Os seguintes exemplos são dados apenas para fins ilustrativos, e não se pretende que limitem de modo algum o âmbito do presente invento. Alguns dos exemplos são proporcionados por meio de referência.

EXEMPLOS

Os reagentes comercialmente disponíveis referidos nos exemplos foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante a menos que indicado em contrário. A fonte das células identificadas nos seguintes exemplos, e ao longo do fascículo, por números de entrada ATCC é a American Type Culture Collection, Manassas, Virgínia.

EXEMPLO 1

Expressão do ECD de DR4 como uma Imunoadesina

Foi preparada uma construção de imunoadesina solúvel do ECD de DR4. A sequência madura do ECD de DR4 (aminoácidos 1-218 mostrados na Fig. 1) foi clonada num vector pCMV-1 Flag (Kodak) a jusante da sequência de sinal Flag e fundida com a região CH1, charneira e Fc da cadeia pesada da imunoglobulina humana G₁ tal como descrito anteriormente (Aruffo *et al.*, Cell 61: 1303-1313, 1990). A imunoadesina foi expressa através de transfecção transiente em células 293 humanas e purificada a partir dos sobrenadantes celulares através de cromatografia de afinidade de proteína A, tal como descrito por Ashkenazi *et al.*, *supra*.

EXEMPLO 2

Preparação de Anticorpos Monoclonais Específicos para DR4

Ratinhos Balb/c (obtidos em Charles River Laboratories) foram imunizados através de injeção de 0,5 µg/50 µl de uma

proteína imunoadesina do ECD de DR4 (tal como descrita no Exemplo 1 acima) (diluída em adjuvante MPL-TDM adquirido em Ribi Immunochemical Research Inc., Hamilton, MT) 11 vezes em cada almofada da pata traseira a intervalos de 3-4 dias.

Três dias após o reforço final, os nódulos linfáticos poplíteos foram removidos dos ratinhos e foi preparada uma suspensão de células individuais em meio DMEM (obtido em Biowhitakker Corp.) suplementado com penicilina-estreptomicina a 1%. As células dos nódulos linfáticos foram então fundidas com células de mieloma de murídeo P3X63AgU.1 (ATCC CRL 1597) utilizando polietilenoglicol a 35% e cultivadas em placas de cultura de 96 poços. Os hibridomas resultantes da fusão foram seleccionados em meio HAT. Dez dias após a fusão, os sobrenadantes da cultura de hibridoma foram pesquisados num ELISA para testar quanto à presença de anticorpos monoclonais que se ligassem à proteína imunoadesina do ECD de DR4 (descrita no Exemplo 1).

No ELISA, placas de microtitulação de 96 poços (Maxisorb; Nunc, Kamstrup, Dinamarca) foram revestidas através da adição a cada poço de 50 µl de anticorpo de cabra anti-Fc de IgG humana (adquirido em Cappel Laboratories) a 2 µg/ml em PBS e incubação a 4°C de um dia para o outro. As placas foram então lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS contendo Tween 20 a 0,05%). Os poços nas placas de microtitulação foram então bloqueados com 200 µl de albumina de soro bovino a 2,0% em PBS e incubados à temperatura ambiente durante 1 hora. As placas foram então novamente lavadas três vezes com tampão de lavagem.

Após o passo de lavagem, foram adicionados a cada poço 50 µl de proteína imunoadesina de ECD de DR4 a 0,4 µg/ml em tampão de ensaio. As placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente num aparelho de agitação, seguido de lavagem três vezes com tampão de lavagem.

Após os passos de lavagem, foram adicionados aos poços designados 100 µl dos sobrenadantes de hibridoma ou de anticorpo purificado em colunas de proteína G-Sepharose (10 µg/ml). Foram adicionados a outros poços designados 100 µl de meio condicionado de células de mieloma P3X63AgU.1 como

controles. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora num aparelho de agitação e depois lavadas três vezes com tampão de lavagem.

A seguir, foram adicionados a cada poço 50 µl de anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho conjugado com HRP (adquirido em Cappel Laboratories), diluído 1:1000 em tampão de ensaio (albumina de soro bovino a 0,05%, Tween-20 a 0,05% em PBS) e as placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente num aparelho agitador. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem, seguido da adição a cada poço de 50 µl de substrato (Substrato de Peroxidase de Micropoços TMB, Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) e incubação à temperatura ambiente durante 10 minutos. A reacção foi parada através da adição a cada poço de 50 µl de Solução de Paragem de 1 Componente TMB (Dietilglicol, Kirkegaard & Perry), e a absorvância a 450 nm foi lida num leitor de placas de microtitulação automático.

Os sobrenadantes de hibridoma inicialmente pesquisados no ELISA foram considerados quanto à sua capacidade para se ligarem a DR4-IgG mas não a CD4-IgG. Os sobrenadantes que deram positivo no ELISA foram ainda analisados através de análise FACS utilizando células 9D (uma linha celular linfóide B humana que expressa DR4; Genentech, Inc.) e anticorpo de cabra anti-IgG de ratinho conjugado com FITC. Para esta análise, foram adicionados a poços de microtitulação de fundo em U 25 µl de células suspensas (a 4×10^6 células/ml) em tampão de separação de células (PBS contendo FCS a 1% e NaN_3 a 0,02%), misturados com 100 µl de sobrenadante de cultura ou anticorpo purificado (10 µg/ml) em tampão de separação de células, e incubou-se durante 30 minutos em gelo. As células foram então lavadas e incubadas com 100 µl de anticorpo de cabra anti-IgG de ratinho conjugado com FITC durante 30 minutos a 4°C. As células foram então lavadas duas vezes, ressuspensas em 150 µl de tampão de separação de células e depois analisadas através de FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

A Figura 2 mostra a coloração de FACS das células 9D. Dois anticorpos particulares, 4E7.24.3 e 4H6.17.8, reconheceram o receptor DR4 nas células 9D.

EXEMPLO 3**Ensaio da Capacidade dos Anticorpos contra DR4 para Induzir Agonisticamente Apoptose**

Os sobrenadantes de hibridoma e os anticorpos purificados (tal como descrito no Exemplo 2 acima) foram testados quanto à actividade para induzirem apoptose em células 9D mediada por DR4. Células 9D (5×10^5 células/0,5 ml) foram incubadas com 5 µg de mAb contra DR4 (4E7.24.3 ou 4H6.17.8; ver Exemplo 2 acima) ou anticorpos IgG de controlo em 200 µl de meio RPMI completo a 4°C durante 15 minutos. As células foram então incubadas durante 5 minutos a 37°C com ou sem 10 µg de anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho (ICN Pharmaceuticals) em 300 µl de RPMI completo. Neste momento, as células foram incubadas de um dia para o outro a 37°C e na presença de CO₂ a 7%. As células foram então colhidas e lavadas uma vez com PBS. A apoptose das células foi determinada através de coloração da ligação de FITC-anexina V a fosfatidilserina de acordo com as recomendações do fabricante (Clontech). As células foram lavadas em PBS e ressuspensas em 200 µl de tampão de ligação. Foram adicionados às células 10 µl de anexina V-FITC (1 µg/ml) e 10 µl de iodeto de propídio. Após incubação durante 15 minutos no escuro, as células 9D foram analisadas através de FACS.

Tal como mostrado na Figura 3, ambos os anticorpos contra DR4 (na ausência de anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho) induziram apoptose nas células 9D em comparação com os anticorpos de controlo. A actividade agonista de ambos os anticorpos foi, no entanto, estimulada através da ligação cruzada do receptor DR4 na presença de anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho (ver Figura 4). Esta maior apoptose (Figura 4) por ambos os anticorpos contra DR4 é comparável à actividade apoptótica de Apo-2L em células 9D.

EXEMPLO 4**Ensaio da Capacidade dos Anticorpos contra DR4 para Bloquearem Apoptose em 9D Induzida por Apo-2L**

Os sobrenadantes de hibridoma e os anticorpos purificados (tal como descrito no Exemplo 2 acima) foram testados quanto à

actividade para bloquearem apoptose em células 9D induzida pelo ligando de Apo-2.

As células 9D (5×10^5 células/0,5 ml) foram suspensas em meio RPMI completo (RPMI mais FCS a 10%, glutamina, aminoácidos não essenciais, penicilina, estreptomicina, piruvato de sódio) e pré-incubadas com anticorpo contra DR4 (4H6.17.8) e/ou um anticorpo de Apo-2 (mAb 3F11, ATCC N.º HB-12456) diluídos em série em tubos Falcon 2052 individuais. Os tubos contendo as células foram incubados em gelo durante 15 minutos e depois cerca de 0,5 ml de Apo-2L (1 µg/ml; Apo-2L solúvel etiquetado com His preparado tal como descrito em WO 97/25428) foram suspensos em meio RPMI completo, adicionados aos tubos contendo as células 9D e anticorpo e depois incubou-se de um dia para o outro a 37°C e na presença de CO₂ a 7%. As células incubadas foram então colhidas e lavadas uma vez com PBS. A viabilidade das células foi determinada através de coloração da ligação de FITC-anexina V a fosfatidilserina de acordo com as recomendações do fabricante (Clontech). Especificamente, as células foram lavadas em PBS e ressuspensas em 200 µl de tampão de ligação. Foram adicionados às células 10 µl de anexina-V-FITC (1 µg/ml) e 10 µl de iodeto de propídio. Após incubação durante 15 minutos no escuro, as células 9D foram analisadas através de FACS.

Os resultados são mostrados na Figura 5. Uma vez que as células 9D expressam mais de um receptor para Apo-2L, Apo-2L pode induzir apoptose nas células 9D através da interacção com DR4 ou com o receptor referido como Apo-2. Assim, para detectar qualquer actividade de bloqueio dos anticorpos contra DR4, era necessário bloquear a interacção entre Apo-2 e Apo-2L. Em combinação com o anticorpo de bloqueio anti-Apo-2, 3F11, o anticorpo contra DR4 4H6.17.8 foi também capaz de bloquear aproximadamente 50% da apoptose induzida por Apo-2L. Crê-se que os aproximadamente 50% restantes de actividade apoptótica sejam devidos à actividade agonística dos anticorpos contra DR4 sozinhos, tal como mostrado na Figura 5. Assim, crê-se que 4H6.17.8 seja um anticorpo contra DR4 bloqueador (num ensaio conduzido de modo semelhante, os Requerentes verificaram que o anticorpo 1H5, descrito no

Exemplo 7, bloqueava apoptose em células 9D através de Apo-2L).

EXEMPLO 5

Isotipagem dos Anticorpos

Os isotipos dos anticorpos 4H6.17.8 e 4E7.24.3 (tal como descritos acima) foram determinados revestindo placas de microtitulação com anticorpo de cabra anti-Ig de ratinho específico do isotipo (Fisher Biotech, Pittsburgh, PA) de um dia para o outro a 4°C. As placas foram então lavadas com tampão de lavagem (tal como descrito no Exemplo 2 acima). Os poços nas placas de microtitulação foram então bloqueados com 200 µl de albumina de soro bovino (BSA) a 2% e incubados à temperatura ambiente durante uma hora. As placas foram novamente lavadas três vezes com tampão de lavagem.

A seguir, foram adicionados aos poços designados 100 µl de anticorpo contra DR4 purificado a 5 µg/ml ou 100 µl do sobrenadante da cultura de hibridoma. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos e foram depois adicionados a cada poço 50 µl de anticorpo de cabra anti-IgG de ratinho conjugado com HRP (tal como descrito acima). As placas foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. O nível de HRP ligada à placa foi detectado utilizando substrato de HRP tal como descrito acima.

A análise de isotipagem mostrou que os anticorpos 4E7.24.3 e 4H6.17.8 são anticorpos IgG1.

EXEMPLO 6

Ensaio ELISA para Testar a Ligação dos Anticorpos contra DR4 a Outros Receptores de Apo-2L

Foi conduzido um ELISA para determinar se os dois anticorpos contra DR4 descritos no Exemplo 2 eram capazes de se ligar a outros receptores conhecidos de Apo-2L para além de DR4. Especificamente, os anticorpos contra DR4 foram testados quanto a ligação a Apo-2 (ver, p. ex., Sheridan et al., *Science* 277: 818-821, 1997), DcR1 (Sheridan et al., *supra*) e DcR2 (Marsters et al., *Curr. Biol.* 7: 1003-1006, 1997). O

ELISA foi efectuado essencialmente como descrito no Exemplo 2 acima.

Os resultados são mostrados na Figura 6. Os anticorpos contra DR4 4E7.24.3 e 4H6.17.8 ligaram-se a DR4 e mostraram alguma reactividade cruzada com Apo-2, DcR1 ou DcR2.

EXEMPLO 7

Preparação de Anticorpos Monoclonais Específicos para DR4

Os anticorpos monoclonais para DR4 foram produzidos essencialmente como descrito no Exemplo 2. Utilizando o ELISA de captura descrito no Exemplo 2, foram identificados mais anticorpos anti-DR4, referidos como 1H5.24.9, 1H8.17.5, 3G1.17.2, 4G7.18.8, 4G10.20.6 e 5G11.17.1 (ver Tabela na Figura 17). Mais análises através de FACS (utilizando a técnica descrita no Exemplo 2) confirmaram a ligação destes anticorpos a células 9D expressando DR4 (dados não mostrados).

EXEMPLO 8

Isotipagem dos Anticorpos

Os isotipos dos anticorpos anti-DR4 1H5.24.9, 1H8.17.5, 3G1.17.2, 4G7.18.8, 4G10.20.6 e 5G11.17.1 (descritos no Exemplo 7) foram determinados essencialmente tal como descrito no Exemplo 5.

A análise de isotipagem mostrou que os anticorpos 1H8.17.5, 3G1.17.2 e 4H10.20.6 são anticorpos IgG1. Os anticorpos anti-DR4 1H5.24.9 e 4G7.18.8 são anticorpos IgG2a e o anticorpo 5G11.17.1 é um anticorpo IgG2b.

EXEMPLO 9

Determinação das Afinidades dos Anticorpos Monoclonais

As velocidades da constante de dissociação e associação em equilíbrio dos vários anticorpos contra DR4 (descritos nos Exemplos acima) foram determinadas utilizando KinExATM, um sistema automatizado de imunoensaio (Sapidyne Instruments, Inc., Boise, ID), tal como descrito com uma modificação por Blake et al., *Journal of Biological Chemistry* 271: 27677-685,

1996; e Craig et al., *Journal of Molecular Biology* 281: 183-201, 1998. Resumidamente, foram revestidos 1,0 ml de contas de agarose anti-IgG humana (56 μ m, Sigma, St. Louis, MO) com 20 μ g de DR4-IgG (descrito no Exemplo 1) em PBS através de mistura suave à temperatura ambiente durante 1 hora. Após lavagem com PBS, os locais de ligação inespecífica foram bloqueados através de incubação com soro humano a 10% em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente.

Foi criada uma massa de contas (\approx 4 mm de altura) na célula de observação do fluxo através do instrumento KinExATM. As contas bloqueadas foram diluídas em 30 ml de tampão de ensaio (BSA a 0,01%/PBS). As contas diluídas (550 μ l) foram depois passadas através da célula de fluxo com um écran de 20 μ m e lavadas com 1 ml de tampão de corrida (BSA a 0,01%; Tween 20 a 0,05% em PBS). As contas foram então suavemente rompidas com um jacto rápido de tampão de corrida em sentido inverso, seguido de um período de repouso de 20 segundos para criar uma massa de contas uniforme e reprodutível. Para medições em equilíbrio, os anticorpos contra DR4 seleccionados (5 ng/ml em BSA a 0,01%/PBS) foram misturados com uma diluição em série de DR4-IgG (a começar em 2,5 nM até 5,0 pM) e foram incubados à temperatura ambiente durante 2 horas. Uma vez alcançado o equilíbrio, foram passados 4,5 ml desta mistura através das contas, seguido de 250 μ l de tampão de corrida para lavar os anticorpos não ligados. Os anticorpos primários ligados às contas foram detectados através de 1,5 ml de anticorpo de cabra anti-IgG de ratinho marcado com ficoeritrina (Jackson Immunoresearch). O material marcado não ligado foi removido através da passagem de 4,5 ml de NaCl 0,5 M através da massa de contas durante um período de 3 minutos. A constante de equilíbrio foi calculada utilizando o suporte lógico proporcionado pelo fabricante (Sapidyne, Inc.).

As determinações de afinidade para os anticorpos contra DR4 são mostradas na Figura 7. As determinações de afinidade para as construções de imunoadesina dos receptores DR4 e DR5 para Apo-2L e para o anticorpo de DR5, 3F11, para uma construção de Ig de DR5, são mostradas para comparação. As afinidades (Kd-1) dos anticorpos 4E7.24.3, 4H6.17.8 e 5G11 foram de 2 pM, 5 pM e 22 pM, respectivamente, demonstrando que estes anticorpos monoclonais têm fortes afinidades de ligação

a DR4-IgG (as afinidades (K_d -1) dos anticorpos 4G7 e 3G1 foram de 20 pM e 40 pM, respectivamente, dados não mostrados na Figure 7).

EXEMPLO 10

Ensaio de Apoptose de Células Tumerais Linfóides Utilizando Anticorpos contra DR4

Foi examinada a apoptose de células tumorais linfóides B humanas 9D induzida por anticorpos monoclonais anti-DR4.

Células 9D humanas (5×10^5) foram suspensas em 100 microlitros de meio RPMI completo (RPMI mais FCS a 10%, glutamina, aminoácidos não essenciais, penicilina, estreptomicina e piruvato de sódio) e foram adicionadas a poços de uma placa de microtitulação de 24 poços (5×10^5 células/0,5 ml/poço). 100 microlitros de anticorpo contra DR4 purificado a 10 microgramas/ml ou 100 microlitros de sobrenadante de cultura são depois adicionados aos poços contendo células 9D. As células foram então incubadas de um dia para o outro a 37°C na presença de CO₂ a 7%.

No final da incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS. As células lavadas foram ressuspensas em 200 microlitros de tampão de ligação (Clontech) e foram adicionados aos poços 10 microlitros de anexina-V-FITC (Clontech) e 10 µl de iodeto de propídio (ver, Moore et al., *Meth. In Cell Biol.* 57: 265, 1998). Após incubação durante 15 minutos no escuro, as células foram analisadas através de FACScan.

Os resultados são mostrados na Figura 8A. Os gráficos na Figura 8A mostram que os anticorpos 1H5, 4G7 e 5G11 induziram por si próprios alguma apoptose (fraca) nas células 9D, mas a actividade apoptótica de cada anticorpo foi marcadamente maior quando estes anticorpos monoclonais foram ligados de forma cruzada através de anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho ou complemento (tal como descrito no Exemplo 11 abaixo).

EXEMPLO 11**Ensaio de Apoptose em Células 9D Utilizando Anticorpos contra DR4 Ligados de Forma Cruzada**

Foi também examinada a actividade apoptótica de anticorpos contra DR4 ligados de forma cruzada em células 9D. Células 9D (5×10^5) foram suspensas em 100 microlitros de meio RPMI completo (RPMI mais FCS a 10%, glutamina, aminoácidos não essenciais, penicilina, estreptomicina e piruvato de sódio) e incubadas com 1 micrograma de anticorpo contra DR4/100 microlitros em gelo durante 15 minutos. As células foram incubadas com uma diluição final 1:10 de complemento de coelho (Cedar Lane) ou 100 microgramas/ml de anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho (Cappel Laboratories) em 300 microlitros de meio completo de um dia para o outro a 37°C na presença de CO₂ a 7%.

No final da incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS e suspensas em 200 microlitros de tampão de ligação (Clontech). A seguir, foram adicionados às células 10 microlitros de Anexina-V-FITC (Clontech) e 10 µl de iodeto de propídio (ver, Moore et al., *Cell Biol.* 57: 265, 1998). Após incubação durante 15 minutos no escuro, as células foram analisadas através de FACScan.

Os resultados são mostrados nas Figuras 8A e 8B. Os resultados mostram que os anticorpos anti-DR4 4G7.17.8, 5G11.17.1 e 1H5.24.9, induziram apoptose em células 9D quando ligados de forma cruzada com anticorpo de cabra anti-IgG de ratinho ou complemento de coelho embora o grau de apoptose induzida utilizando o complemento como ligante não fosse tão potente em comparação com a utilização do ligante de cabra anti-Fc de IgG de ratinho. No entanto, a actividade apoptótica dos anticorpos contra DR4 ligados de forma cruzada (a concentrações de cerca de 1-2 microgramas/ml) foi comparável com a actividade apoptótica de Apo-2L a concentrações semelhantes.

EXEMPLO 12**Ensaio de Apoptose de Linhas Celulares de Tumores do Pulmão e Cólon Humanos**

As actividades apoptóticas dos anticorpos monoclonais foram ainda examinadas em ensaios para determinar a viabilidade celular de células de cancro após tratamento com os anticorpos ou Apo-2L.

Células SKMES-1 (linha celular de tumor do pulmão humano; ATCC) e células HCT-116 (linha celular de tumor do cólon humano; ATCC) foram semeadas a 4×10^4 células/poço em meio completo rico em glicose 50:50 suplementado com glutamina, penicilina e estreptomicina, em placas de cultura de tecidos e deixou-se a aderir de um dia para o outro a 37°C. O meio foi então removido dos poços e foi adicionado 0,1 ml de anticorpo (anticorpos anti-DR4 diluídos 0,001-10 microgramas/ml em meio completo) aos poços seleccionados. Os poços de controlo sem anticorpo receberam uma mudança de meio com ou sem Apo-2L. As placas foram então incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente.

O sobrenadante das culturas foi removido dos poços contendo os anticorpos de teste e foram adicionados aos poços 10 microgramas/ml de anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho (Cappel Laboratories) ou complemento de coelho (Cedar Lane; diluído em meio para 1:10). O meio foi mudado nos poços de controlo. As placas foram incubadas de um dia para o outro a 37°C. Como controlo, foi diluído Apo-2L (tal como descrito no Exemplo 4) (em tampão de fosfato de potássio, pH 7,0) até 2 microgramas/ml. Foram adicionados aos poços seleccionados 0,1 ml da solução de Apo-2L diluída e depois foram realizadas nas placas diluições em série de três vezes.

Os sobrenadantes das culturas foram então removidos dos poços através de aspiração e as placas foram inundadas com violeta cristal a 0,5% em solução de metanol. Após 15 minutos, a solução de violeta cristal foi removida inundando as placas com água da torneira a correr. As placas foram então deixadas a secar de um dia para o outro.

A absorvância foi lida num leitor de placas SLT 340 ATC (Salzburg, Áustria) a 540 nm. Os dados foram analisados utilizando uma macro de Excel e "4p-fit". Os resultados ilustrando a actividade dos anticorpos contra DR4 nas células SKMES são mostrados nas Figuras 9 e 10. As Figuras 9 e 10A mostram que os anticorpos 1H8.17.5, 4E7.24.3, 4G7.17.8, 4H6.17.8, 4G10.20.6 e 5G11.17.1 induziram morte celular nas células SKMES quando as células foram incubadas com os respectivos anticorpos mais anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho (verificou-se também que o anticorpo 1H5 induz morte celular das células SKMES, dados não mostrados nas Figuras 9 e 10A). Em contraste, o anticorpo 3G1.17.2 não induziu morte celular nas células, mesmo na presença do ligante cruzado Fc de IgG. A Figura 10B ilustra a actividade apoptótica dos anticorpos 4G7 (isotipo IgG2a) e 5G11 (isotipo IgG2b) nas células SKMES na presença de complemento de coelho.

Os resultados ilustrados na Figura 11 mostram a actividade dos anticorpos contra DR4 nas células de cancro do cólon HCT116. Os anticorpos contra DR4 isotipo IgG2, 4G7 e 5G11, induziram apoptose nas células de cancro do cólon na presença de Fc de IgG ou de complemento. O anticorpo contra DR4, 4E7 (isotipo IgG1), não induziu apoptose na presença de complemento, embora o anticorpo tivesse demonstrado potente actividade apoptótica na presença de anticorpo de cabra anti-Fc de IgG de ratinho.

EXEMPLO 13

Ensaio ELISA para Testar a Ligação dos Anticorpos contra DR4 a Outros Receptores de Apo-2L

Foi conduzido um ensaio ELISA (tal como descrito nos Exemplos 2 e 6) para determinar a ligação dos anticorpos contra DR4 a outros receptores de Apo2-L conhecidos, para além de DR4.

O anticorpo 5G11.17.1 ligou-se a DR4 e Apo-2 e mostrou alguma reactividade cruzada (fraca) com DcR1 e DcR2. O anticorpo 4G10.20.6 ligou-se a DR4 e mostrou alguma reactividade cruzada (fraca) com Apo-2. Os outros anticorpos,

1H8.17.5, 4G7.18.8, 1H5.24.9 e 3G1.17.2, ligaram-se a DR4 mas não a nenhum dos receptores Apo-2, DcR1 ou DcR2.

EXEMPLO 14

Ensaio de Poli-ADP-ribose-polimerase (PARP)

Foi conduzido um ensaio PARP para determinar se a actividade induzida pelos anticorpos IgG2 anti-DR4 era alcançada através de apoptose ou através de lise convencional pelo complemento.

Células 9D (5×10^5 células em 100 μ l de meio completo (descrito no Exemplo 11) foram incubadas com 100 μ l de anticorpo (4G7 ou 5G11) (1 mg/ml) durante 15 minutos em gelo. Depois, foram adicionados às células 300 μ l de Complemento de Coelho (Cedar Lane; diluído com 1,0 ml de água destilada fria seguido da adição de 2,0 ml de meio). As células foram então incubadas de um dia para o outro a 37°C. No final da incubação, as células foram microcentrifugadas, colhidas e lavadas uma vez em tampão de lavagem de células (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,15 M, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM). Os sedimentos celulares foram então lisados com 50 μ l de tampão de lise de células (tampão de lavagem de células mais NP40 a 1%) contendo inibidores de proteases, incubados em gelo durante 30 minutos e depois centrifugados a 13000 rpm durante 10 minutos.

O lisado celular foi misturado com um volume igual de tampão redutor SDS 2 \times . Após ferver durante 2 minutos, as proteínas foram separadas num gel de SDS-PAGE a 7,5% e transferidas para membranas de PVDF de *immunoblot* (Gelman). Após bloqueio dos locais de ligação inespecífica com tampão de bloqueio (Boehringer Mannheim), foi detectada a poli-(ADP-ribose)-polimerase utilizando anti-poli(ADP-ribose)-polimerase de coelho-HRP (Boehringer Mannheim). Este anticorpo detectará a PARP intacta (116 kDa) bem como a degradada (85 kDa) que é gerada num passo inicial da apoptose. O anti-anti-poli(ADP-ribose)-polimerase de coelho-HRP ligado foi detectado utilizando reagentes de sinal de imunoensaio quimioluminescente de acordo com as instruções do fabricante (Amersham, Arlington Heights, IL).

Os resultados são mostrados na Figura 12. As células tratadas com 4G7 ou 5G11 mais complemento demonstraram a presença de PARP clivada de 85 kDa, indicando que o mecanismo da morte celular de 9D induzido pelos respectivos anticorpos era devido a apoptose. Quando o complemento adicionado ao ensaio era inativado com calor através da incubação durante 30 minutos a 56°C, o fragmento clivado de 85 kDa de PARP não era detectável. Os resultados sugerem que o complemento no soro de coelho induziu a oligomerização dos anticorpos anti-DR4 ligados às células, resultando na apoptose das células 9D.

EXEMPLO 15

Actividade in vivo dos Anticorpos contra DR4

Uma vez que os anticorpos contra DR4 de classe IgG2 induziram apoptose na presença de complemento (descrito nos Exemplos de cima), foi conduzido um ensaio *in vivo* para determinar se estes anticorpos podiam ser capazes de induzir apoptose de células tumorais *in vivo* na presença de moléculas de complemento nativas presentes no animal.

Células HCT116 (linha celular de tumor de cólon humano; ATCC) ou células Colo205 (linha celular de tumor de cólon humano; ATCC) foram criadas em meio F-12:DMEM rico em glicose (50:50) suplementado com FCS a 10%, glutamina 2 mM, 100 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As células foram colhidas após tratamento com meio de dissociação celular (Sigma, IAC) durante 5 minutos. Após lavagem em PBS, as células tumorais foram ressuspensas em PBS a uma concentração de 3×10^7 células/ml.

Ratinhos nus foram injectados com $3-5 \times 10^6$ células subcutaneamente na área dorsal num volume de 0,1 ml. Quando o tamanho do tumor nos animais possuindo tumores HCT116 tinha um tamanho desejado, os ratinhos eram injectados i.p. com 100 µg de anticorpo monomérico anti-DR4 em PBS três vezes por semana e os tamanhos dos tumores eram medidos três vezes/semana. Os animais possuindo tumores Colo205 foram injectados i.p. com concentrações variáveis dos anticorpos contra DR4, 4G7 e 4H6 (tal como mostrado nas Figuras 15 e 16). No final da experiência que examina os tumores HCT116, os ratinhos eram sacrificados e era determinado o peso de cada tumor.

Os resultados ilustrados nas Figuras 13 e 14 mostram que tanto 4G7 como 5G11 inibiu o crescimento de tumores HCT116. Houve uma inibição do crescimento de aproximadamente 35-40% e 50% dos tumores HCT116 após tratamento com anticorpos 5G11 e 4G7, respectivamente.

Os resultados ilustrados nas Figuras 15 e 16 mostram que tanto 4G7 como 4H6 inibiu o crescimento de tumores Colo205. A Fig. 15 ilustra que o tratamento de anticorpos era mais eficaz quando o tamanho dos tumores era menor. A Fig. 16 mostra que dos ratinhos tratados com 25-200 microgramas de 4G7 (injectados três vezes por semana), os ratinhos que receberam as doses de 50 microgramas de 4G7 alcançaram a inibição máxima (70%) de crescimento do tumor Colo205. O anticorpo 4H6 reduziu o crescimento do tumor Colo205 até próximo de zero após tratamento durante 10 dias. No final do tratamento de 10 dias de 4H6 (100 microgramas/injecção), 4/8 ratinhos não apresentavam crescimento do tumor Colo205 (dados não mostrados). Em experiências relacionadas, os Requerentes verificaram também que a regressão do tumor era semelhantemente alcançada com tratamento de 4H6 a 5 mg/kg uma vez por semana. Observa-se que alguns dos tumores reapareciam após a administração do anticorpo 4H6 ser parada, sugerindo que algumas das células tumorais não foram completamente eliminadas durante o tratamento. Secções histológicas dos tumores Colo205 três dias após uma única injecção i.p. de 5 mg/kg do anticorpo 4H6 mostraram apoptose disseminada (os ratinhos tratados com anticorpo de controlo do anticorpo 4G7 mostravam pouca apoptose). Em contraste, a extensão e composição do infiltrado celular nos tumores pareceu semelhante nos animais tratados com o anticorpo 4H6 e com anticorpo de controlo. Estes dados sugeriram que o anticorpo 4H6 exerce a actividade antitumoral através da indução de apoptose nas células tumorais em vez de indirectamente através do recrutamento de funções imunitárias efectoras.

Noutras experiências semelhantemente conduzidas *in vivo* utilizando ratinhos nus possuindo tumores Colo205, os ratinhos foram tratados com os anticorpos anti-DR4 de cima, incluindo os anticorpos 1H5 e 3G1, a 2,5 mg/kg, duas vezes por semana, a começar no Dia 4. No Dia 22, os tamanhos dos tumores foram

medidos e a % de inibição do crescimento foi calculada com base na actividade antitumoral do anticorpo monoclonal 4H6 como 100% de inibição. Os tamanhos dos tumores dos animais tratados com PBS (controlo) e anticorpo 4H6 foram de $498 \pm 322 \text{ mm}^3$ e mm^3 , respectivamente. Os anticorpos 3G1, 4E7 e 4H6 (todos anticorpos de isotipo IgG1) demonstraram uma actividade antitumoral mais forte que os anticorpos de isotipo IgG2, 1H5, 4G7 e a variante de mudança de isotipo mIgG2a-4H6 (descrita abaixo). Os intervalos de inibição do crescimento tumoral pelos anticorpos IgG1 e pelos anticorpos IgG2a foram de 42-100% e 27-30%, respectivamente. Apesar de o anticorpo 3G1 ter exibido uma actividade agonística relativamente fraca após ligação cruzada *in vitro*, o anticorpo 3G1 inibiu o crescimento do tumor Colo205 em 42% *in vivo*. Estes resultados sugeriram que o isotipo mIgG1 pode ser mais eficaz que o isotipo mIgG2a na mediação da actividade antitumoral através do receptor DR4.

Os resultados do estudo sugeriram também que estes anticorpos contra DR4, administrados na ausência de ligantes ou modificadores exógenos, podem ser agentes anticancerosos activos. Embora não completamente compreendido, é possível que os anticorpos administrados tenham induzido apoptose através de oligomerização através de um mecanismo endógeno tal como a interacção da região Fc com o complemento nativo presente no animal ou com receptores de Fc gama nas células efectoras ou através de auto-agregação espontânea Fc-Fc. Crê-se que os anticorpos anti-DR4 de isotipos de Ig humana tais como IgG1, IgG2 ou IgG3 (que podem fixar o complemento), podem semelhantemente ser capazes de se ligar de forma cruzada utilizando o complemento e induzindo apoptose.

Para melhor examinar a diferença relativa nas actividades dos dois anticorpos anti-DR4 de cima, foi gerada uma variante de mudança de isotipo IgG2a de murídeo do anticorpo monoclonal de murídeo 4H6 e foi feita uma comparação entre a sua actividade *in vitro* e *in vivo* e o anticorpo monoclonal de murídeo 4H6 original.

Os genes de VH e VL foram isolados através de amplificação por PCR de ARNm do hibridoma de 4H6 correspondente tal como descrito em Carter *et al.*, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. 89: 4285-4289, 1992 utilizando polimerase Taq. As sequências de aminoácidos N-terminais das cadeias leve e pesada de 4H6 foram utilizadas para desenhar os iniciadores de PCR da cadeia com sentido enquanto os iniciadores de PCR anti-sentido foram baseados em sequências de consenso da estrutura de murídeo 4 de cada cadeia. Os fragmentos de ADN amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *Nsi* e *RsrII* para a cadeia leve e *MluI* e *ApaI* para a cadeia pesada (ver Exemplo 16 abaixo para mais detalhes). Os ADNc dos domínios variáveis para as cadeias leve e pesada foram montados separadamente com os domínios CH1-CH2-CH3 de Ck e IgG2 de murídeo em vectores de expressão plasmídicos. Os vectores de ADNc das cadeias leve e pesada foram co-transfectados para células 293 durante 7 dias, o meio foi colhido e a forma IgG2a-4H6 segregada foi recuperada através de purificação de afinidade utilizando Proteína G.

In vitro, num ensaio conduzido essencialmente tal como descrito no Exemplo 12 (excepto que foram utilizadas células Colo205 em vez de células HCT116), os dois isotipos diferentes de 4H6 mostraram actividade semelhante após ligação cruzada com anticorpo de cabra anti-IgG de ratinho. Em contraste, *in vivo*, num ensaio conduzido essencialmente tal como descrito no Exemplo 15 (excepto que os animais foram tratados com anticorpos a uma dose de 2,5 mg/kg, duas vezes por semana), o isotipo IgG1 de 4H6 foi substancialmente mais activo que o seu equivalente IgG2a. A uma dose de 2,5 mg/kg, duas vezes por semana, IgG1-4H6 e IgG2a-4H6 inibiram o crescimento dos tumores Colo205 em 96% e 35%, respectivamente, pelo Dia 22. A actividade antitumoral do anticorpo IgG2a-4G7 foi semelhante à do anticorpo IgG2a-4H6. Assim, pelo menos para aqueles dois anticorpos, o isotipo do anticorpo parece ser mais importante para a actividade *in vivo* que o epítipo alvo.

EXEMPLO 16

Preparação do Anticorpo Quimérico 4H6.17.8

O anticorpo 4H6.17.8 purificado (ver Exemplo 2) foi sequenciado para obter os aminoácidos N-terminais tanto da cadeia pesada como da leve. Os dados da sequência N-terminal foram utilizados para desenhar iniciadores de PCR específicos para as extremidades 5' das regiões variáveis das cadeias leve

e pesada, enquanto os iniciadores 3' foram desenhados para se ligarem à estrutura de consenso 4 de cada cadeia (Kabat, et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Resumidamente, foi desenhado um iniciador 3' degenerado representando todas as potenciais combinações da estrutura 4 para o anticorpo. Os iniciadores foram desenhados para adicionar locais de restrição para clonagem; especificamente *Nsi*I e *Rsr*II para a cadeia leve e *Mlu*I e *Apa*I para a cadeia pesada (posições mostradas abaixo a cheio).

Iniciadores 3' degenerados:

$$w=a/t, \quad k=q/t, \quad b=q/t/c, \quad v=c/t, \quad r=a/q, \quad s=q/c, \quad m=a/c, \quad n=a/q/t/c$$

Cadeia Leve: tgc agc cac **ggw ccg** wkt bak ytc car ytt kgt ssc
RsrII (SEO ID NO:3)

Cadeia Pesada: gac cga t**gg gcc** cgt cgt ttt ggc tgm rga rac ngf gas
 ApaI (SEQ ID NO:4)

Iniciadores 5' específicos

Cadeia leve de 4H6 (4H6LF1):
 gct aca **aat gca tac** gct gat atc cag atg aca cag
 (SEQ ID NO:5) NsiI

Os codões sublinhados em SEQ ID NO:5 acima correspondem aos codões (Figura 18A) na sequência nativa da cadeia leve do anticorpo 4H6 codificando os aminoácidos 21-26 mostrados na Figura 18A-C (SEQ ID NO:9).

Cadeia pesada de 4H6 (4H6HF1):
 gct aca **aac gcg tac** gct cag gtg cag ctg aag gag
 (SEQ ID NO:6) *Mlu*I

Os códons sublinhados em SEQ ID NO:6 acima correspondem aos códons na sequência nativa da cadeia pesada do anticorpo 4H6 codificando os primeiros seis aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada. Observa-se que os dois primeiros aminoácidos da sequência nativa do domínio variável de 4H6 são glutamina (Q) e valina (V) codificados pelos códons cag e gtg, respectivamente. Em contraste, nas Figuras 18D-18H, os dois

primeiros aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada (surgindo como posições 20 e 21, após a sequência de sinal) são mostrados como ácido glutâmico (E) e valina (V) codificados pelos codões gaa e gtt, respectivamente. Esta mudança nos codões codificando os dois primeiros aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada é devida à construção de vector utilizada; e na Figura 18D, os dois primeiros aminoácidos (e correspondentes codões) do domínio variável (surgindo nas posições 20 e 21) reflectem os aminoácidos que são de facto derivados do vector.

O ARN total, extraído de 10^8 células de hibridoma 4H6.17.8 (ver Exemplo 2), com um estojo de isolamento de ARN de Stratagene (200345), foi utilizado como substrato para RT-PCR. Foi efectuada transcrição reversa sob condições padrão (Kawasaki, E.S. em "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis, M.A., et al., eds. págs. 21-27, Academic Press, Inc., San Diego, 1990) utilizando os iniciadores degenerados da estrutura 4 e a Transcritase Inversa Superscript II ARNase H (Gibco 18064-014). A amplificação por PCR empregou polimerase Taq (Perkin Elmer-Cetus), tal como descrito (Kawasaki, E.S., *supra*) excepto que foi incluído DMSO a 2% na mistura reaccional. Os fragmentos de ADN amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *NsiI* e *RsrII* (cadeia leve) ou *MluI* e *ApaI* (cadeia pesada), purificadas em gel e clonados num vector, ss.vegf4chimera (ver, Presta et al., *Cancer Research* 57: 4593-4599, 1997). Os ADNc dos domínios variáveis das cadeias leves e pesadas de murídeo foram inseridos a montante e enquadrados aos domínios CH1 de Ckappa e IgG1 humanos. A cisteína C-terminal, que forma a ponte dissulfureto durante a geração de F(ab')₂, da cadeia pesada em pAK19 (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163, 1992), foi removida para permitir a expressão de apenas a forma Fab inteira do anticorpo. Confirmou-se que a proteína Fab se liga especificamente ao seu receptor cognato, DR4-IgG através de um ELISA de captura (efectuado essencialmente tal como descrito no Exemplo 2 acima excepto que a IgG de ovelha-HRP purificada por afinidade e o F(ab)'₂ anti-IgG humana (Cappel Laboratories) foram utilizados a 1:2500). Uma vez confirmada a especificidade, os domínios variáveis das cadeias pesadas de murídeo de 4H6.17.8 foram digeridos com as enzimas de restrição *PvuII* e *ApaI*, purificados em gel e clonados na

construção de vector de IgG1 humana descrita em Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 4285, 1992 (em ligação com a humanização do anticorpo 4D5). O primeiro aminoácido da cadeia pesada foi derivado do vector e resultou numa mudança de Q para E na sequência original ou nativa de 4H6.17.8, tal como descrito acima. O segundo aminoácido da sequência nativa é V e permaneceu um V, embora codificado por um codão diferente, também derivado do vector, tal como descrito acima. Os domínios variáveis dos ADNc das cadeias leves e pesadas de murídeo foram inseridos a montante e enquadrados aos domínios CH1-CH2-CH3 de Ckappa e IgG1 humanos. Os vectores de ADNc quiméricos das cadeias leves e pesadas foram co-transfectados para células CHO utilizando técnicas padrão e os anticorpos segregados foram então recuperados através de purificação de afinidade utilizando colunas de Proteína G.

A sequência nucleotídica codificadora e a putativa sequência de aminoácidos para as respectivas cadeias leves e pesadas do anticorpo 4H6.17.8 são mostradas nas Figuras 18A-18H. A cadeia leve incluiu um domínio variável compreendendo os aminoácidos 20 a 126 das Figuras 18A-18C (SEQ ID NO:9). As Figuras 18A-18C mostram também a sequência de sinal (aminoácidos 1 a 19 das Figuras 18A-18C (SEQ ID NO:9) e o domínio CH1 humano compreendendo os aminoácidos 127 a 233 (Figuras 18A-18C; SEQ ID NO:9). A cadeia pesada incluiu um domínio variável compreendendo os aminoácidos 20 a 145 das Figuras 18D-18H (SEQ ID NO:12). As Fig. 18D-18H mostraram também a sequência de sinal (aminoácidos 1 a 19 das Figuras 18D-18H (SEQ ID NO:12) e os domínios CH1, CH2 e CH3 humanos (aminoácidos 146 a 476 das Figuras 18D-18H (SEQ ID NO:12)).

EXEMPLO 17

Actividades *in vitro* do Anticorpo 4H6 Quimérico

Os efeitos do anticorpo 4H6 quimérico anti-DR4 (ver Exemplo 16) na viabilidade de células SK-MES-1 foram determinados através de coloração de violeta cristal. Células SK-MES-1 (linha celular de tumor do pulmão humano; ATCC) (4×10^4 células/100 µl/poço) foram incubadas de um dia para o outro (em meio DMEM/F-12 (50:50) suplementado com FCS a 10%, glutamina 2 mM e antibióticos) com diluições em série de anticorpos monoclonais com ou sem anticorpo de cabra anti-Fc

de IgG de ratinho (10 µg/ml) ou anticorpo de cabra anti-Fc de IgG humana (10 µg/ml). Os anticorpos monoclonais testados incluíam uma preparação de F(ab)'₂ de 4H6.17.8 de murídeo, anticorpo 4H.17.8 de murídeo purificado (descrito no Exemplo 2) e anticorpo 4H6 quimérico (descrito no Exemplo 16). Foram adicionadas a cada placa diluições em série de Apo2L/TRAIL (consistindo nos aminoácidos 114-281 da sequência de Apo2L/TRAIL expressa em *E. coli*, divulgada em WO97/25428; ver também, Ashkenazi *et al.*, *J. Clin. Invest.* 104: 155-162, 1999) preparadas num volume final de 100 µl como controlo positivo. Após incubação de um dia para o outro a 37°C o meio foi removido e as células viáveis foram coradas utilizando violeta cristal tal como descrito por Flick *et al.*, *J. Immunol. Methods* 68: 167-175, 1984). As placas foram lidas num leitor de placas SLT a 540 nM.

Os resultados são mostrados na Figura 19. A actividade de morte de células SK-MES-1 do anticorpo 4H6 quimérico ligado de forma cruzada foi comparável com a do monoclonal de murídeo 4H6.17.8.

Foi conduzido outro ensaio para examinar se o anticorpo 4H6 quimérico induz citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) *in vitro*.

Foram realizadas experiências através da incubação de células Colo205 marcadas com ⁵¹Cr (linha celular de tumor do cólon humano; ATCC) (2×10⁴ células/poço em meio RPMI suplementado com FCS a 10%, L-glutamina a 1%, Penicilina-Estreptomicina a 1%) primeiro com anticorpo 4H6 quimérico (5 µg/ml) e depois com PBL humanos de um dia para o outro como fonte de células efectoras. Os PBL foram purificados a partir de sangue completo humano através de centrifugação em Ficoll-Hypaque. Como controlos positivos, foram incluídas células ⁵¹Cr-Colo205 tratadas com anticorpo 4H6 quimérico mais anticorpo de cabra anti-IgG humana (10 µg/ml) (adquirido em ICN Pharmaceuticals). Como controlo negativo, foi adicionado um anticorpo anti-IgE humana ("2E5"; Genentech). Tal como descrito na Figura 20, as células ⁵¹Cr-Colo205 tratadas com anticorpo 4H6 quimérico mais anticorpo de cabra anti-IgG humana resultou numa libertação de 52% de ⁵¹Cr. A uma razão de 40:1 de efector para alvo, houve uma libertação de 40% de

^{51}Cr , sugerindo que o anticorpo 4H6 quimérico induz um nível significativo de ADCC. A percentagem de libertação de ^{51}Cr foi calculada com base na libertação total de ^{51}Cr das células ^{51}Cr -Colo205 após tratamento com Triton-X100 a 1%.

EXEMPLO 18

Actividade in vivo do Anticorpo 4H6 Quimérico

Foram realizadas experiências essencialmente tal como descrito no Exemplo 15. Células tumorais Colo205 foram criadas em meio DMEM/F-12 (50:50) suplementado com FCS a 10%, glutamina 2 mM e antibióticos. Fêmeas de ratinhos nus atímicas (4-6 semanas de idade, 7-8 ratinhos por grupo) foram injectadas subcutaneamente com 5×10^6 células Colo205 em 0,2 ml de PBS nas áreas dorsais. Quando os tumores alcançavam tamanhos de 50-100 mm³, os ratinhos eram agrupados aleatoriamente e eram-lhes dados intraperitonealmente os anticorpos monoclonais (anticorpo 4H6.17.8 de murídeo purificado (ver Exemplo 2); anticorpo 4H6 quimérico (ver Exemplo 16); e anticorpo IgG1 de controlo) num volume de 0,1 ml a 5 mg/kg, uma vez por semana.

Tal como mostrado na Fig. 21, o anticorpo 4H6 quimérico demonstrou actividade antitumoral no modelo nu de xenoenxerto, embora o nível de actividade antitumoral do anticorpo 4H6 quimérico não fosse tão potente como o do anticorpo monoclonal de murídeo 4H6.17.8. Crê-se actualmente que a actividade antitumoral menos potente do anticorpo 4H6 quimérico seja devida ao sistema heterólogo utilizado para o estudo *in vivo*.

Depósito de Material

Os seguintes materiais foram depositados na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, USA (ATCC):

<u>Material</u>	<u>Dep. ATCC N.º</u>	<u>Data do Depósito</u>
4E7.24.3	HB-12454	13 Jan., 1998
4H6.17.8	HB-12455	13 Jan., 1998
1H5.25.9	HB-12695	1 Abril, 1999
4G7.18: 8	PTA-99	21 Maio, 1999
5G11.17.1	HB-12694	1 Abril, 1999

Este depósito foi feito ao abrigo das condições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microrganismos para Efeitos do Procedimento em Matéria de Patentes e os seus Regulamentos (Tratado de Budapeste). Isto assegura a manutenção de uma cultura viável do depósito durante 30 anos desde a data do depósito. O depósito será tornado disponível pela ATCC segundo os termos do Tratado de Budapeste e sujeito a um acordo entre a Genentech, Inc. e a ATCC, que assegura a disponibilidade permanente e sem restrições da descendência da cultura do depósito ao público após concessão da patente U.S. pertinente ou depois de disponível ao público qualquer pedido de patente U.S. ou estrangeiro, conforme o que ocorrer primeiro, e assegura a disponibilidade da descendência a quem determinado pelo U.S. Commissioner of Patents and Trademarks ter direito a ela de acordo com 35 USC Section 122 e as Commissioner Rules que se lhes aplicam (incluindo a 37 CFR Section 1.14 com particular referência a 886 OG 638).

O cessionário do presente pedido concordou que se uma cultura dos materiais em depósito morrer ou for perdida ou destruída quando cultivada sob condições adequadas, os materiais serão prontamente substituídos por outros iguais após notificação. A disponibilidade do material depositado não deve ser entendida como uma licença para praticar o presente invento em contravenção com os direitos concedidos pela autoridade de qualquer governo de acordo com as suas leis de patentes.

O fascículo acima escrito é considerado suficiente para permitir que um perito na especialidade pratique o presente invento. O presente invento não deve ser limitado no seu âmbito pela construção depositada, uma vez que a concretização depositada pretende ser uma simples ilustração de certos aspectos do presente invento e quaisquer construções que sejam funcionalmente equivalentes estão dentro do âmbito deste invento. O depósito de material daqui não constitui uma admissão de que a descrição escrita aqui contida seja inadequada para permitir a prática de qualquer aspecto do presente invento, incluindo o melhor modo deste, nem deve ser entendido como limitante do âmbito das reivindicações para as

ilustrações específicas que representam. De facto, várias modificações do presente invento para além das aqui mostradas e descritas tornar-se-ão aparentes aos peritos na especialidade a partir da descrição antecedente.

Listagem de Sequências

<110> Genentech, Inc.

<120> Anticorpos DR4 e Suas Utilizações

<130> P1245R1P2BPCT

<141> 2000-05-25

<150> US 09/322,875

<151> 1999-05-28

<160> 12

<210> 1

<211> 468

<212> PRT

<213> Humano

<400> 1

Met	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Arg	Val	His	Leu	Gly	Ala	Phe	Leu	Ala	1	5	10	15
Val	Thr	Pro	Asn	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	20	25	30	
Ala	Ala	Thr	Pro	Ser	Lys	Val	Trp	Gly	Ser	Ser	Ala	Gly	Arg	Ile	35	40	45	
Glu	Pro	Arg	Gly	Gly	Gly	Arg	Gly	Ala	Leu	Pro	Thr	Ser	Met	Gly	50	55	60	
Gln	His	Gly	Pro	Ser	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Gly	Arg	Ala	Pro	Gly	65	70	75	
Pro	Arg	Pro	Ala	Arg	Glu	Ala	Ser	Pro	Arg	Leu	Arg	Val	His	Lys	80	85	90	
Thr	Phe	Lys	Phe	Val	Val	Val	Gly	Val	Leu	Leu	Gln	Val	Val	Pro	95	100	105	
Ser	Ser	Ala	Ala	Thr	Ile	Lys	Leu	His	Asp	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	110	115	120	
Gln	Gln	Trp	Glu	His	Ser	Pro	Leu	Gly	Glu	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	125	130	135	
Ser	His	Arg	Ser	Glu	Arg	Pro	Gly	Ala	Cys	Asn	Arg	Cys	Thr	Glu	140	145	150	
Gly	Val	Gly	Tyr	Thr	Asn	Ala	Ser	Asn	Asn	Leu	Phe	Ala	Cys	Leu	155	160	165	
Pro	Cys	Thr	Ala	Cys	Lys	Ser	Asp	Glu	Glu	Glu	Arg	Ser	Pro	Cys	170	175	180	
Thr	Thr	Thr	Arg	Asn	Thr	Ala	Cys	Gln	Cys	Lys	Pro	Gly	Thr	Phe	185	190	195	
Arg	Asn	Asp	Asn	Ser	Ala	Glu	Met	Cys	Arg	Lys	Cys	Ser	Thr	Gly	200	205	210	
Cys	Pro	Arg	Gly	Met	Val	Lys	Val	Lys	Asp	Cys	Thr	Pro	Trp	Ser	215	220	225	

Asp	Ile	Glu	Cys	Val	His	Lys	Glu	Ser	Gly	Asn	Gly	His	Asn	Ile	
				230					235					240	
Trp	Val	Ile	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Val	Val	Pro	Leu	Leu	Leu	Val	
				245					250					255	
Ala	Val	Leu	Ile	Val	Cys	Cys	Cys	Ile	Gly	Ser	Gly	Cys	Gly	Gly	
				260					265					270	
Asp	Pro	Lys	Cys	Met	Asp	Arg	Val	Cys	Phe	Trp	Arg	Leu	Gly	Leu	
				275					280					285	
Leu	Arg	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Asp	Asn	Ala	His	Asn	Glu	Ile	Leu	
				290					295					300	
Ser	Asn	Ala	Asp	Ser	Leu	Ser	Thr	Phe	Val	Ser	Glu	Gln	Gln	Met	
				305					310					315	
Glu	Ser	Gln	Glu	Pro	Ala	Asp	Leu	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Gln	Ser	
				320					325					330	
Pro	Gly	Glu	Ala	Gln	Cys	Leu	Leu	Gly	Pro	Ala	Glu	Ala	Glu	Gly	
				335					340					345	
Ser	Gln	Arg	Arg	Arg	Leu	Leu	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Ala	Asp	Pro	
				350					355					360	
Thr	Glu	Thr	Leu	Met	Leu	Phe	Phe	Asp	Lys	Phe	Ala	Asn	Ile	Val	
				365					370					375	
Pro	Phe	Asp	Ser	Trp	Asp	Gln	Leu	Met	Arg	Gln	Leu	Asp	Leu	Thr	
				380					385					390	
Lys	Asn	Glu	Ile	Asp	Val	Val	Arg	Ala	Gly	Thr	Ala	Gly	Pro	Gly	
				395					400					405	
Asp	Ala	Leu	Tyr	Ala	Met	Leu	Met	Lys	Trp	Val	Asn	Lys	Thr	Gly	
				410					415					420	
Arg	Asn	Ala	Ser	Ile	His	Thr	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Glu	Arg	Met	
				425					430					435	
Glu	Glu	Arg	His	Ala	Lys	Glu	Lys	Ile	Gln	Asp	Leu	Leu	Val	Asp	
				440					445					450	
Ser	Gly	Lys	Phe	Ile	Tyr	Leu	Glu	Asp	Gly	Thr	Gly	Ser	Ala	Val	
				455					460					465	

Ser Leu Glu

<210> 2

<211> 1407

<212> ADN

<213> Humano

<400> 2

atggcgccac caccagctag agtacatcta ggtgcgttcc tggcagtgac 50

tccgaatccc gggagcgag cgagtgggac agaggcagcc gcggccacac 100

ccagcaaaagt gtggggctct tccgcgggga ggattgaacc acgaggcggg 150

ggccgaggag cgctccctac ctccatggga cagcacggac ccagtgcccg 200

ggcccgggca gggcgcgccc caggaccag gccggcgcgg gaagccagcc 250

```

ctcggtccg ggtccacaag accttcaagt ttgtcgtcgt cggggtccg 300
ctgcaggteg tacctagctc agctgcaacc atgatcaatc aattggcaca 350
aattggcaca cagcaatggg aacatagccc tttgggagag ttgtgtccac 400
caggatctca tagatcagaa cgtcctggag cctgtaaccg gtgcacagag 450
ggtgtgggtt acaccaatgc ttccaacaat ttgtttgctt gcctcccatg 500
tacagcttgt aaatcagatg aagaagagag aagtccctgc accacgacca 550
ggaacacagc atgtcagtgc aaaccaggaa ctttccggaa tgacaattct 600
gctgagatgt gccggaagtg cagcacaggg tgccccagag ggatggtaa 650
ggtcaaggat tgtacgccct ggagtgcacat cgagtgtgtc cacaagaat 700
caggcaatgg acataatata tgggtgattt tgggtgtgac tttggttgtt 750
ccgttgctgt tgggtgctgt gctgattgtc tgttgttgca tcggctcagg 800
ttgtggaggg gacccaagt gcatggacag ggtgtgtttc tggcgttgg 850
gtctcctacg agggcctggg gctgaggaca atgctcaca cagattctg 900
agcaacgcag actcgtctgc cactttcgtc tctgagcagc aaatggaaag 950
ccaggagccg gcagatttga cagggtgtcac tgtacagtcc ccaggggagg 1000
cacagtgtct gctgggaccg gcagaagctg aaggggtctc gaggaggagg 1050
ctgctgggtc cagcaaagg tgctgacccc actgagactc tgatgctgtt 1100
ctttgacaag ttgcaaaca tegtgccctt tgactcctgg gaccagctca 1150
tgaggcagct ggacctcag aaaaatgaga tcgatgtggt cagagctggt 1200
acagcaggcc caggggatgc cttgtatgca atgctgatga aatgggtcaa 1250
caaaactgga cggaacgcct cgatccacac cctgctggat gccttggaga 1300
ggatggaaga gagacatgca aaagagaaga ttcaggacct cttggtggac 1350
tctggaaagt tcatctactt agaagatggc acaggctctg ccgtgtcctt 1400
ggagtga 1407

```

<210> 3

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<221> Sequência Artificial

<222> 2,16,17,19,21,22,27,28,31,32,34,35

<223> w=a ou t; k=g ou t; b=g ou t ou c; y=c ou t; r=a ou g; s=g ou c

<400> 3

tgagccacg gwccgwktba kytccarytt kgtssc 36

<210> 4

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<221> Sequência Artificial

<222> 27,28,31,34,39

<223> m=a ou c; r=a ou g; n=a ou g ou t ou c; s=g ou c

<400> 4

gaccgatggg cccgtcggtt tggctgmrga racngtgas 39

<210> 5

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<221> Sequência Artificial

<222> 1-36

<223> A sequência é sintetizada.

<400> 5

gctacaaatg catacgctga tatccagatg acacag 36

<210> 6

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<221> Sequência Artificial

<222> 1-36

<223> A sequência é sintetizada.

<400> 6

gctacaaacg cgtacgctca ggtgcagctg aaggag 36

<210> 7

<211> 702

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<221> Sequência Artificial

<222> 1-57

<223> Nucleótidos 1-57; é a sequência de sinal derivada do vector

<220>

<221> Sequência Artificial

<222> 58-435

<223> Os nucleótidos 58-435 são de origem murina

<220>

<221> Sequência Artificial

<222> 436-702

<223> Nucleótidos 436-702 são de origem humana

<400> 7

```

atgggatggg catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt 50
acattcagat atccagatga cacagactac atcctccctg tctgcctctc 100
tgaggagacag agtcaccatc agttgcaggg caagtcagga cattagcaat 150
tattttaaact ggtatcagcg gaaaccagat ggaactgtta aactcctgat 200
ctactacaca tcacgattac actcaggagt cccatcacgg ttcagtggca 250

gtgggtcttg aacagattat tctctcacca ttagcaacct ggaacaagaa 300
gatattgcca cttacttttg ccaacagggt aatacgcttc cattcacgtt 350
cggctcggcc accaagctgg aactaactcg gaccgtggct gcaccatctg 400
tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct 450
gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca agtacagtg 500
gaagggtggat aacgcctccc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag 550
agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
agcaaagcag actacagaaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca 650
tcaggggcctg agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt 700
aa 702

```

<210> 8

<211> 702

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<221> Sequência Artificial

<222> 1-702

<223> A sequência é sintetizada.

<400> 8

```

ttaacactct cccctgttga agctctttgt gacgggagag ctcaggccct 50
gatgggtgac ttgcgaggcg tagactttgt gtttctctga gtctgctttg 100
ctcagcgtca ggggtgctgt gaggtgttag gtgctgtcct tgctgtcctg 150
ctctgtgaca ctctcctggg agttaccgga ttggagggcg ttatccacct 200
tccactgtac tttggcctct ctgggataga agttattcag caggcacaca 250
acagaggcag ttccagatct caactgctca tcagatggcg gaaagatgaa 300
gacagatggg gcagccacgg tccgagttag ttccagcttg gtggccgagc 350
cgaacgtgaa tggaagcgta ttaccctgtt ggcaaaaagta agtggcaata 400
tcttcttgtt ccagggtgct aatgggtgaga gaataatctg ttccagaccc 450
actgccactg aaccgtgatg ggactcctga gtgtaatcgt gatgtgtagt 500
agatcaggag tttaacagtt ccatctggtt tccgctgata ccagtttaaa 550
taattgctaa tgtcctgact tgccctgcaa ctgatgggtga ctctgtctcc 600
cagagaggga gacagggagg atgtagtctg tgtcatctgg atatctgaat 650
gtactccagt tgcagttgct actagaaaaa ggatgatata tgaccatccc 700
at 702

```


<210> 10
<211> 1431
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<221> Sequência Artificial
<222> 58,60,63
<223> s=g ou c; r=a ou g; k=g ou t

<400> 10
atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt 50
acattcasar gtcagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct 100
cacagagcct gtccatcact tgcactgtct ctgggttttc attaaccagc 150
tatggtgtac actgggttcg ccagcctcca ggaaagggtc tggagtggct 200
gggagtaata tgggctgttg gaagcacaaa ttataattcg gctctcatgt 250
ccagactgag catcagcaaa gacaactcca agagccaagt tttcttaaaa 300
atgaacagtc tgcaaaactga tgacacagcc atgtactact gtgccagaga 350
gggggaattc gattactacg gtagtagtct cctatcttac cattctatga 400
acttctgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctcagc caaaacgacg 450
ggcccatcgg tcttccccct ggcacccctc tccaagagca cctctggggg 500
cacagcggcc ctgggctgcc tggteaagga ctacttcccc gaaccggtga 550
cgggtgcgtg gaactcaggc gcctgacca gggcggtgca caccttcccc 600
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tgggtgactgt 650
gccctctagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac gtgaatcaca 700
agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 750
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc 800
gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc 850
ggaccctga ggtcacatgc gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct 900
gaggtaaggt tcaactggta cgtggacggc gtggagggtgc ataatgcaa 950
gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg gtggtcagcg 1000
tcctcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1050
aagggtctca acaaagccct ccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa 1100
agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc 1150
gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1200
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga 1250
gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggetcttctt 1300
tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggca gcagggggaa 1350
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca 1400
gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg a 1431

<210> 11
 <211> 1431
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <221> Sequência Artificial
 <222> 1369, 1372, 1374
 <223> s=g ou c; y=c ou t; m=a ou c

<400> 11
 tcattttaccc ggagacaggg agaggctcctt ctgcgtgtag tggttgtgca 50
 gagcctcatg catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg 100
 ctcttgtcca cggtagactt gctgtagagg aagaaggagc cgtcggagtc 150
 cagcacggga ggcggtgtct tgtagtgtt ctccggctgc ccattgctct 200
 cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac caggcaggtc 250
 aggctgacct ggttcttggc catctcttcc cgggatgggg gcagggtgta 300
 cacctgtggt tctcggggct gccctttggc tttggagatg gttttctcga 350
 tgggggctgg gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctcttgcca 400
 ttcagccagt cctgggtgcag gacggtgagg acgctgacca cccgggtacgt 450
 gctgttgtac tgctctctcc gcggctttgt cttggcatta tgcacctcca 500
 cgccgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc gtggctcacc 550
 tccaccacca cgcagtgtac ctccggggtc cgggagatca tgagggtgtc 600
 cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggctccccc aggagtccag 650
 gtgctgggca cgggtggcat gtgtgagttt tgtcacaaga tttgggtcca 700
 actttcttgt ccaccttgtt gttgctgggc ttgtgattca cgttgcagat 750
 gtaggtctgg gtgcccagc tgcctagagg caccgtcacc acgctgctga 800
 gggagtagag tcctgaggac tgtaggacag ccgggaaggt gtgcacgccg 850
 ctggctcagg cgctgagtt ccacgacacc gtcaccggtt cggggaagta 900
 gtccttgacc aggcagccca gggccgctgt gccccagag gtgctcttgg 950
 aggagggtgc cagggggaag accgatgggc ccgtcgttt ggctgaggag 1000
 acggtgactg aggttccttg accccagaag ttcatagaat ggtaagatag 1050
 gagactacta ccgtagtaat cgaattcccc ctctctggca cagtagtaca 1100
 tggctgtgtc atcagtttgc agactgttca tttttaagaa aacttggtc 1150
 ttggagttgt ctttctgtat gctcagctc gacatgagag ccgaattata 1200
 atttgtgctt ccaacagccc atattactcc cagccactcc agacccttcc 1250
 ctggaggctg gcgaaccag tgtacacat agctgggtta tgaaaacca 1300
 gagacagtgc aagtgatgga caggctctgt gagggcgcca ccaggccagg 1350
 tcctgactcc ttcagctgma cytstgaatg tactccagtt gcagttgcta 1400
 ctgaaaaag gatgatacat gaccatccca t 1431

<210> 12
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Sequência Artificial
 <222> 1-19
 <223> Aminoácidos 1-19; é a sequência de sinal derivada do vector

<220>
 <221> Sequência Artificial
 <222> 20-145
 <223> os aminoácidos 20-145 são de origem murina

<220>
 <221> Sequência Artificial
 <222> 20
 <223> Xaa pode ser glutamina ou ácido glutâmico

<220>
 <221> Sequência Artificial
 <222> 146-476
 <223> os aminoácidos 146-476 são de origem humana

<400> 12

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	
1				5					10					15	
Gly	Val	His	Ser	Xaa	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	
				20					25					30	
Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	
				35					40					45	
Phe	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	
				50					55					60	
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Val	Gly	Ser	
				65					70					75	
Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	
				80					85					90	
Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	
				95					100					105	
Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Glu	Phe	
				110					115					120	
Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Leu	Ser	Tyr	His	Ser	Met	Asn	Phe	
				125					130					135	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	
				140					145					150	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	
				155					160					165	
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	
				170					175					180	

Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly		185	190	195
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser		200	205	210
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln		215	220	225
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val		230	235	240
Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys		245	250	255
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		260	265	270
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		275	280	285
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro		290	295	300
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		305	310	315
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		320	325	330
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly		335	340	345
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro		350	355	360
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro		365	370	375
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn		380	385	390
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		395	400	405
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr		410	415	420
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu		425	430	435
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn		440	445	450
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr		455	460	465
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						470	475	

Lisboa, 2009-07-07

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo quimérico anti-DR4 isolado que compreende:
 - a) um domínio variável da cadeia leve, em que o referido domínio variável compreende os resíduos de aminoácido 20 a 126 de SEQ ID NO:9;
 - b) um domínio CH1 da cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácido 127 a 233 de SEQ ID NO:9;
 - c) um domínio variável da cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 145 ou 22 a 145 de SEQ ID NO:12; e
 - d) os domínios CH1, CH2 e CH3 da cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 146 a 476 de SEQ ID NO:12.
2. Anticorpo quimérico anti-DR4 da reivindicação 1, em que o referido anticorpo compreende ainda uma sequência de sinal da cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácido 1 a 19 de SEQ ID NO:9.
3. Anticorpo quimérico anti-DR4 da reivindicação 1 ou da reivindicação 2, em que o referido anticorpo é um anticorpo agonista que induz apoptose em pelo menos um tipo de célula de mamífero.
4. Anticorpo quimérico anti-DR4 da reivindicação 3, em que o referido anticorpo agonista induz apoptose em pelo menos um tipo de célula de cancro de mamífero.
5. Anticorpo quimérico anti-DR4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o referido anticorpo se liga ao receptor DR4 com uma afinidade de ligação de pelo menos 10^9 M^{-1} a 10^{12} M^{-1} .
6. Anticorpo quimérico anti-DR4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 em que o referido anticorpo é conjugado com um agente citotóxico ou uma enzima activadora de um pró-fármaco.
7. Ácido nucleico isolado codificando um anticorpo quimérico anti-DR4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Vector compreendendo o ácido nucleico isolado da reivindicação 7.

9. Célula hospedeira compreendendo o vector da reivindicação 8.

10. Célula hospedeira da reivindicação 9 que é uma *E. coli*.

11. Célula hospedeira da reivindicação 9 que é uma célula de ovário de *hamster* chinês (CHO).

12. Célula hospedeira da reivindicação 9 que é uma célula de levedura.

13. Método de produção de um anticorpo quimérico anti-DR4 compreendendo a cultura da célula hospedeira de qualquer uma das reivindicações 9 a 12 e recuperação do anticorpo a partir da cultura da célula hospedeira.

14. Utilização de um anticorpo quimérico anti-DR4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 na preparação de um medicamento para induzir apoptose em células de cancro de mamífero.

15. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que as referidas células de cancro de mamífero compreendem células de cancro do cólon, cancro do pulmão de células pequenas, cancro do pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão ou carcinoma de células escamosas do pulmão.

Lisboa, 2009-07-07

RESUMO

"Anticorpos quiméricos contra DR4 e suas utilizações"

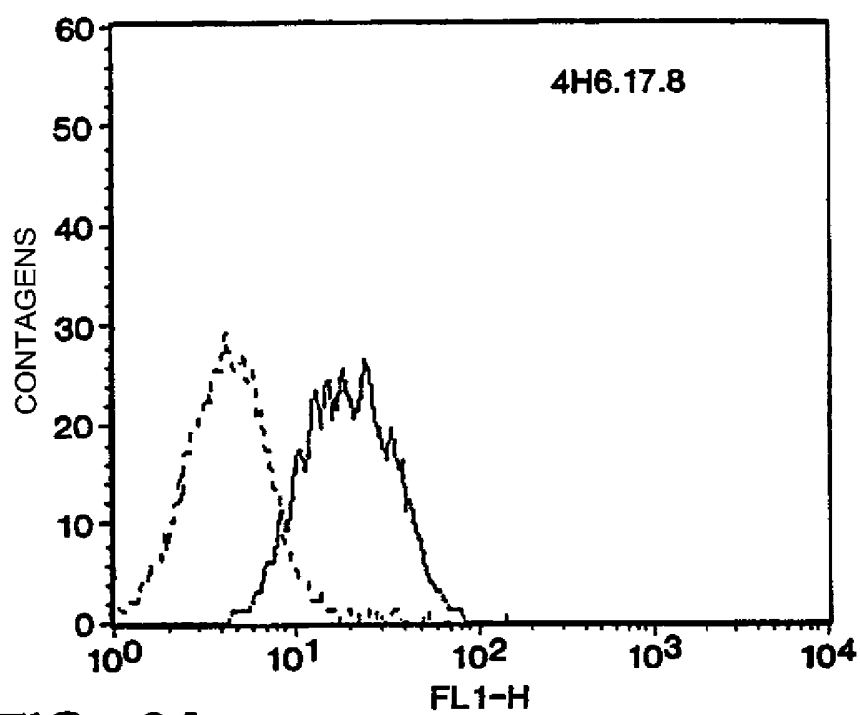
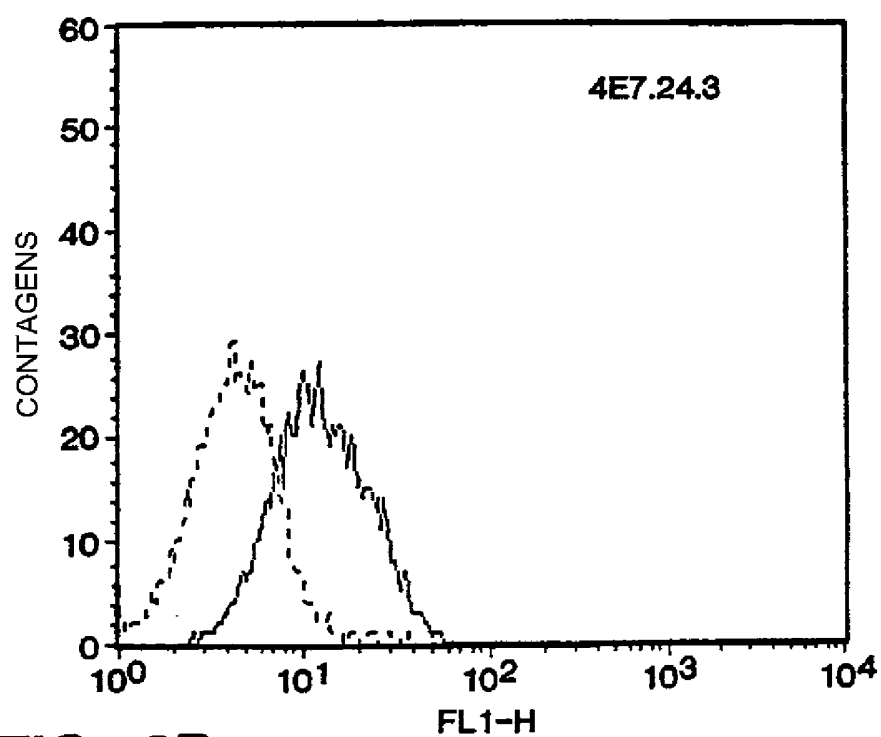
São proporcionados anticorpos do Receptor de Morte 4 (DR4, do inglês "Death Receptor 4"). Os anticorpos contra DR4 podem ser incluídos em composições farmacêuticas, artigos de fabrico ou estojos. São também proporcionados métodos de tratamento e diagnóstico utilizando os anticorpos contra DR4.

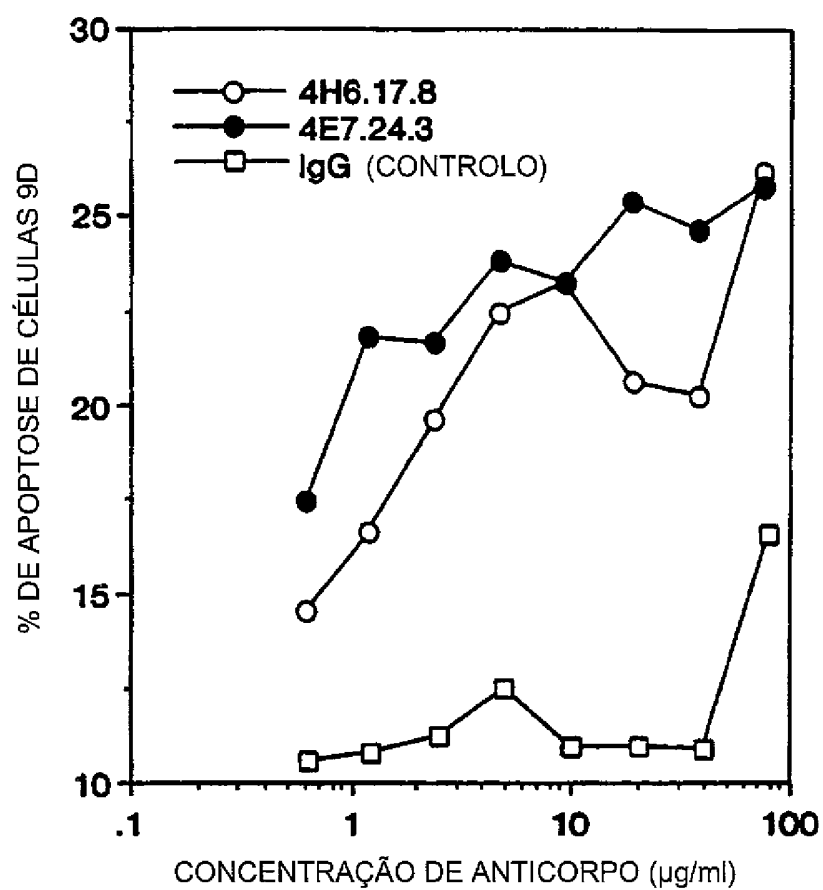
1	ATGGCGCCAC	CACCAGCTAG	AGTACATCTA	GGTGC GTTCC	TGGCAGTGAC
	TACCGCGGTG	GTGGTCGATC	TCATGTAGAT	CCACGCAAGG	ACCGTCACTG
1	MetAlaProP	roProAlaAr	gValHisLeu	GlyAlaPheL	euAlaValTh
51	TCCGAATCCC	GGGAGCGCAG	CGAGTGGGAC	AGAGGCAGCC	GCGGCCACAC
	AGGCTTAGGG	CCCTCGCGTC	GCTCACCCTG	TCTCCGTCGG	CGCCGGTGTG
	rProAsnPro	GlySerAlaA	laSerGlyTh	rGluAlaAla	AlaAlaThrPro
101	CCAGCAAAGT	GTGGGGCTCT	TCCGCGGGGA	GGATTGAACC	ACGAGGCGGG
	GGTCGTTTCA	CACCCCGAGA	AGGCGCCCCCT	CCTAACTTGG	TGCTCCGCCC
35	SerLysVa	lTrpGlySer	SerAlaGlyA	rgIleGluPr	oArgGlyGly
151	GGCCGAGGAG	CGCTCCCTAC	CTCCATGGGA	CAGCACGGAC	CCAGTGCCCCG
	CCGGCTCCTC	GCGAGGGATG	GAGGTACCCT	GTCGTGCCTG	GGTACGGGC
	GlyArgGlyA	laLeuProTh	rSerMetGly	GlnHisGlyP	roSerAlaArg
201	GGCCCGGGCA	GGGCGCGCCC	CAGGACCCAG	GCCGGCGCGG	GAAGCCAGCC
	CCGGGCCCCG	CCCGCGCGGG	GTCCTGGGTC	CGGCCGCGCC	CTTCGGTCCG
68	AlaArgAla	GlyArgAlaP	roGlyProAr	gProAlaArg	GluAlaSerP
251	CTCGGCTCCG	GGTCCACAAG	ACCTTCAAGT	TTGTCGTCGT	CGGGGTCCCTG
	GAGCCGAGGC	CCAGGTGTTC	TGGAA GTTCA	AACAGCAGCA	GCCCCAGGAC
	roArgLeuAr	gValHisLys	ThrPheLysP	heValValVa	lGlyValLeu
301	CTGCAGGTCG	TACCTAGCTC	AGCTGCAACC	ATGATCAATC	AATTGGCACA
	GACGTCCAGC	ATGGATCGAG	TCGACGTTGG	TAGTTTGAAG	TACTAGTTAG
101	LeuGlnValV	alProSerSe	rAlaAlaThr	IleLysLeuH	isAspGlnSe
351	AATTGGCACA	CAGCAATGGG	AACATAGCCC	TTTGGGAGAG	TTGTGTCCAC
	TTAACC GTGT	GTCGTTACCC	TTGTATCGGG	AAACCCTCTC	AACACAGGTG
	rIleGlyThr	GlnGlnTrpG	luHisSerPr	oLeuGlyGlu	LeuCysProPro
401	CAGGATCTCA	TAGATCAGAA	CGTCCTGGAG	CCTGTAACCG	GTGCACAGAG
	GTCCTAGAGT	ATCTAGTCTT	GCAGGACCTC	GGACATTGGC	CACGTGTCTC
135	GlySerHi	sArgSerGlu	ArgProGlyA	laCysAsnAr	gCysThrGlu
451	GGTGTGGGTT	ACACCAATGC	TTCCAACAAT	TTGTTTGCTT	GCCTCCCATG
	CCACACCCAA	TGTGGTTACG	AAGGTTGTTA	AACAAACGAA	CGGAGGGTAC
	GlyValGlyT	yrThrAsnAl	aSerAsnAsn	LeuPheAlaC	ysLeuProCys
501	TACAGCTTGT	AAATCAGATG	AAGAAGAGAG	AAGTCCCTGC	ACCACGACCA
	ATGTCGAACA	TTTAGTCTAC	TTCTTCTCTC	TTCAGGGACG	TGGTGCTGGT
168	ThrAlaCys	LysSerAspG	luGluGluAr	gSerProCys	ThrThrThrA
551	GGAACACAGC	ATGTCAGTGC	AAACCAGGAA	CTTTCCGGAA	TGACAATTCT
	CCTTGTGTCTG	TACAGTCACG	TTTGGTCCTT	GAAAGGCCTT	ACTGTTAAGA
	rgAsnThrAl	aCysGlnCys	LysProGlyT	hrPheArgAs	nAspAsnSer
601	GCTGAGATGT	GCCGGAAGTG	CAGCACAGGG	TGCCCCAGAG	GGATGGTCAA
	CGACTCTACA	CGGCCTTCAC	GTCGTGTCCC	ACGGGGTCTC	CCTACCAGTT
201	AlaGluMetC	ysArgLysCy	sSerThrGly	CysProArgG	lyMetValLy
651	GGTCAAGGAT	TGTACGCCCT	GGAGTGACAT	CGAGTGTGTC	CACAAAGAAT
	CCAGTTCCCTA	ACATGCGGGA	CCTCACTGTA	GCTCACACAG	GTGTTTCTTA
	sValLysAsp	CysThrProT	rpSerAspIl	eGluCysVal	HisLysGluSer

FIG. 1A

701	CAGGCAATGG	ACATAATATA	TGGGTGATTT	TGGTTGTGAC	TTTGGTTGTT
	GTCCGTTACC	TGTATTATAT	ACCCACTAAA	ACCAACACTG	AAACCAACAA
235	GlyAsnGly	yHisAsnIle	TrpValIleL	euValValTh	rLeuValVal
751	CCGTTGCTGT	TGGTGGCTGT	GCTGATTGTC	TGTTGTTGCA	TCGGCTCAGG
	GGCAACGACA	ACCACCGACA	CGACTAACAG	ACAACAACGT	AGCCGAGTCC
	ProLeuLeuL	euValAlaVa	lLeuIleVal	CysCysCysI	leGlySerGly
801	TTGTGGAGGG	GACCCCAAGT	GCATGGACAG	GGTGTGTTTC	TGGCGCTTGG
	AACACCTCCC	CTGGGGTTCA	CGTACCTGTC	CCACACAAAG	ACCGCGAACC
268	CysGlyGly	AspProLysC	ysMetAspAr	gValCysPhe	TrpArgLeuG
851	GTCTCCTACG	AGGGCCTGGG	GCTGAGGACA	ATGCTCACAA	CGAGATTCTG
	CAGAGGATGC	TCCCGGACCC	CGACTCCTGT	TACGAGTGTT	GCTCTAAGAC
	lyLeuLeuAr	gGlyProGly	AlaGluAspA	snAlaHisAs	nGluIleLeu
901	AGCAACGCAG	ACTCGCTGTC	CACTTTCGTC	TCTGAGCAGC	AAATGGAAAG
	TCGTTGCGTC	TGAGCGACAG	GTGAAAGCAG	AGACTCGTCG	TTTACCTTTC
301	SerAsnAlaA	spSerLeuSe	rThrPheVal	SerGluGlnG	lnMetGluSe
951	CCAGGAGCCG	GCAGATTTGA	CAGGTGTCAC	TGTACAGTCC	CCAGGGGAGG
	GGTCCTCGGC	CGTCTAAACT	GTCCACATGT	ACATGTCAGG	GGTCCCCTCC
	rGlnGluPro	AlaAspLeuT	hrGlyValTh	rValGlnSer	ProGlyGluAla
1001	CACAGTGTCT	GCTGGGACCG	GCAGAAGCTG	AAGGGTCTCA	GAGGAGGAGG
	GTGTACACAGA	CGACCCTGGC	CGTCTTCGAC	TTCCAGAGT	CTCCTCCTCC
335	GlnCysLe	uLeuGlyPro	AlaGluAlaG	luGlySerGl	nArgArgArg
1051	CTGCTGGTTC	CAGCAAATGG	TGCTGACCCC	ACTGAGACTC	TGATGCTGTT
	GACGACCAAG	GTCGTTTACC	ACGACTGGGG	TGACTCTGAG	ACTACGACAA
	LeuLeuValP	roAlaAsnGl	yAlaAspPro	ThrGluThrL	euMetLeuPhe
1101	CTTTGACAAG	TTTGCAAACA	TCGTGCCCTT	TGACTCCTGG	GACCAGCTCA
	GAAACTGTTC	AAACGTTTGT	AGCACGGGAA	ACTGAGGACC	CTGGTCGAGT
368	PheAspLys	PheAlaAsnI	leValProPh	eAspSerTrp	AspGlnLeuM
1151	TGAGGCAGCT	GGACCTCACG	AAAAATGAGA	TCGATGTGGT	CAGAGCTGGT
	ACTCCGTGCGA	CCTGGAGTGC	TTTTTACTCT	AGCTACACCA	GTCTCGACCA
	etArgGlnLe	uAspLeuThr	LysAsnGluI	leAspValVa	lArgAlaGly
1201	ACAGCAGGCC	CAGGGGATGC	CTTGTATGCA	ATGCTGATGA	AATGGGTCAA
	TGTCGTCCGG	GTCCCCTACG	GAACATACGT	TACGACTACT	TTACCCAGTT
401	ThrAlaGlyP	roGlyAspAl	aLeuTyrAla	MetLeuMetL	ysTrpValAs
1251	CAAAACTGGA	CGGAACGCCT	CGATCCACAC	CCTGCTGGAT	GCCTTGAGAG
	GTTTTGACCT	GCCTTGCGGA	GCTAGGTGTG	GGACGACCTA	CGGAACCTCT
	nLysThrGly	ArgAsnAlaS	erIleHisTh	rLeuLeuAsp	AlaLeuGluArg
1301	GGATGGAAGA	GAGACATGCA	AAAGAGAAGA	TTCAGGACCT	CTTGGTGGAC
	CCTACCTTCT	CTCTGTACGT	TTTCTCTTCT	AAGTCCTGGA	GAACCACCTG
435	MetGluGl	uArgHisAla	LysGluLysI	leGlnAspLe	uLeuValAsp
1351	TCTGGAAAGT	TCATCTACTT	AGAAGATGGC	ACAGGCTCTG	CCGTGTCTTT
	AGACCTTTCA	AGTAGATGAA	TCTTCTACCG	TGTCCGAGAC	GGCACAGGAA
	SerGlyLysP	heIleTyrLe	uGluAspGly	ThrGlySerA	laValSerLeu
1401	GGAGTGA				
	CCTCACT				
468	GluOP*				

FIG. 1B

**FIG._2A****FIG._2B**

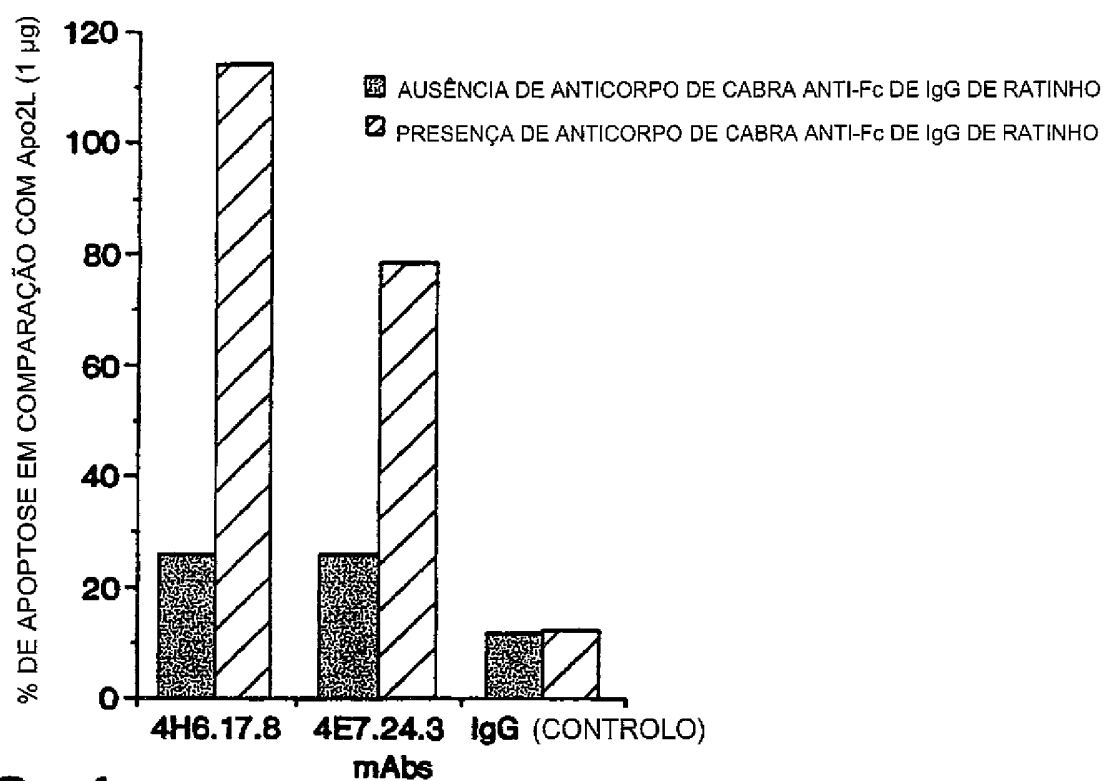
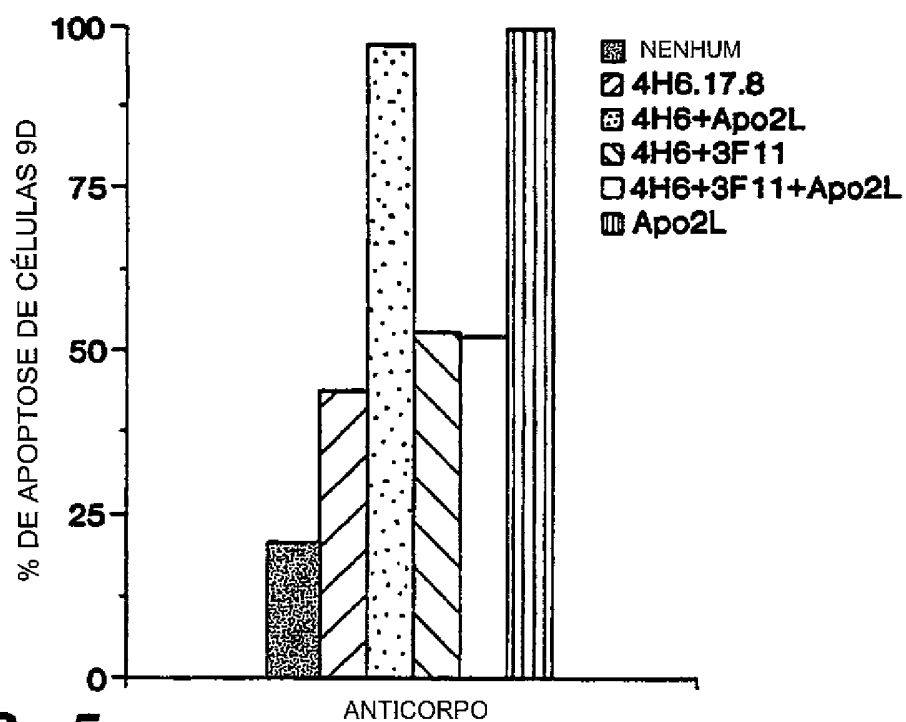
**FIG. 3**

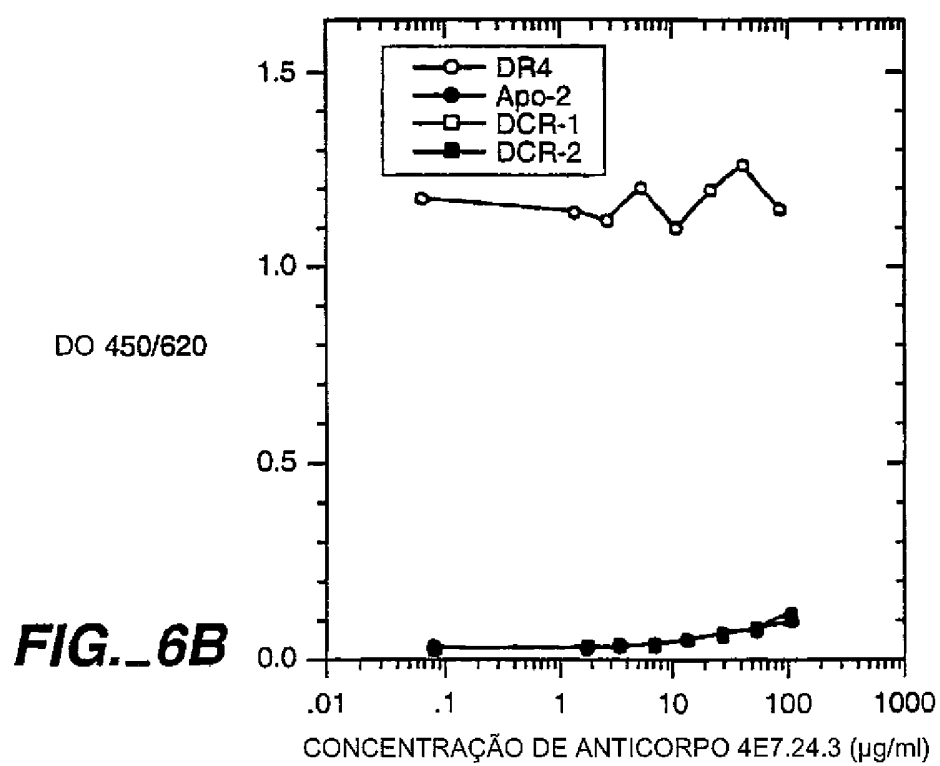
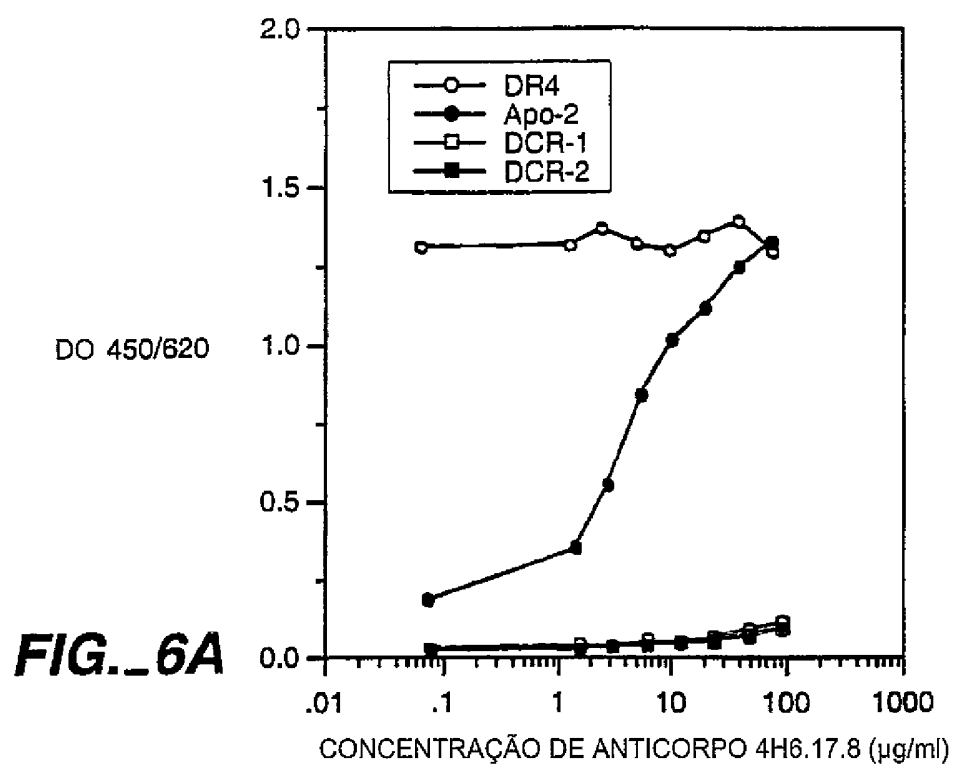
AFINIDADES DE Apo2R E mAb

AFINIDADE (pM)		
DR4-IgG	para Apo2L	82
DR5-IgG	para Apo2L	1
mAb 4E7	para DR4-IgG	2
mAb 4H6	para DR4-IgG	5
mAb 5G11	para DR4-IgG	22
mAb 3F11	para DR5-IgG	20
mAb 3H3	para DR5-IgG	3

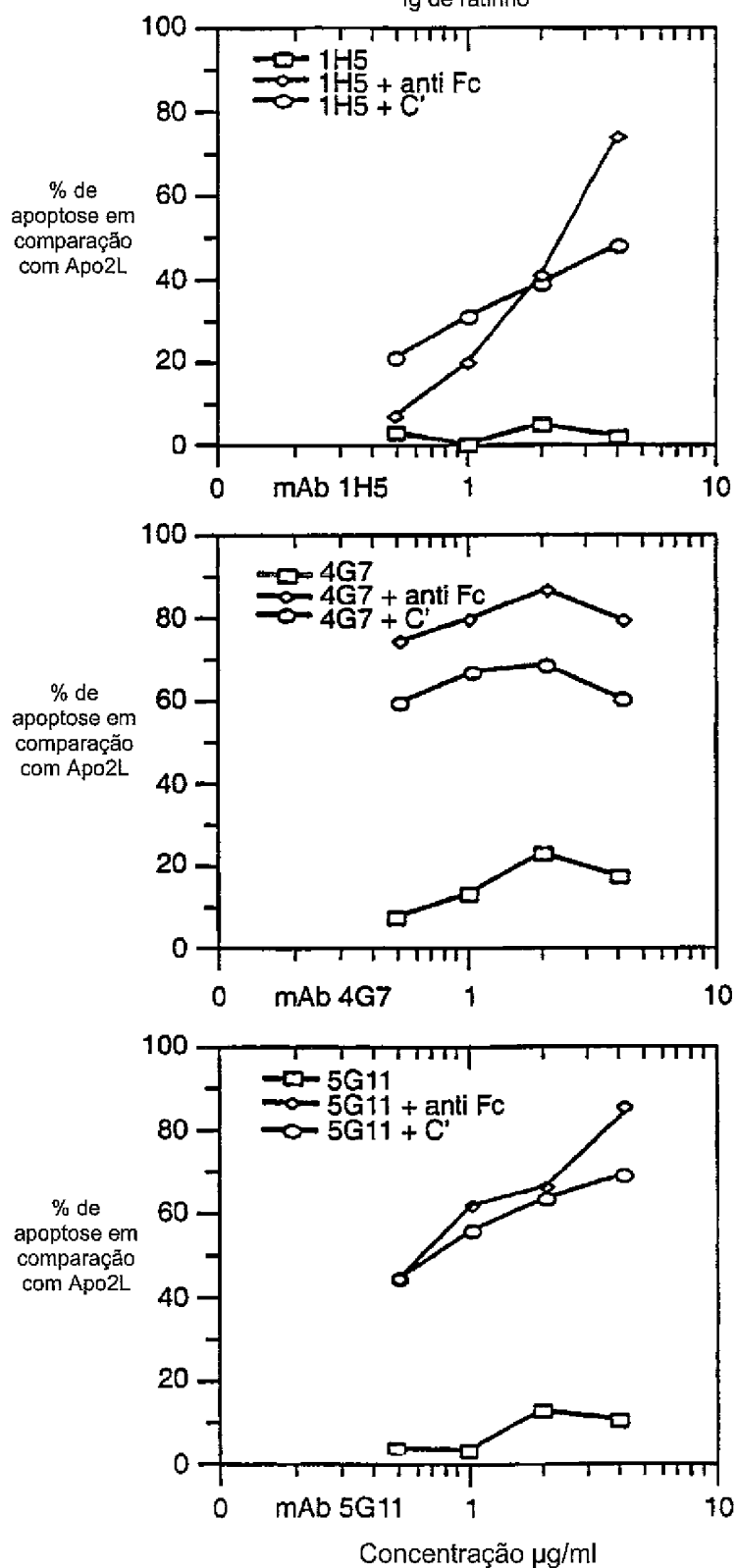
As afinidades foram determinadas utilizando KinExA

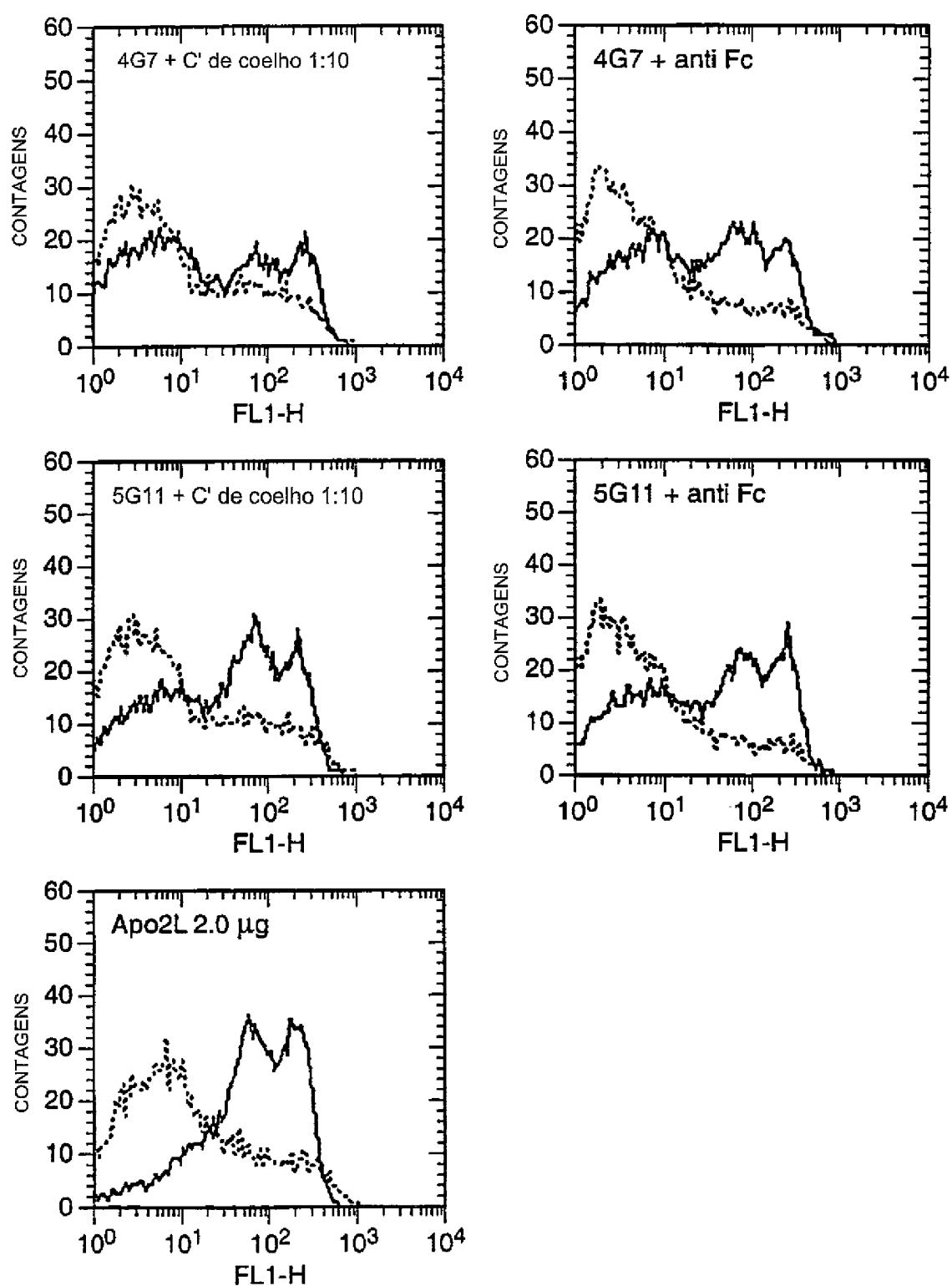
FIG. 7

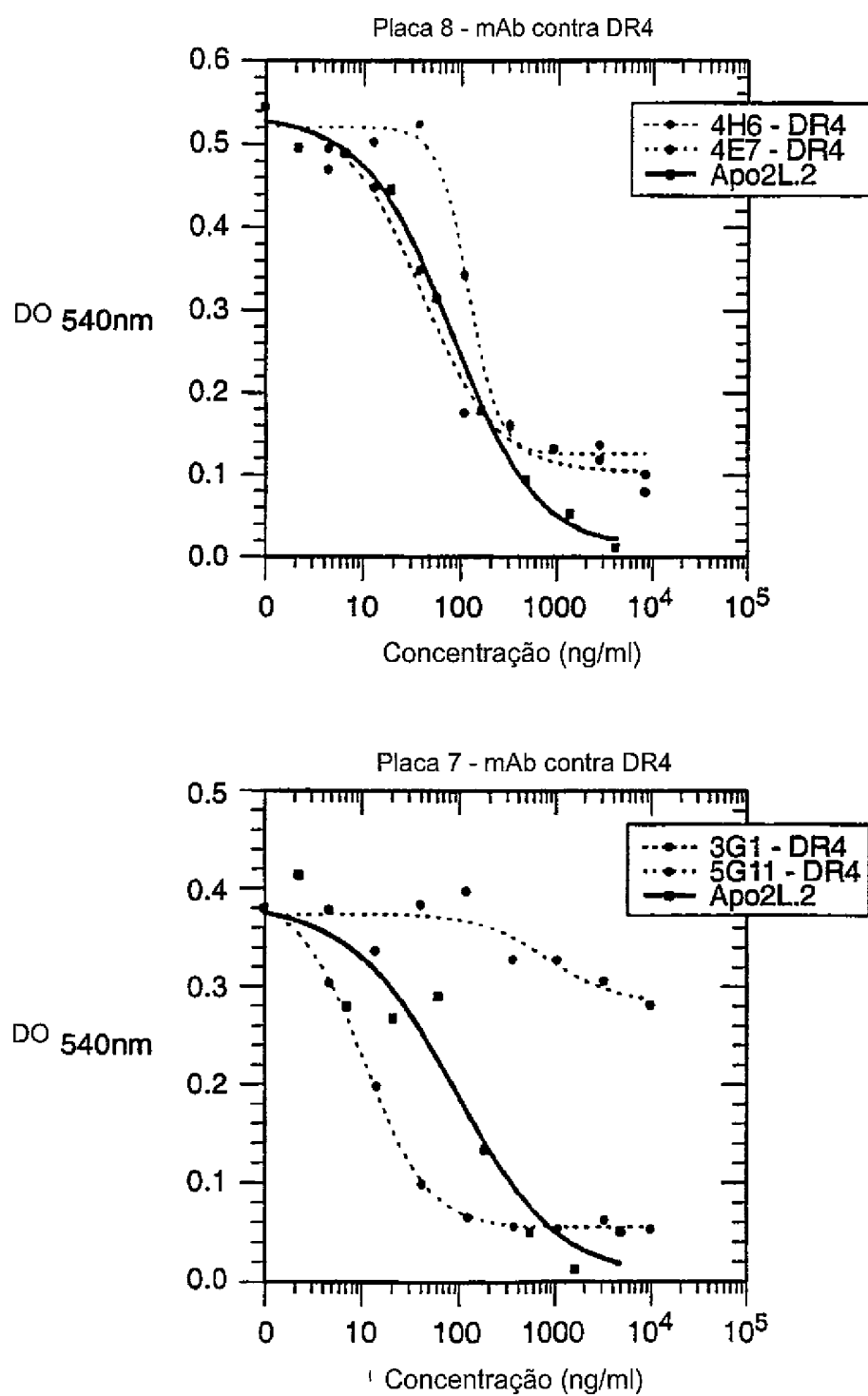
**FIG._4****FIG._5**

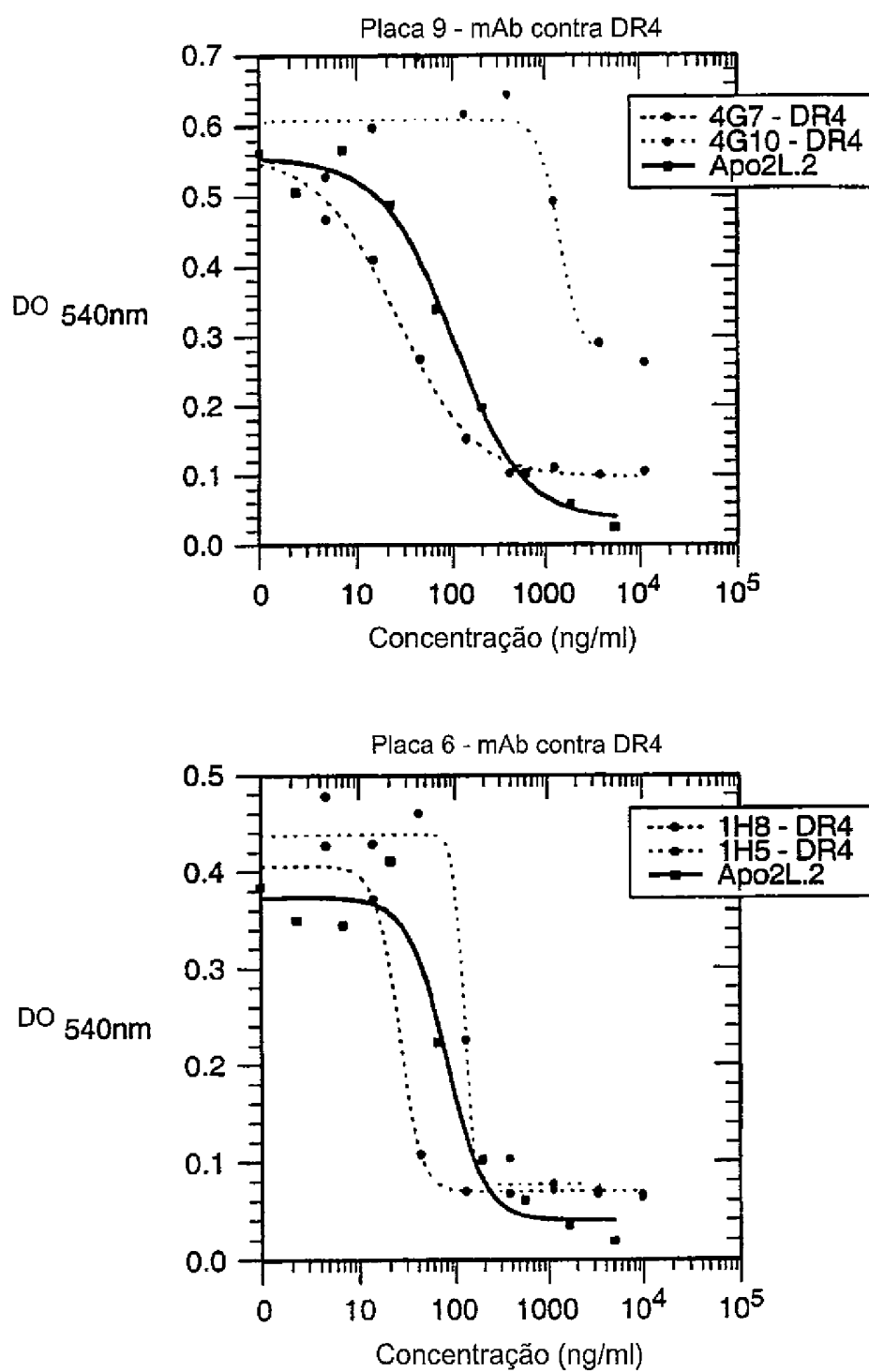


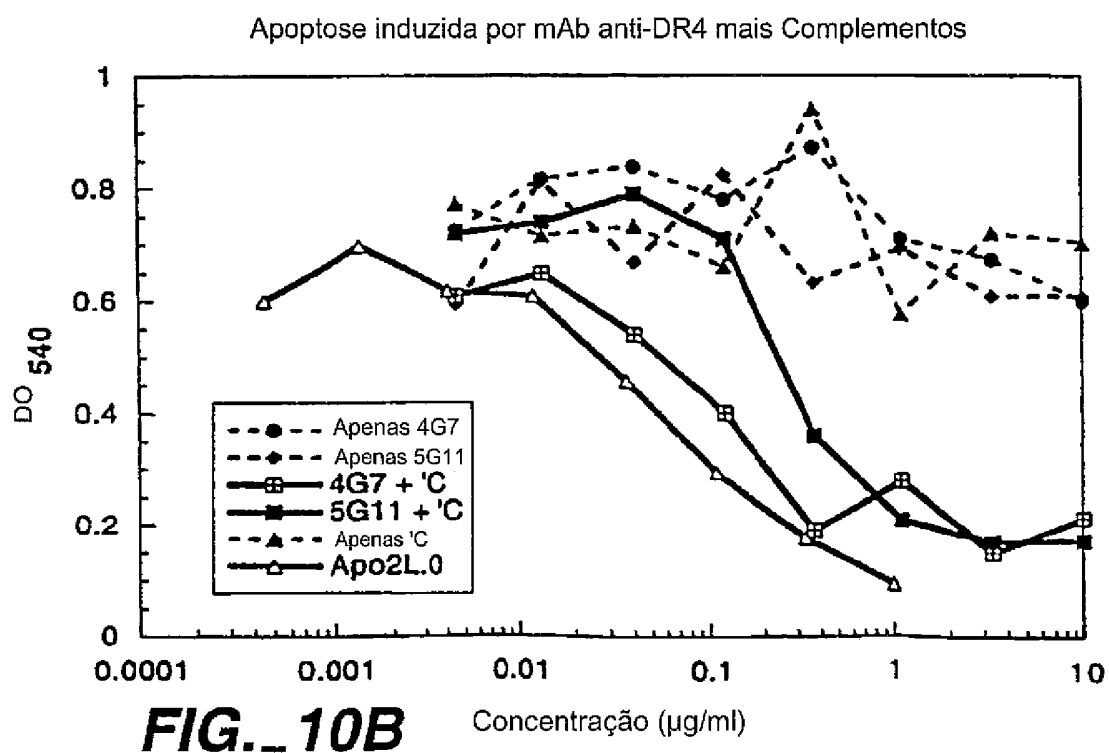
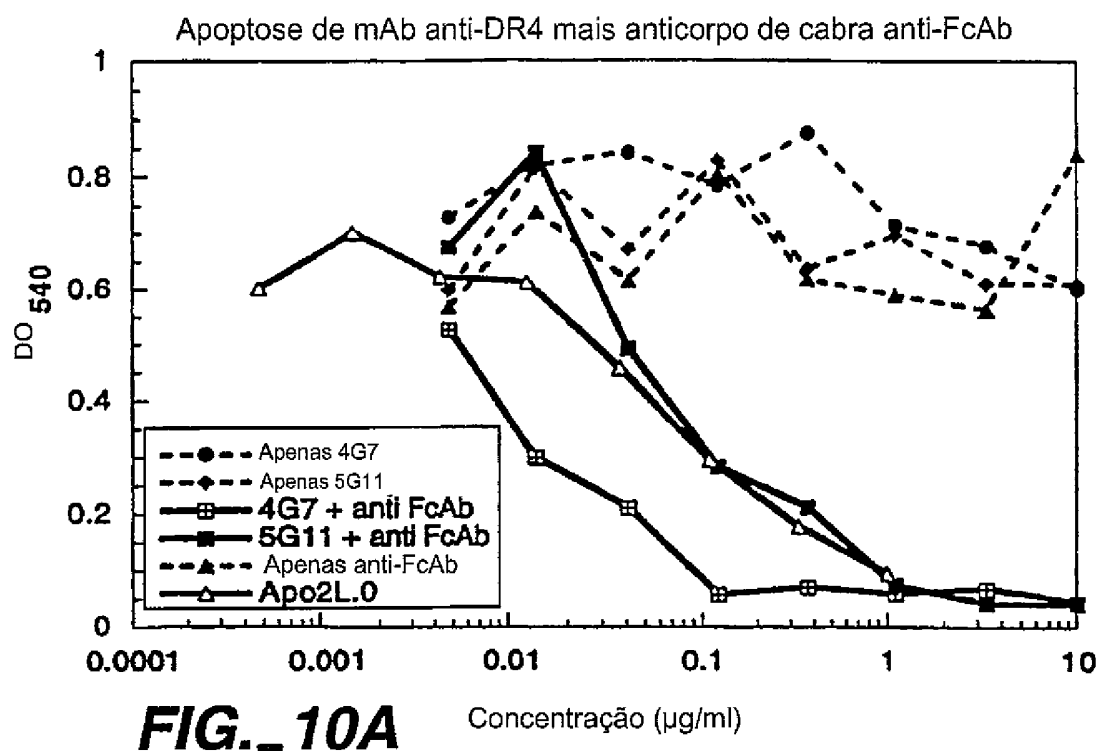
Apoptose de células 9D através de mAb anti-DR4
mais complementos ou anticorpo de cabra anti-Fc de
Ig de ratinho

FIG. 8A

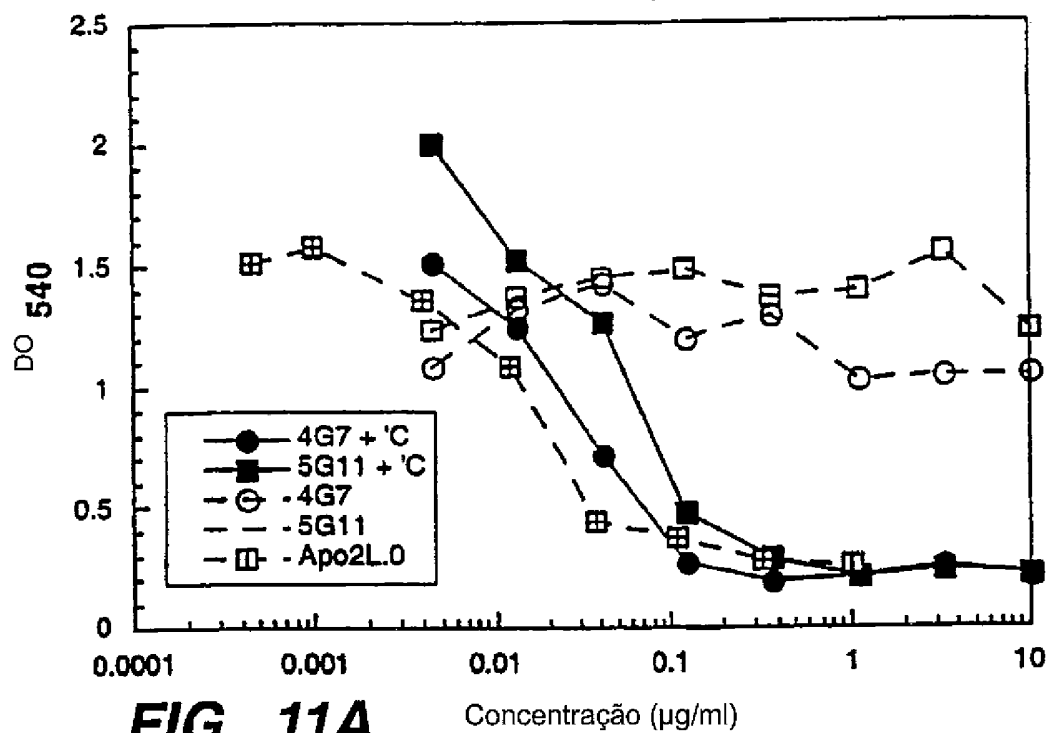
**FIG. 8B**

**FIG. 9A**

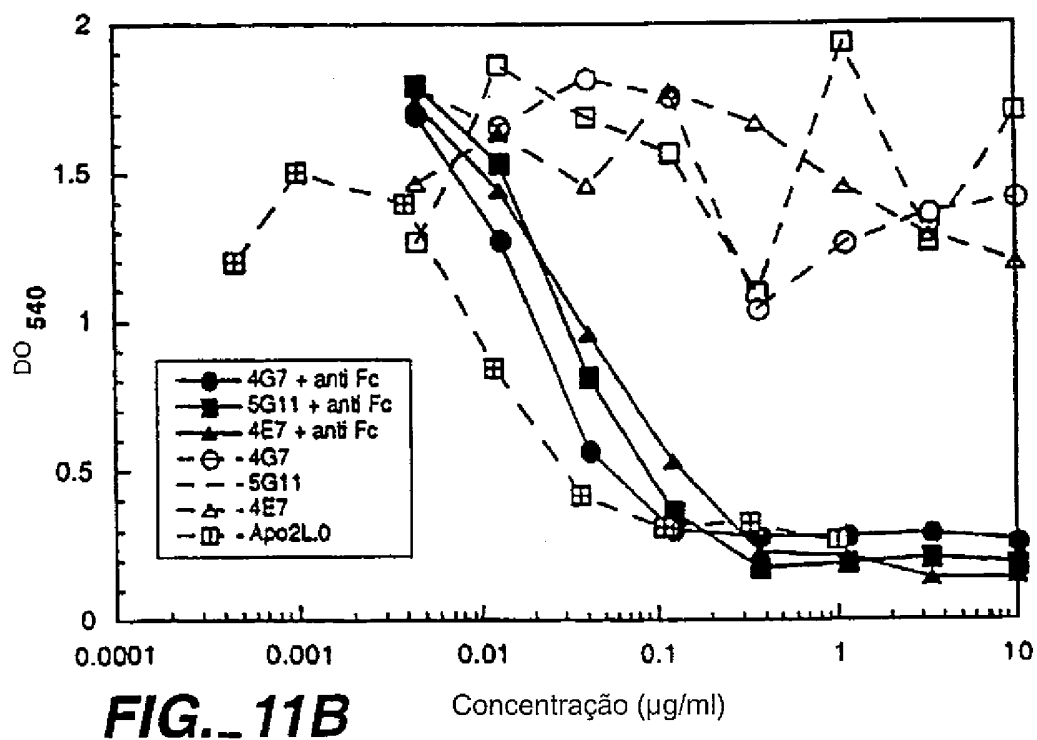
**FIG. 9B**

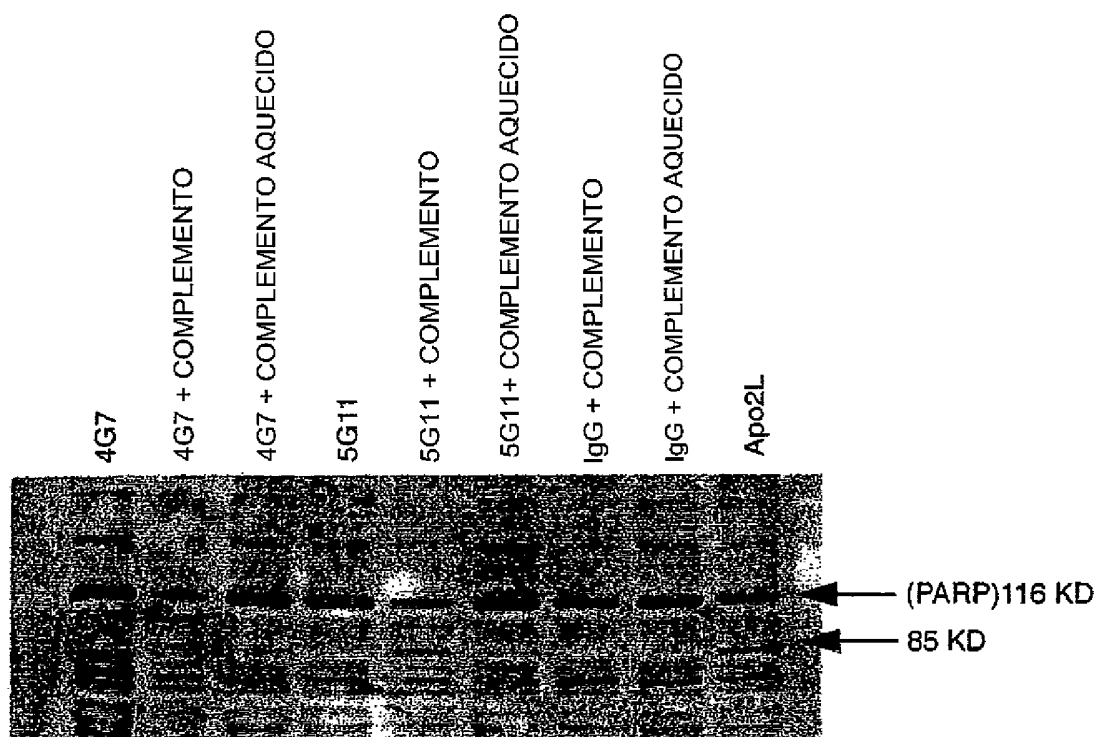
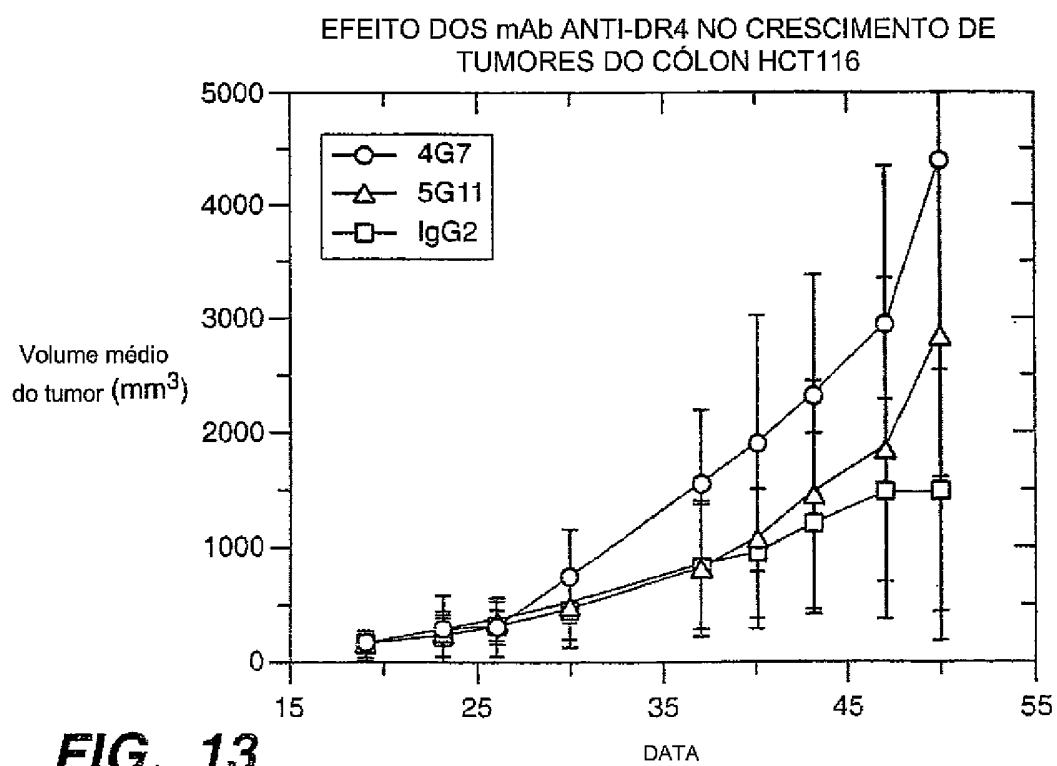


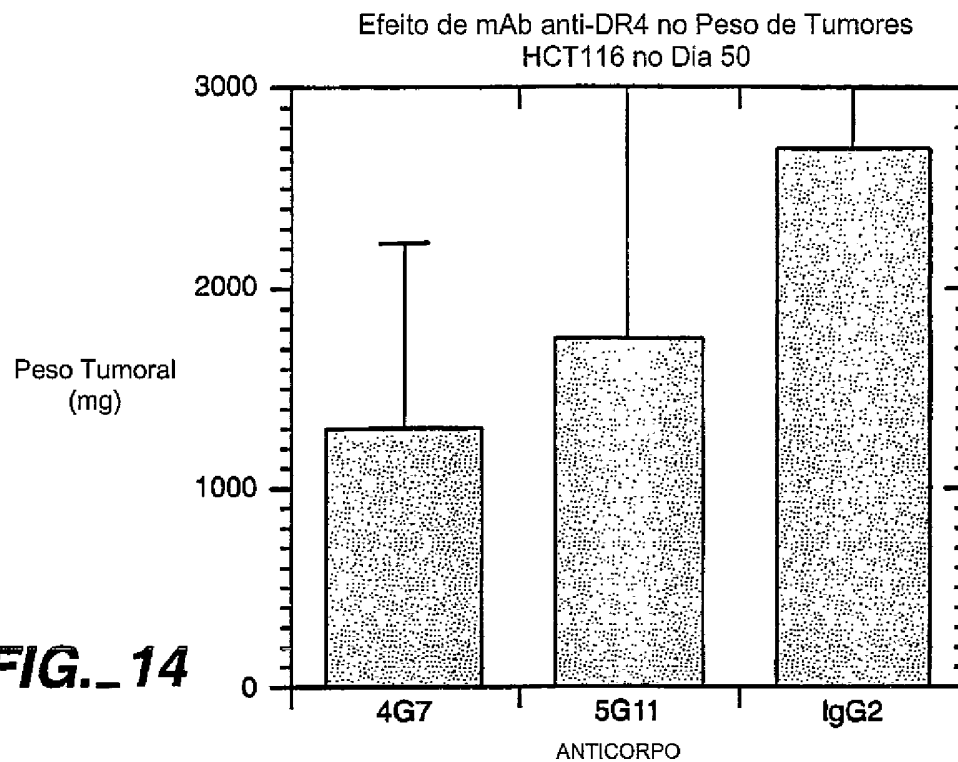
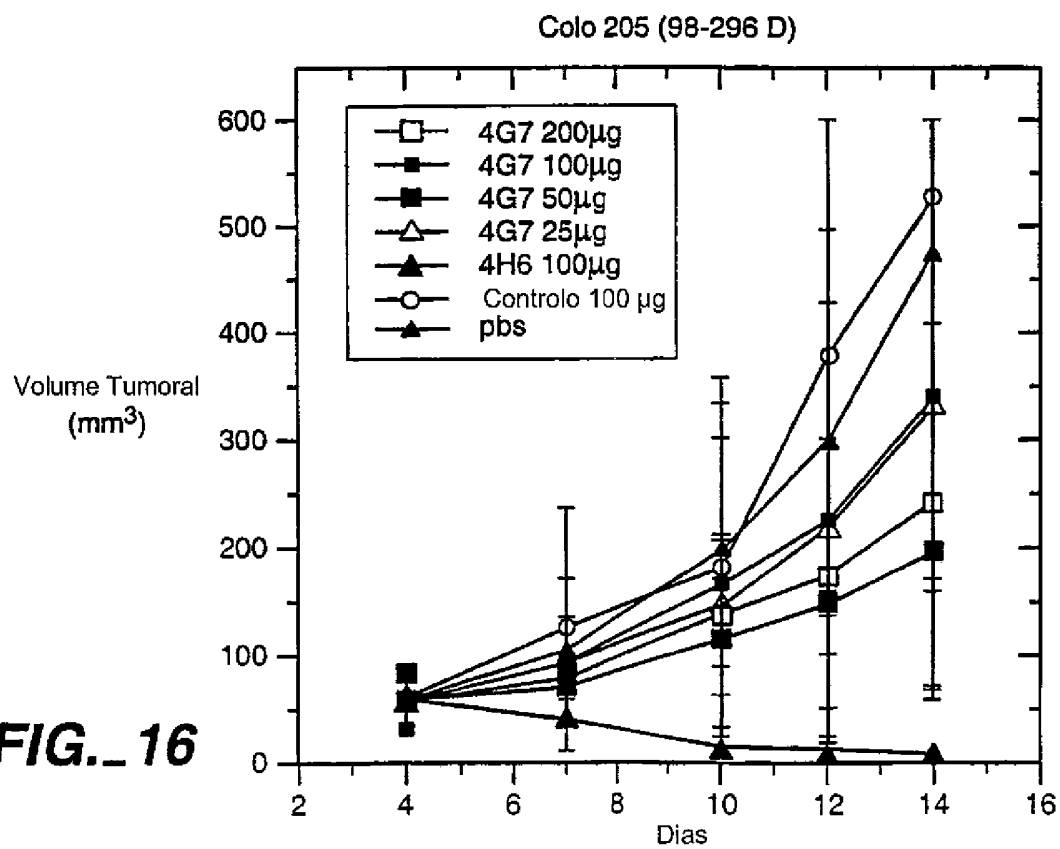
Efeito de mAb anti-DR4 com complemento em HCT116

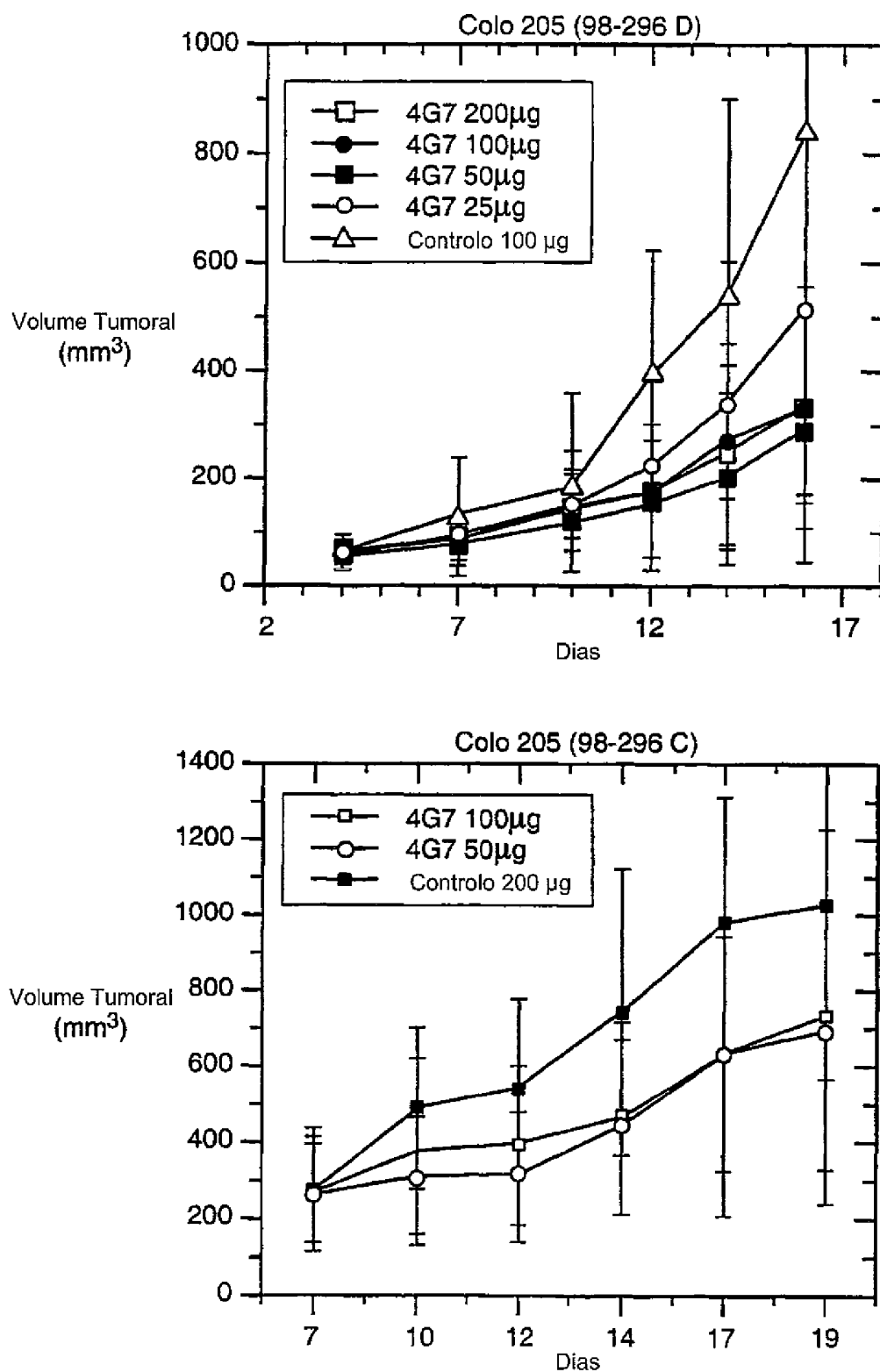


Efeito de mAb anti-DR4 com anti-Fc de Ig em HCT116



**FIG. 12****FIG. 13**

**FIG._14****FIG._16**

**FIG. 15**

Características gerais dos mAb anti-DR4

Isotipo	Kd-1 (pm)	Apop w/o L	Apop + &Fc	Apop + C'	Bloqueio	Reactividade cruzada			
						DR4	DR5	DCR1	DCR2
1H5.24.9	2		-	-	ND	+++	-	-	-
1H8.17.5			+	ND	ND	+++	-	-	-
3G1.17.2			-	ND	-	+++	-	-	-
4E7.24.3		+/-	+	-	-	+++	+	-	+/-
4G7.18.8	5	+/-	+	+	-	+++	-	-	-
4H6.17.8		+/-	+	-	+	+++	+	-	-
4G10.20.6			+	ND	-	+++	+	-	-
5G11.17.1	22		+	+	ND	+++	++	-	-

Todos estes mAb reconhecem DR4 em células 9D e imunoprecipitam DR4-IgG.
w/o L: A capacidade apoptótica dos mAb por si próprios foi detectada em células 9D, células skmes, HCT116 e colo205
+&Fc: A capacidade apoptótica dos mAb foi determinada em combinação com anti-Fc de IgG de ratinho de cabra.
+C': A capacidade apoptótica dos mAb foi determinada na presença de complemento de coelho
O grau de ligação (+) a DR5 pelos mAb 4E7 e 4H6 a 10 µg/ml é de 15% a ligação a DR4.

FIG._17

< 4H6ApDR1
 < 4H6 anti-DR4, Variável de murídeo, constante capa humana
 < ELEMENTO: Componente (início: 1557/1559; fim: 5390/5390)
 < Comprimento: 702

929 AT GGGATGGTCA TGTATCATCC TTTTCTAGT AGCAACTGCA
 TA CCCTACCAGT ACATAGTAGG AAAAAGATCA TCGTTGACGT
 1 M G W S C I I L F L V A T A

^Sequência de sinal

971 ACTGGAGTAC ATTCAGATAT CCAGATGACA CAGACTACAT CCTCCCTGTC
 TGACCTCATG TAAGTCTATA GGTCTACTGT GTCTGATGTA GGAGGGACAG
 15 T G V H S D I Q M T Q T T S S L S

^D é o primeiro aminoácido da variável

FR1

1021 TGCCTCTCTG GGAGACAGAG TCACCATCAG TTGCAGGGCA AGTCAGGACA
 ACGGAGAGAC CCTCTGTCTC AGTGGTAGTC AACGTCCCGT TCAGTCCTGT
 32 A S L G D R V T I S C R A S Q D I

FR1

CDR1

1071 TTAGCAATTA TTTAACTGG TATCAGCGGA AACCAGATGG AACTGTTAAA
 AATCGTTAAT AAATTGACC ATAGTCGCCT TTGGTCTACC TTGACAATTT
 49 S N Y L N W Y Q R K P D G T V K

CDR1

FR2

1121 CTCCTGATCT ACTACACATC ACGATTACAC TCAGGAGTCC CATCACGGTT
 GAGGACTAGA TGATGTGTAG TGCTAATGTG AGTCCTCAGG GTAGTGCCAA
 65 L L I Y Y T S R L H S G V P S R F

FR2

CDR2

FR3

FIG. 18A

1171 CAGTGGCAGT GGGTCTGGAA CAGATTATTC TCTCACCATT AGCAACCTGG
 GTCACCGTCA CCCAGACCTT GTCTAATAAG AGAGTGGTAA TCGTTGGACC
 82 S G S G S G T D Y S L T I S N L E
 FR3
 1221 AACAGAAGA TATTGCCACT TACTTTTGCC AACAGGGTAA TACGCTTCCA
 TTGTTCTTCT ATAACGGTGA ATGAAAACGG TTGTCCCATT ATGCGAAGGT
 99 Q E D I A T Y F C Q Q G N T L P
 FR3 CDR3
 1271 TTCACGTTCTG GCTCGGCCAC CAAGCTGGAA CTAACCTCGGA CCGTGGCTGC
 AAGTGCAAGC CGAGCCGGTG GTTCGACCTT GATTGAGCCT GGCACCGACG
 115 F T F G S A T K L E L T R T V A A
 CDR3 FR4 CH1
 1321 ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG AAATCTGGAA
 TGGTAGACAG AAGTAGAAGG GCGGTAGACT ACTCGTCAAC TTTAGACCTT
 132 P S V F I F P P S D E Q L K S G T
 CH1
 1371 CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG AGAGGCCAAA
 GACGGAGACA ACACACGGAC GACTTATTGA AGATAGGGTC TCTCCGGTTT
 149 A S V V C L L N N F Y P R E A K
 CH1
 1421 GTACAGTGGG AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT CCCAGGAGAG
 CATGTCACCT TCCACCTATT GCGGGGAGTT AGCCCATTTGA GGGTCCTCTC
 165 V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
 CH1
 1471 TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC AGCAGCACCC
 ACAGTGTCTC GTCCTGTCGT TCCTGTCGTG GATGTCGGAG TCGTCGTGGG
 182 V T E Q D S K D S T Y S L S S T L
 CH1
 1521 TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA CGCCTGCGAA

FIG. 18B

ACTGCGACTC GTTTCGTCTG ATGCTCTTTG TGTTCAGAT GCGGACGCTT
 199 T L S K A D Y E K H K V Y A C E
 CH1
 1571 GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT TCAACAGGGG
 CAGTGGGTAG TCCCGGACTC GAGCGGGCAG TGTTCCTCGA AGTTGTCCCC
 215 V T H Q G L S S P V T K S F N R G
 CH1
 1621 AGAGTGTTAA
 TCTCACAATT
 232 E C O

FIG. 18C

< CADEIA PESADA da versão 1 MaE11 humanizada
 < 4H6 anti-DR4, Variável de murídeo, constante pesada de IgG1 humana
 < 4H6Amonómero
 < Comprimento: 1431

```

930 A TGGGATGGTC ATGTATCATC CTTTTTCTAG TAGCAACTGC
    T ACCCTACCAG TACATAGTAG GAAAAAGATC ATCGTTGACG
  1 M  G W S  C I I  L F L V  A T A
    ^Sequência de sinal

971 AACTGGAGTA CATTCAGAAG TTCAGCTGAA GGAGTCAGGA CCTGGCCTGG
    TTGACCTCAT GTAAGTCTTC AAGTCGACTT CCTCAGTCCT GGACCGGACC
  15 T  G V  H S E V  Q L K  E S G  P G L V
        ^E é o aminoácido 1 da pesada variável
                                FR1

1021 TGGCGCCCTC ACAGAGCCTG TCCATCACTT GCACTGTCTC TGGGTTTTCA
    ACCGCGGGAG TGTCTCGGAC AGGTAGTGAA CGTGACAGAG ACCCAAAGT
  32  A P S  Q S L  S I T C  T V S  G F S
                                FR1

1071 TTAACCAGCT ATGGTGTACA CTGGGTTTCGC CAGCCTCCAG GAAAGGGTCT
    AATTGGTCGA TACCACATGT GACCCAAGCG GTCGGAGGTC CTTTCCCAGA
  48 L T S Y  G V H  W V R  Q P P G  K G L
    _____ CDR1 _____ FR2

1121 GGAGTGGCTG GGAGTAATAT GGGCTGTTGG AAGCACAAAT TATAATTCCG
    CCTCACCAGC CCTCATTATA CCCGACAACC TTCGTGTTTA ATATTAAGCC
  65  E W L  G V I W  A V G  S T N  Y N S A
    _____ FR2 _____ CDR2

1171 CTCTCATGTC CAGACTGAGC ATCAGCAAAG ACAACTCCAA GAGCCAAGTT

```

FIG._ 18D

```

      GAGAGTACAG GTCTGACTCG TAGTCGTTTC TGTGAGGTT CTCGGTTCAA
82    L  M  S     R  L  S  I  S  K  D  N  S  K  S  Q  V  
      CDR2                                FR3

1221 TTCTTAAAAA TGAACAGTCT GCAAAGTAT GACACAGCCA TGTACTACTG
      AAGAATTTTT ACTTGTCAGA CGTTTGACTA CTGTGTCGGT ACATGATGAC
98    F  L  K  M  N  S  L  Q  T  D  D  T  A  M  Y  Y  C  
      FR3

1271 TGCCAGAGAG GGGGAATTCG ATTACTACGG TAGTAGTCTC CTATCTTACC
      ACGGCTCTCTC CCCCTTAAGC TAATGATGCC ATCATCAGAG GATAGAATGG
115   A  R  E  G  E  F  D  Y  Y  G  S  S  L  L  S  Y  H  
      FR3                                CDR3

1321 ATTCTATGAA CTTCTGGGGT CAAGGAACCT CAGTCACCGT CTCCTCAGCC
      TAAGATACTT GAAGACCCCA GTTCCTTGGA GTCAGTGGCA GAGGAGTCGG
132   S  M  N  F  W  G  Q  G  T  S  V  T  V  S  S  A  
      CDR3                                FR4                                CH1

1371 AAAACGACGG GCCCATCGGT CTTCCCCCTG GCACCCTCCT CCAAGAGCAC
      TTTTGCTGCC CGGGTAGCCA GAAGGGGGAC CGTGGGAGGA GGTTCCTCGT
148   K  T  T  G  P  S  V  F  P  L  A  P  S  S  K  S  T  
      CH1

1421 CTCTGGGGGC ACAGCGGGCC TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG
      GAGACCCCCG TGTCGCCGGG ACCCGACGGA CCAGTTCCTG ATGAAGGGGC
165   S  G  G  T  A  A  L  G  C  L  V  K  D  Y  F  P  E  
      CH1

1471 AACCGGTGAC GGTGTCGTGG AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC
      TTGGCCACTG CCACAGCACC TTGAGTCCGC GGGACTGGTC GCCGCACGTG
182   P  V  T  V  S  W  N  S  G  A  L  T  S  G  V  H  
      CH1

```

FIG. 18E

1521 ACCTTCCCGG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA CTCTACTCCC TCAGCAGCGT
 TGGAAGGGCC GACAGGATGT CAGGAGTCCT GAGATGAGGG AGTCGTCGCA
 198 T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
 CH1
 1571 GGTGACTGTG CCCTCTAGCA GCTTGGGCAC CCAGACCTAC ATCTGCAACG
 CCACTGACAC GGGAGATCGT CGAACCCGTG GGTCTGGATG TAGACGTTGC
 215 V T V P S S S L G T Q T Y I C N V
 CH1
 1621 TGAATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGAAAGT TGAGCCCCAA
 ACTTAGTGTT CGGGTCGTTG TGGTTCCACC TGTTCTTTCA ACTCGGGTTT
 232 N H K P S N T K V D K K V E P K
 CH1
 1671 TCTTGTGACA AAACCTCACAC ATGCCCACCG TGCCCAGCAC CTGAACTCCT
 AGAACACTGT TTTGAGTGTG TACGGGTGGC ACGGGTCGTG GACTTGAGGA
 248 S C D K T H T C P P C P A P E L L
 CH1
 1721 GGGGGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAAG GACACCCCTCA
 CCCCCCTGGC AGTCAGAAGG AGAAGGGGGG TTTTGGGTTC CTGTGGGAGT
 265 G G P S V F L F P P K P K D T L M
 CH2
 1771 TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC
 ACTAGAGGGC CTGGGGACTC CAGTGTACGC ACCACCACCT GCACTCGGTG
 282 I S R T P E V T C V V V D V S H
 CH2
 1821 GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC GTGGACGGCG TGGAGGTGCA
 CTTCTGGGAC TCCAGTTCAA GTTGACCATG CACCTGCCGC ACCTCCACGT
 298 E D P E V K F N W Y V D G V E V H
 CH2
 1871 TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA GTACAACAGC ACGTACCGGG
 ATTACGGTTC TGTTTCGGCG CCCTCCTCGT CATGTTGTCG TGCATGGCCC
 315 N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V
 CH2

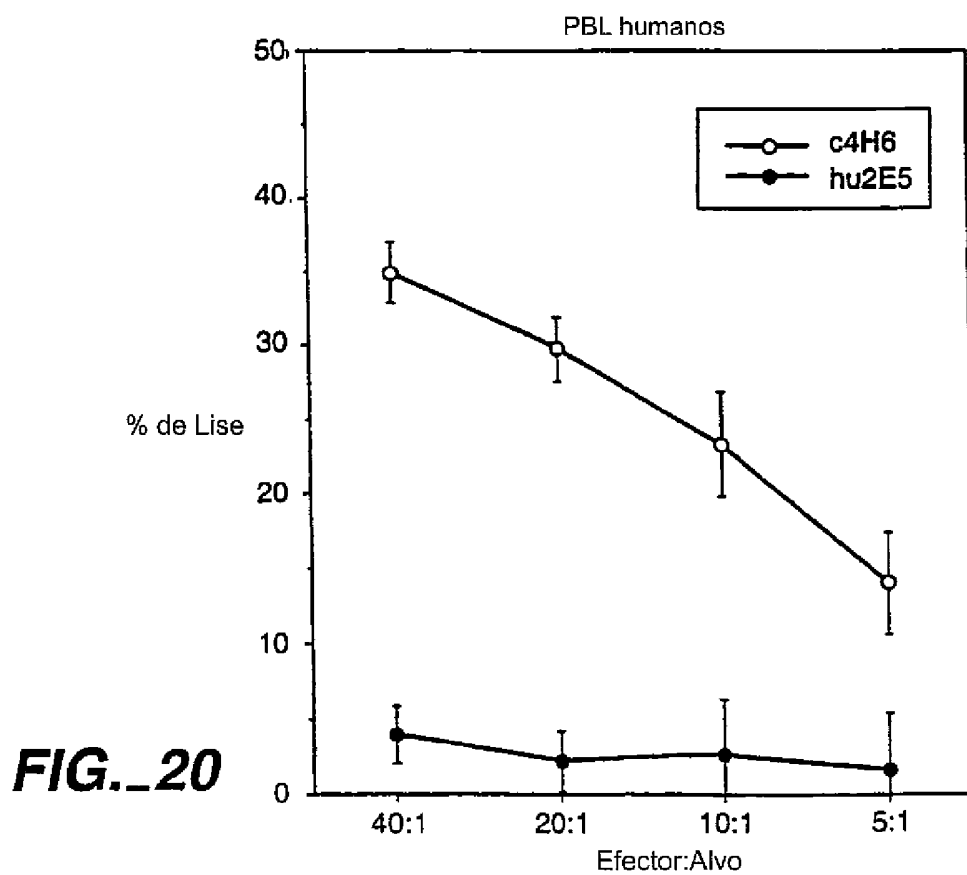
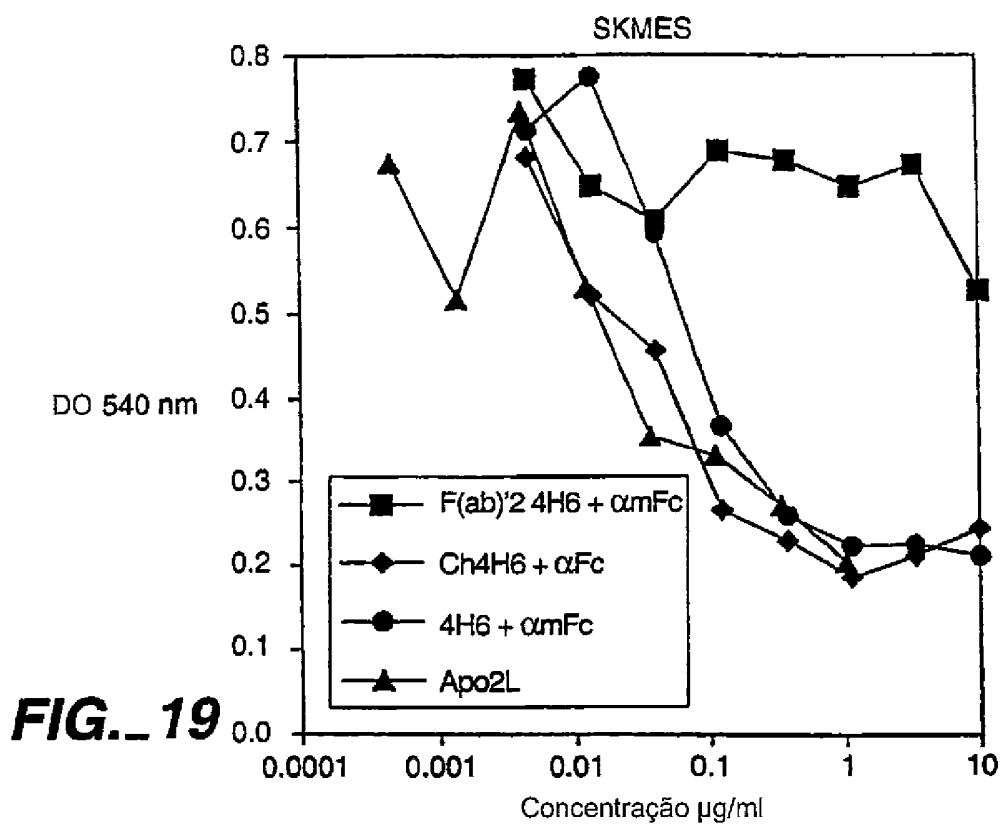
FIG. 18F

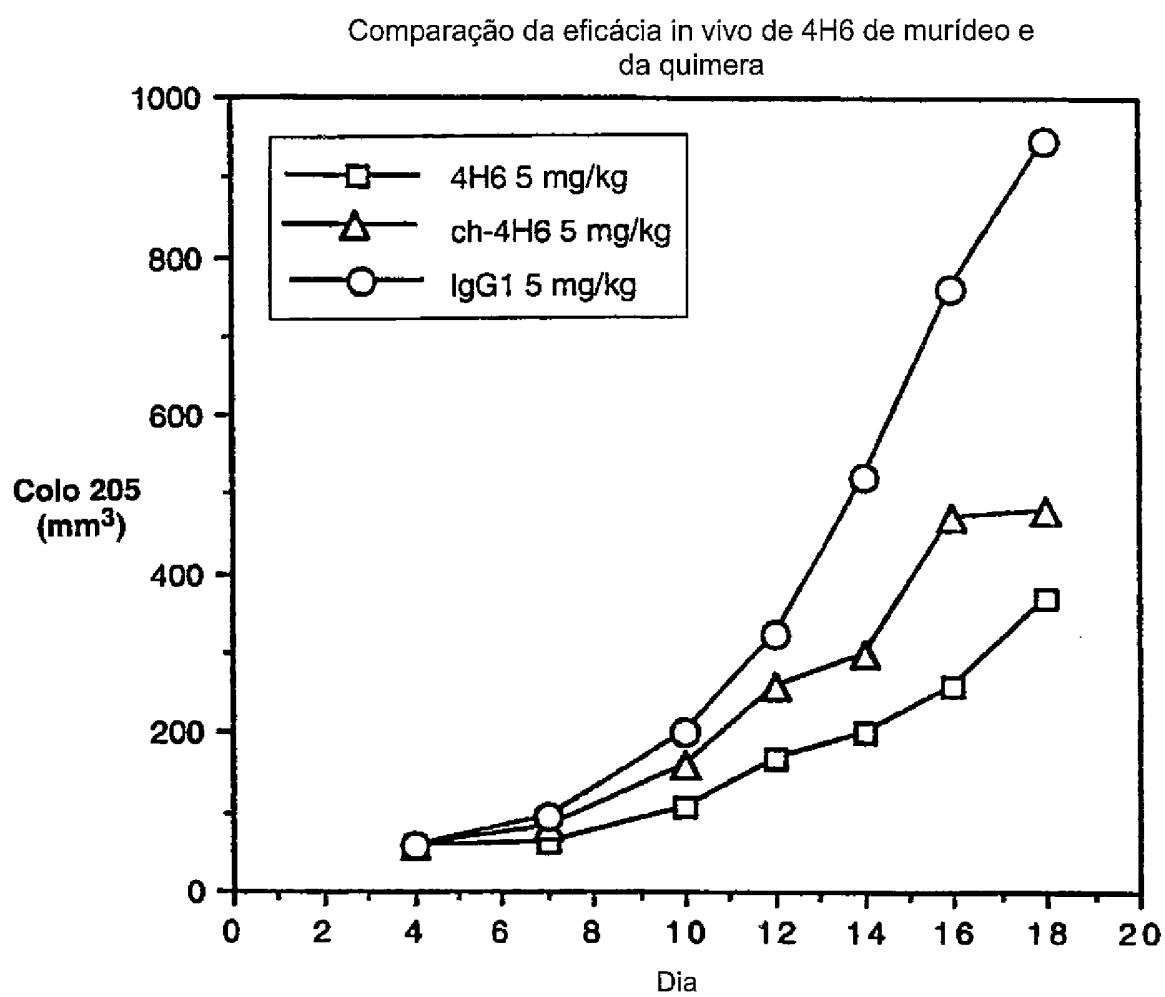
1921 TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG
 ACCAGTCGCA GGAGTGGCAG GACGTGGTCC TGACCGACTT ACCGTTCTCTC
 332 V S V L T V L H Q D W L N G K E
 CH2
 1971 TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC
 ATGTTACAGT TCCAGAGGTT GTTTCGGGAG GGTCGGGGGT AGCTCTTTTG
 348 Y K C K V S N K A L P A P I E K T
 CH2
 2021 CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA ACCACAGGTG TACACCCTGC
 GTAGAGGTTT CGGTTTCCCG TCGGGGCTCT TGGTGTCCAC ATGTGGGACG
 365 I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P
 CH2 CH3
 2071 CCCCATCCCCG GGAAGAGATG ACCAAGAACC AGGTCAGCCT GACCTGCCTG
 GGGGTAGGGC CCTTCTCTAC TGGTTCTTGG TCCAGTCGGA CTGGACGGAC
 382 P S R E E M T K N Q V S L T C L
 CH3
 2121 GTCAAAGGCT TCTATCCCAG CGACATCGCC GTGGAGTGGG AGAGCAATGG
 CAGTTTCCGA AGATAGGGTC GCTGTAGCGG CACCTCACCC TCTCGTTACC
 398 V K G F Y P S D I A V E W E S N G
 CH3
 2171 GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC TCCCGTGCTG GACTCCGACG
 CGTCGGCCTC TTGTTGATGT TCTGGTGC GG AGGGCACGAC CTGAGGCTGC
 415 Q P E N N Y K T T P P V L D S D G
 CH3
 2221 GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG
 CGAGGAAGAA GGAGATGTCG TTCGAGTGGC ACCTGTTCTC GTCCACCGTC
 432 S F F L Y S K L T V D K S R W Q
 CH3
 2271 CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG CATGAGGCTC TGCACAACCA
 GTCCCCTTGC AGAAGAGTAC GAGGCACTAC GTACTCCGAG ACGTGTGGT

FIG._18G

448 Q G N V F S C S V M H E A L H N H
 CH3
 2321 CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC GGGTAAATGA
 GATGTGCGTC TTCTCGGAGA GGGACAGAGG CCCATTTACT
 465 Y T Q K S L S L S P G K O
 CH3

FIG._18H



**FIG._21**