

(11) Número de Publicação: **PT 2857516 T**

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

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/62 (2017.01) **C12N 15/13** (2017.01)
C12N 5/10 (2017.01) **C07K 16/00** (2017.01)
C07K 16/32 (2017.01) **C07K 16/28** (2017.01)
A61K 51/10 (2017.01) **C07K 16/30** (2017.01)
A61K 39/395 (2017.01) **C07K 19/00** (2017.01)

(22) Data de pedido: **2001.03.20**

(30) Prioridade(s): **2000.04.11 US 195819 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2015.04.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.06.14**
166/2017

(73) Titular(es):

GENENTECH, INC.

ONE DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA

94080-4990

US

(72) Inventor(es):

LEONARD G. PRESTA

KATHY L. MILLER

US

US

(74) Mandatário:

VASCO STILLWELL DE ANDRADE

RUA CASTILHO, 165 1070-050 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MULTIVALENTES E UTILIZAÇÕES DOS MESMOS**

(57) Resumo:

O PRESENTE PEDIDO DESCREVE ANTICORPOS MANIPULADOS, COM TRÊS OU MAIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO A ANTIGÉNIO FUNCIONAIS, E UTILIZAÇÕES, COMO UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS, PARA TAIS ANTICORPO MANIPULADOS.

RESUMO

ANTICORPOS MULTIVALENTES E UTILIZAÇÕES DOS MESMOS

O presente pedido descreve anticorpos manipulados, com três ou mais sítios de ligação a antígeno funcionais, e utilizações, como utilizações terapêuticas, para tais anticorpo manipulados.

DESCRIÇÃO

ANTICORPOS MULTIVALENTES E UTILIZAÇÕES DOS MESMOS

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a anticorpos manipulados, com quatro ou mais sítios de ligação a antigénio funcionais, e a utilizações, como utilizações terapêuticas, para tais anticorpo manipulados.

Descrição da técnica relacionada

Estrutura de anticorpos de ocorrência natural

Os anticorpos de ocorrência natural (imunoglobulinas) compreendem duas cadeias pesadas ligadas entre si por ligações dissulfureto e duas cadeias leves, uma cadeia leve estando ligada a cada das cadeias pesadas por ligações dissulfureto. Cada cadeia pesada tem numa extremidade um domínio variável (VH) seguido por um número de domínios constantes (três ou quatro domínios constantes, CH1, CH2, CH3 e CH4, dependendo da classe de anticorpo). Cada cadeia leve tem um domínio variável (VL) numa extremidade e um domínio constante (CL) na sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável de cadeia leve está alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Veja-se a Fig. 1 no presente documento. Acredita-se que resíduos particulares de aminoácidos formam uma interface entre os domínios variáveis de cadeia leve e pesada, veja-se por exemplo, Chothia et al., J. Mol. Biol. 186:651-663 (1985); e Novotny e Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4592-4596 (1985).

Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na ligação do anticorpo a um antigénio, mas estão envolvidos em várias funções efetoras, como participação do anticorpo na citotoxicidade mediada por

células dependente de anticorpo (ADCC) e citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Os domínios variáveis de cada par de cadeias leves e pesadas estão envolvidos diretamente na ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios variáveis de cadeias leves e pesadas de ocorrência natural têm a mesma estrutura geral; cada compreendendo quatro regiões estruturais (FRs), cujas sequências são algo conservadas, conectadas por três regiões de determinação de complementaridade (CDRs) (veja-se Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)). As quatro FRs adotam grandemente uma conformação de folha beta e as CDRs formam ansas que conectam, e em alguns casos fazem parte da estrutura de folha beta. As CDRs em cada cadeia são mantidas em estreita proximidade pelas FRs e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação a antígeno.

As Figs. 2A-E no presente documento ilustram as estruturas dos cinco isotipos de imunoglobulina principais que ocorrem naturalmente. As imunoglobulinas IgG, IgD e IgE possuem apenas dois sítios de ligação a antígeno. IgA e IgM, por outro lado, são capazes de formar estruturas poliméricas com valências mais elevadas.

A IgM é secretada pelas células como um pentâmero no qual cinco unidades monoméricas são mantidas unidas por ligações dissulfureto, que ligam os seus domínios do terminal carboxilo (C_μ4/C_μ4) e os domínios C_μ3/C_μ3. As cinco subunidades monoméricas estão dispostas com as suas regiões Fc no centro do pentâmero e os 10 sítios de ligação a antígeno na periferia da molécula. Cada pentâmero contém um polipéptido ligado a Fc adicional denominado a cadeia J (junção), que está ligada por dissulfureto ao resíduo de cisteína do terminal carboxilo de 2 das cadeias 10 μ . A cadeia J parece ser necessária para a polimerização dos monómeros para formar IgM pentamérica; é adicionada

imediatamente antes da secreção do pentâmero. Uma molécula de IgM pode ligar-se a 10 moléculas pequenas de hapteno; contudo, devido ao impedimento estérico, apenas 5 moléculas de antígenos maiores podem ligar-se simultaneamente. A valência aumentada da IgM pentamérica aumenta a sua capacidade de ligação a tais antígenos multidimensionais, como partículas virais e glóbulos vermelhos (RBCs).

A IgA existe primariamente como um monómero, embora formas poliméricas como dímeros, trímeros e mesmo tetrâmeros sejam por vezes observadas. A IgA das secreções externas consiste num dímero ou tetrâmero, um polipéptido de cadeia J e uma cadeia polipeptídica designada componente secretor.

Anticorpos para utilizações clínicas

Tem sido feita uma utilização generalizada dos anticorpos monoclonais, particularmente aqueles derivados a partir de roedores incluindo ratinhos, contudo eles são frequentemente antígenicos na utilização clínica em seres humanos. Por exemplo, uma limitação principal na utilização clínica dos anticorpos monoclonais de roedores é uma resposta anti-globulina durante a terapêutica (Miller et al., Blood 62:988-995 (1983); e Schroff, R. W. et al., Cancer Res. 45:879-885 (1985)).

A técnica tentou superar este problema construindo anticorpos quiméricos nos quais um domínio variável de ligação a antígeno animal é acoplado a um domínio constante humano (Cabilly et al., documento de patente U.S. 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al., Nature 312:643-646 (1984); e Neuberger et al., Nature 314:268-270 (1985)). O isotipo do domínio constante humano pode ser selecionado para adaptar o anticorpo quimérico para a participação em ADCC e CDC (veja-se, por exemplo, Brüggemann et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Love et al., Methods in Enzymology

178:515-527 (1989); e Bindon et al., J. Exp. Med. 168:127-142 (1988)). Na forma de realização típica, tais anticorpos quiméricos contêm cerca de um terço de sequência de roedor (ou outra espécie não humana) e, portanto, são capazes de desencadear uma resposta anti-globulinas significativa em seres humanos. Por exemplo, no caso do anticorpo anti-CD3 murino, OKT3, grande parte da resposta anti-globulina resultante é direcionada contra a região variável em vez da região constante (Jaffers et al., Transplantation 41:572-578 (1986)).

Num esforço adicional para determinar as funções de ligação a antígeno dos anticorpos e para minimizar a utilização de sequências heterólogas nos anticorpos humanos, Winter e colaboradores (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); e Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)) substituíram os segmentos correspondentes de um anticorpo humano pelas CDRs ou sequências de CDR de roedor.

A promessa terapêutica desta abordagem é suportada pela eficácia clínica de um anticorpo humanizado específico para o antígeno CAMPATH-1 com dois pacientes com linfoma não Hodgkin, um dos quais tinha anteriormente desenvolvido uma resposta anti-globulina frente ao anticorpo de rato parental (Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); e Hale et al., Lancet i: 1394-1399 (1988)).

Em alguns casos, substituir CDRs humanas por CDRs a partir de anticorpos de roedor nas regiões estruturais humanas é suficiente para transferir uma afinidade de ligação a antígeno elevada (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)), enquanto noutros casos foi necessário adicionalmente substituir um (Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988)) ou vários (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)) resíduos estruturais. Veja-se também Co et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

88:2869-2873 (1991); documento de patente U.S. N.º 5.821.337 (Carter et al.) e documento de patente U.S. N.º 5.530.101 (Queen et al.). Referências adicionais relacionadas com a humanização de anticorpo incluem Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185 (1991); Daugherty et al., Nucleic Acids Research 19(9):2471-2476 (1991); Brown et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2663-2667 (1991); e Junghans et al., Cancer Research 50:1495-1502 (1990).

Em vez de um anticorpo quimérico/humanizado, é possível tratar um paciente com um anticorpo humano de modo a evitar anticorpos humanos produzidos contra um anticorpo murino (conhecida como a resposta "HAMA"). Estão disponíveis várias tecnologias para gerar anticorpos humanos.

Os anticorpos humanos podem ser selecionados utilizando tecnologia de apresentação em fagos. A apresentação em fagos foi adaptada para selecionar anticorpos humanos a partir de um dador não imunizado (Marks et al. J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)). De acordo com esta abordagem, a PCR é utilizada para amplificar genes de domínio variável a partir de ARNm preparado a partir de linfócitos do sangue periférico humano (PBLs). São utilizados iniciadores de tal forma que o ADN de cadeias pesadas de ambas IgG e IgM e ambas cadeias κ e λ é amplificado. Estes genes são depois combinados de forma aleatória e expressos como um Fv de cadeia simples (scFv) fusionado à proteína de revestimento do gene III do fago M13. Anticorpos humanos contra um antigénio de interesse podem depois ser identificados por ciclos de crescimento e seleção através de ligação a esse antigénio (por exemplo, ao antigénio imobilizado). Veja-se Griffiths et al. EMBO J. 12:725-734 (1993).

Repertórios de fagos-anticorpos "sintéticos" também foram construídos a partir de segmentos de gene VH humanos.

Um repertório (2×10^7 clones) foi primeiramente construído utilizando uma ansa H3 curta de cinco ou oito resíduos aleatórios cada um com 49 segmentos, e combinados com uma cadeia leve fixa (Hoogenboom et al. J. Mol. Biol. 227:381-388 (1992)). Ao adicionar uma gama de ansas H3 de diferentes comprimentos, de até 12 resíduos, foi criada uma biblioteca única a partir da qual uma gama de mais de 20 especificidades de ligação pode ser selecionada (Winter et al. Ann. Rev. Immuno. 12:433-55 (1994)). Outras bibliotecas sintéticas foram construídas a partir da região estrutural de um anticorpo único através da randomização de CDRs do anticorpo humano (Garrard e Henner Gene 128:103-109 (1993)). Os anticorpos derivados a partir de tais repertórios de fagos-anticorpos sintéticos também são considerados como sendo anticorpos "humanos" no presente documento.

A afinidade de fagos-anticorpos "primários" de baixa afinidade pode ser melhorada utilizando tecnologia de apresentação em fagos. Uma abordagem consiste em utilizar uma estratégia de redistribuição de cadeias (*chain-shuffling*) na qual o domínio VH é mantido constante e depois recombinado com a biblioteca original de genes VL e agentes de união mais fortes selecionados através da ligação a antigénio imobilizado. Este ciclo é repetido fixando o novo domínio VL e recombinando com a biblioteca de VH original (Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)). Alternativamente, mutações pontuais no anticorpo primário podem ser introduzidas utilizando PCR propensa a erros e agentes de união de afinidade mais elevada selecionados utilizando apresentação em fagos. Gram et al. PNAS (USA) 89: 3576-3580 (1992).

Também é possível produzir anticorpos humanos imunizando ratinhos que foram geneticamente manipulados para expressar anticorpos humanos. Ratinhos com imunodeficiência grave combinada (SCID) carecem da

capacidade de produzir as suas próprias imunoglobulinas devido a um defeito no gene da recombinase. Vários grupos reconstituíram um sistema imunitário humoral funcional nestes ratinhos através da transferência de linfócitos do sangue periférico humano (PBLs). Estes ratinhos hu-PBL-SCID podem ser utilizados para produzir anticorpos humanos depois da imunização com antigénio. Duchosal *et al.* Nature 355:258-262 (1992). Utilizando outra abordagem, os genes de cadeia pesada e leve nos ratinhos são desativados e posteriormente cromossomas artificiais de levedura (YACs) manipulados com grandes sequências de ADN contendo genes de cadeia pesada e leve humana são introduzidos nos ratinhos. Tais μ XenoRatinhos são capazes de produzir anticorpos humanos depois da imunização com um antigénio de interesse. Veja-se o documento de patente U.S. N.º 5.434.340; documento de patente U.S. N.º 5.591.699; documento de patente U.S. N.º 5.569.825; documento de patente U.S. N.º 5.545.806 e documento de patente U.S. N.º 5.545.807.

Os anticorpos monoclonais humanos também podem ser gerados imortalizando um linfócito B humano que produz um anticorpo de interesse. Os problemas éticos que rodeiam a imunização de humanos de modo a gerar linfócitos B humanos ativados podem ser evitados imunizando linfócitos humanos *in vitro*. Tanto os PBLs humanos (Borrebaeck *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3995-4000 (1988)) como os esplenocitos humanos (Boerner *et al.* J. Immunol. 147, 86-95 (1991)) foram imunizados *in vitro* com sucesso. Foram alcançadas melhorias na tecnologia de hibridomas humanos através da utilização de um heterohíbrido de ratinho-humano como o parceiro de fusão (Boerner *et al.*).

Variantes de anticorpos

Os anticorpos foram modificados de modo a aumentar a sua valência de ligação a antigénios. Por exemplo, Ghetie *et al.* homodimerizaram anticorpos monoclonais reativos com tumores (anticorpos anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21, anti-

CD22 e anti-HER2) através da introdução química de uma ligação tioéter entre um par de IgGs utilizando dois reticuladores heterobifuncionais. Ghetie et al. PNAS (USA) 94:7509-7514 (1997); e documento WO 99/02567. Wolff et al. Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) também ligaram quimicamente um anticorpo monoclonal de IgG (CHiBR96) utilizando reticuladores heterobifuncionais para gerar um homodímero de anticorpo monoclonal com atividade antitumoral potenciada em ratinhos nus.

Shopes et al. substituíram um resíduo de serina próximo do terminal carboxilo de uma cadeia pesada de IgG1 (Ser⁴⁴⁴) por uma cisteína. As ligações dissulfureto intermoleculares introduzidas entre os resíduos Cys⁴⁴⁴ ligaram pares de imunoglobulinas "cauda com cauda" para formar dímeros covalentes (H₂L₂)₂. Diz-se que os dímeros anti-dansilo são mais eficazes que a IgG1 humana monomérica na citólise mediada por complemento dependente de anticorpos de eritrócitos que carregam haptenos. Shopes, B. J. Immunol. 148(9): 2918-2922 (1992); e documento WO 91/19515. Esta abordagem, envolvendo a introdução de resíduos de cisteína, também foi utilizada para gerar uma forma homodimérica do anticorpo CAMPATH-1 H. O anticorpo homodimérico CAMPATH-1 H exibiu uma lise melhorada utilizando células alvo que expressam antigénio a baixa densidade, mas não foi observada qualquer melhoria utilizando células que expressam antigénio a alta densidade. Greenwood et al. Ther. Immunol. 1:247-255 (1994). Veja-se, também, Caron et al. J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992), referindo-se a um anticorpo anti-CD33 manipulado com uma substituição de serina por cisteína na posição 444 da cadeia pesada permitindo a formação de ligação dissulfureto intercadeia no terminal COOH da IgG. Diz-se que a IgG homodimérica tem uma avidéz semelhante à da IgG parental, mas aparentemente demonstrou uma capacidade melhorada para internalizar e reter radioisótopo

em células alvo de leucemia, e foi mais potente na morte de células de leucemia mediada pelo complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpos utilizando efetores humanos.

Coloma e Morrison *Nature Biotech.* 15:159-163 (1997) descrevem um anticorpo biespecífico tetravalente que foi manipulado fusionado ADN que codifica um Fv de anticorpo anti-dansilo de cadeia simples (scFv) depois do terminal C (CH3-scFv) ou depois da dobradiça (Dobradiça-scFv) de um anticorpo anti-dansilo de IgG3. Veja-se, (também, o documento W095/09917. Smith e Morrison manipularam três versões de IgG3 semelhantes a μ através de manipulação de (1) Cys414 de uma cadeia pesada de IgM ou (2) Cys575 de uma cadeia pesada de IgM, ou ambas (1) e (2), para dentro do gene de cadeia pesada de IgG3. Todas as três construções mutantes foram expressas por células Sp2/0 e montadas em polímeros contendo até seis subunidades H_2L_2 . Os polímeros usemelhantes a IgM_μ assim produzidos de IgG foram considerados como possuindo tanto as propriedades de ligação ao recetor Fc gama da IgG como a atividade de complemento mais potente da IgM. Veja-se, Smith e Morrison *Bio/Technology* 12:683-688 (1994).

Shuford e colaboradores isolaram um oligómero de anticorpo anti-estreptococos do grupo B de IgG1 humana a partir de uma linha celular de mieloma transfetada. Shuford *et al.* *Science* 252:724-727 (1991). A análise imunoquímica e sequenciação de ADN indicaram que a linha celular produziu ambas uma cadeia leve capa normal e uma cadeia leve variantes V-V-C de 37 kD (L37). A cotransfecção de vetores que codificam a cadeia pesada e L37 resultaram na produção de IgG oligomérica.

O documento de patente U.S. N.º 5.641.870 (Rinderknecht *et al.*) descreve um fragmento $F(ab')_2$ linear, bivalente que compreende repetições em tandem de um fragmento de cadeia pesada (VH-CH1-VH-CH1) cosecretado com

uma cadeia leve. O terminal C de CH1 foi unido direcionado para o terminal N de VH sem quaisquer sequências proteicas de ligação estranhas.

Alt e colaboradores descrevem moléculas semelhantes a IgG de diacampo (*diabody*) de cadeia simples (scDb) dimérico que, num polipéptido simples, incluem dois domínios VH, dois domínios VL, um domínio CH2 opcional e um domínio CH3 na ordem de VHA-VLB-VHB-VLA-(CH2)-CH3. Alt *et al.*, FEBS Letters, 454:90-94 (1990). Afirma-se que a fusão de scDbs a uma região Fc ou região CH3 resulta na expressão de moléculas semelhantes a IgG diméricas funcionalmente ativas (Resumo).

Outras publicações sobre variantes de anticorpos incluem o documento WO 00/06605; documento de patente U.S. N.º 5.591.828; documento de patente U.S. N.º 5.959.083; documento de patente U.S. N.º 6.027.725; documento WO98/58965; documento WO94/13804; Tutt *et al.* J. Immunol. 147:60-69 (1991); documento WO99/37791; documento de patente U.S. N.º 5.989.830; documentos WO94/15642; EP 628.078B1; WO97/14719; Stevenson *et al.* Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

Pluckthun *et al.*, Immunotechnology, Volume 3, n.º 2, páginas 83-105, 1997 resume abordagens de manipulação de proteínas para fragmentos de anticorpos multivalentes e biespecíficos. O documento EP0.517.024 descreve a preparação e utilização de recetores biespecíficos tetravalentes.

Tirosina quinases recetoras ErbB

As tirosinas quinases recetoras ErbB são mediadores importantes do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. A família de recetores inclui pelo menos quatro membros distintos incluindo o Recetor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR ou ErbB1). HER2 (ErbB2 ou p185^{neu}), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4 ou tyro2).

O EGFR, codificado pelo gene *erbB1*, tem sido

casualmente implicado nas neoplasias malignas humanas. Em particular, uma expressão aumentada de EGFR tem sido observada no cancro da mama, bexiga, pulmão, cabeça, pescoço e estômago, bem como nos glioblastomas. A expressão do recetor EGFR está frequentemente associada com a produção aumentada do ligando de EGFR, Fator de Crescimento Transformante alfa (TGF-alfa), através das mesmas células tumorais resultando na ativação de recetores por uma via estimuladora autócrina. Baselga e Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Anticorpos monoclonais direcionados contra o EGFR ou os seus ligandos, TGF-alfa e EGF, foram avaliados como agentes terapêuticos no tratamento de tais neoplasias malignas. Veja-se, por exemplo, Baselga e Mendelsohn., *supra*; Masui et al. *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); e Wu et al. *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

O segundo membro da família ErbB, p185^{neu}, foi originalmente identificado como o produto do gene de transformação a partir de neuroblastomas de ratos tratados quimicamente. A forma ativada do proto-oncogene *neu* resulta a partir de uma mutação pontual (valina para ácido glutâmico) na região transmembrana da proteína codificada. A amplificação do homólogo humano de *neu* é observada nos cancros de mama e ovário e correlaciona-se com um mau prognóstico (Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989); e documento de patente U.S. N.º 4.968.603). Até à data, nenhuma mutação pontual análoga à presente no proto-oncogene *neu* foi relatada para os tumores humanos. A superexpressão de HER2 (frequentemente mas não uniformemente devido à amplificação génica) também foi observada noutros carcinomas incluindo carcinomas no estômago, endométrio, glândulas salivares, pulmão, rim, cólon, tiroide, pâncreas e bexiga.

Foram descritos anticorpos direcionados contra os produtos proteicos p185^{neu} de rato e HER2 de ser humano.

Drebin e colaboradores produziram anticorpos contra o produto gênico neu de rato, p185^{neu}. Veja-se, por exemplo, Drebin et al., Cell 41:695-706 (1985); Myers et al., Meth. Enzym. 198:277-290 (1991); e o documento W094/22478. Drebin et al. Oncogene 2:273-277 (1988) relatam que misturas de anticorpos reativos com duas regiões distintas de p185^{neu} resultam em efeitos antitumorais sinérgicos sobre células NiH-3T3 transformadas com neu, implantadas em ratinhos nus. Veja-se também o documento de patente U.S. N.º 5.824.311 emitida a 20 de outubro, 1998.

Hudziak et al., Mol. Cell. Biol. 9(3):1165-1172 (1989) descrevem a geração de um painel de anticorpos anti-HER2 que foram caracterizados utilizando a linha celular de tumor da mama humano SKBR3. A proliferação celular relativa das células SKBR3 depois da exposição aos anticorpos foi determinada por coloração com cristal violeta das monocamadas depois de 72 horas. Utilizando este ensaio, foi obtida uma inibição máxima com o anticorpo denominado 4D5 que inibiu a proliferação celular em 56%. Outros anticorpos no painel reduziram a proliferação celular numa menor extensão neste ensaio. Verificou-se ainda que o anticorpo 4D5 sensibiliza as linhas celulares de tumor de mama que superexpressam HER2 frente aos efeitos de TNF-alfa. Veja-se, também, o documento de patente U.S. N.º 5.677.171, emitido a 14 de outubro de 1997. Os anticorpos anti-HER2 discutidos em Hudziak et al., foram adicionalmente caracterizados em Fendly et al. Cancer Research 50:1550-1558 (1990); Kotts et al. In Vitro 26(3):59A (1990); Sarup et al. Growth Regulation 1:72-82 (1991); Shepard et al. J. Clin. Immunol. 11 (3): 117-127 (1991); Kumar et al. Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986 (1991); Lewis et al. Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263 (1993); Pietras et al. Oncogene 9:1829-1838 (1994); Vitetta et al. Cancer Research 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski et al. J. Biol. Chem. 269(20): 14661-14665 (1994); Scott et al. J.

Biol. Chem. 266:14300-5 (1991); D'souza et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7202-7206 (1994); Lewis et al. Cancer Research 56:1457-1465 (1996); e Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997).

Uma versão de IgG1 humanizada recombinante do anticorpo 4D5 anti-HER2 murino (rhuMAb HER2 ou HERCEPTIN®; comercialmente disponível a partir de Genentech, Inc., South San Francisco) é clinicamente ativo nos pacientes com câncros de mama metastáticos com superexpressão de HER2 que receberam uma terapêutica contra o cancro extensiva anterior (Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996)). HERCEPTIN® recebeu aprovação de comercialização da Food and Drug Administration a 25 de setembro de 1998 para o tratamento de pacientes com cancro da mama metastático cujos tumores superexpressavam a proteína HER2.

Outros anticorpos anti-HER2 com várias propriedades foram descritos em Tagliabue et al. Int. J. Cancer 47:933-937 (1991); McKenzie et al. Oncogene 4:543-548 (1989); Maier et al. Cancer Res. 51:5361-5369 (1991); Bacus et al. Molecular Carcinogenesis 3:350-362 (1990); Stancovski et al. PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991); Bacus et al. Cancer Research 52:2580-2589 (1992); Xu et al. Int. J. Cancer 53:401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk et al. Cancer Research 52:2771-2776 (1992); Hancock et al. Cancer Res. 51:4575-4580 (1991); Shawver et al. Cancer Res. 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al. Cancer Res. 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al. J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992); documento de patente U.S. N.º 5.783.186; Klapper et al. Oncogene 14:2099-2109 (1997); documento WO 98/77797 e documento de patente U.S. N.º 5.783.186. O rastreio de homologia resultou na identificação de dois outros membros da família de recetores ErbB; HER3 (documento de patente N.ºs 5.183.884 e 5.480.968 bem como Kraus et al. PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989)) e HER4 (pedido de patente EP N.º 599.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

90:1746-1750 (1993); e Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993)). Ambos estes recetores apresentam uma expressão aumentada em pelo menos algumas linhas celulares de cancro da mama.

Os recetores ErbB são geralmente encontrados em várias combinações nas células e acredita-se que a heterodimerização aumenta a diversidade de respostas celulares frente a uma variedade de ligandos de ErbB (Earp et al. Breast Cancer Research and Treatment 35:115-132 (1995)). o EGFR é ligado por seis ligandos diferentes; Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de Crescimento Transformante alfa (TGF-alfa), anfirregulina, Fator de Crescimento Epidérmico de Ligação de Heparina (HB-EGF), betacelulina e epirregulina (Groenen et al. Growth Factors 11:235-257 (1994)). Uma família de proteínas de herregulina que resulta do *splicing* alternativo de um gene único são ligandos para HER3 e HER4. A família de herregulina inclui herregulinas alfa, beta e gama (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); documento de patente U.S. N.º 5.641.869; e Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)); fatores de diferenciação de neu (NDFs), fatores de crescimento glial (GGFs); atividade indutora de recetor de acetilcolina (ARIA); e fator derivado de neurónios sensoriais e motores (SMDF). Para uma revisão, veja-se Groenen et al. Growth Factors 11:235-257 (1994); Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7:247-262 (1996) e Lee et al. Pharm. Rev. 47:51-85 (1995). Recentemente, dois ligandos adicionais de ErbB foram identificados; neurregulina-2 (NRG-2) que está relatada como ligando-se tanto a HER3 como HER4 (Chang et al. Nature 387 509-512 (1997); a Carraway et al Nature 387:512-516 (1997)) e neurregulina-3 que se liga a HER4 (Zhang et al. PNAS (USA) 94(18):9562-7 (1997)). HB-EGF, betacelulina e epirregulina também se ligam a HER4.

Embora EGF e TGF-alfa não se liguem a HER2, o EGF estimula o EGFR e HER2 a formar um heterodímero, que ativa

o EGFR e resulta na transfosforilação de HER2 no heterodímero. A dimerização e/ou transfosforilação parece ativar a tirosina quinase HER2. Veja-se Earp et al., *supra*. Igualmente, quando HER3 é coexpressa com HER2, é formado um complexo de sinalização ativo e os anticorpos direcionados contra HER2 são capazes de alterar este complexo (Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994)). Adicionalmente, a afinidade de HER3 para a herregulina (HRG) é aumentada até um estado de afinidade mais elevado quando coexpressa com HER2. Veja-se também, Levi et al., Journal of Neuroscience 15: 1329-1340 (1995); Morrissey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1431-1435 (1995); e Lewis et al., Cancer Res., 56:1457-1465 (1996) em relação ao complexo proteico de HER2-HER3. A HER4, como a HER3, forma um complexo de sinalização ativo com HER2 (Carraway e Cantley, Cell 78:5-8 (1994)).

Superfamília de recetores de TNF

Várias moléculas, como o Fator de Necrose Tumoral-alfa ("TNF-alfa"), Fator de Necrose Tumoral-beta ("TNF-beta"), Linfotoxina-alfa ("LT-alfa"), 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), ligando de Apo-3 (também referido como TWEAK), osteoprotegerina (OPG), APRIL, ligando de RANK (também referido como TRANCE) e TALL-1 (também referido como BlyS, BAFF ou THANK) foram identificados como membros da família de citocinas do Fator de Necrose Tumoral ("TNF") (veja-se, por exemplo, Gruss e Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995); 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); Documento WO 97/01633 publicado a 16 de janeiro de 1997; documento WO 97/25428 publicado a 17 de julho de 1997; Marsters et al., Curr. Biol., 8:525-528 (1998);

Simonet et al., Cell, 89:309-319 (1997); Chicheportiche et al., Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997); Hahne et al., J. Exp. Med., 188:1185-1190 (1998); documento WO98/28426 publicado a 2 de julho de 1998; documento WO98/46751 publicado a 22 de outubro de 1998; documento WO/98/18921 publicado a 7 de maio de 1998; Moore et al., Science, 285:260-263 (1999); Shu et al., J. Leukocyte Biol., 65:680 (1999); Schneider et al., J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999); e Mukhopadhyay et al., J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999)). Entre estas moléculas, o TNF-alfa, TNF-beta, ligando de CD30, ligando de 4-1BB, ligando de Apo-1, ligando de Apo-2 (Apo2L/TRAIL) e ligando de Apo-3 (TWEAK) foram relatados como estando envolvidos na morte celular apoptótica. Ambos o TNF-alfa e TNF-beta foram relatados como induzindo a morte apoptótica em células tumorais suscetíveis (Schmid et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 83:1881 (1986); Dealtry et al., Eur. J. Immunol., 17:689 (1987)).

Várias moléculas na família de TNF também têm um ou mais papéis significativos na função ou desenvolvimento do sistema imunitário (Gruss et al., Blood, 85:3378 (1995)). Zheng et al. relataram que o TNF-alfa está envolvido na apoptose pós-estimulação de células T CD8 positivas (Zheng et al., Nature, 377:348-351 (1995)). Outros investigadores relataram que o ligando CD30 pode estar envolvido na deleção de células T autorreativas no timo (Amakawa et al., Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death, Abstr. N.º 10, (1995)). O ligando CD40 ativa muitas funções das células B, incluindo a proliferação, secreção de imunoglobulinas e sobrevivência (Renshaw et al., J. Exp. Med., 180:1889 (1994)). Outra citocina da família de TNF recentemente identificada, TALL-1 (BlyS), foi relatada, sob determinadas condições, como induzindo a proliferação de células B e secreção de imunoglobulinas. (Moore et al., *supra*; Schneider et al., *supra*; Mackay et al., J. Exp. Med., 190:1697 (1999)).

As mutações nos genes de recetores ou ligandos de Fas/Apo-1 de ratinho (denominados *Ipr* e *gld*, respetivamente) foram associados com alguns distúrbios autoimunes, indicando que o ligando Apo-1 pode desempenhar um papel na regulação da deleção clonal de linfócitos autorreativos na periferia (Krammer *et al.*, Curr. Op. Immunol., 6:279-289 (1994); Nagata *et al.*, Science, 267:1449-1456 (1995)). Também foi relatado que o ligando Apo-1 induz a apoptose pós-estimulação em linfócitos T e em linfócitos B CD4 positivos, e pode estar envolvido na eliminação de linfócitos ativados 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 recetor de Apo-1 exibem uma atividade de morte celular que é comparável, ou semelhante à do TNF-alfa (Yonehara *et al.*, J. Exp. Med., 169:1747-1756 (1989)).

Acredita-se que a indução de várias respostas celulares mediadas por tais citocinas da família do TNF é iniciada pela sua ligação a recetores celulares específicos. Previamente, foram identificados dois recetores de TNF 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., 87:3127-3131 (1990); documento EP 417.563, publicado a 20 de março de 1991; 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., 88:2830-2834 (1991); Goodwin *et al.*, Mol. Cell. Biol., 11:3020-3026 (1991)). Verificou-se que aqueles TNFRs partilhavam a estrutura típica dos recetores de superfície celular incluindo regiões extracelulares, de transmembrana e intracelulares. As porções extracelulares de ambos os recetores foram descobertas de maneira natural também como proteínas de ligação a TNF solúveis (Nophar *et al.*, EMBO

J., 9:3269 (1990); e Kohno et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:8331 (1990); Hale et al., J. Cell. Biochem. Supplement 15F, 1991, p. 113 (P424)).

A porção extracelular dos TNFRs de tipo 1 e tipo 2 (TNFR1 e TNFR2) contem um padrão de sequência de aminoácidos repetitivo de quatro domínios ricos em cisteína (CRDs) designados 1 a 4, começando desde o terminal NH₂. (Schall et al., *supra*; Loetscher et al., *supra*; Smith et al., *supra*; Nophar et al., *supra*; Kohno et al., *supra*; Banner et al., Cell, 73:431-435 (1993)). Um padrão repetitivo semelhante de CRDs existe em muitas outras proteínas da superfície celular, incluindo o recetor do fator de crescimento nervoso p75 (NGFR) (Johnson et al., Cell, 47:545 (1986); Radeke et al., Nature, 325:593 (1987)), o antígeno de células B CD40 (Stamenkovic et al., EMBO J., 8:1403 (1989)), o antígeno de células T OX40 (Mallet et al., EMBO J., 9:1063 (1990)) e o antígeno Fas (Yonehara et al., *supra* e Itoh et al., Cell, 66:233-243 (1991)). As CRDs também são encontradas nas proteínas T2 semelhantes a TNFR solúvel (sTNFR) dos poxvírus de 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 ótimo destas sequências indica que as posições dos resíduos de cisteína estão bem conservadas. Estes recetores são, por vezes, coletivamente referidos como membros da superfamília de recetores de TNF/NGF.

Os ligandos da família do TNF identificados até à data, com a exceção de Linfotoxina-alfa, são proteínas transmembranares de tipo II, cujo terminal C é extracelular. Em contraste, a maioria dos recetores na família do recetor de TNF (TNFR) identificados até à data são proteínas transmembranares de tipo I. Em ambas as famílias de recetores e ligandos de TNF, contudo, a homologia identificada entre os membros da família foi

verificada principalmente no domínio extracelular (μ ECD μ). Várias das citocinas da família de TNF, incluindo TNF-alfa, ligando Apo-1 e ligando CD40, são clivados 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 dos recetores de TNF são também, normalmente, clivadas proteoliticamente para libertar ECDs de recetores solúveis que podem funcionar como inibidores das citocinas cognatas.

Mais recentemente, foram identificados outros membros da família de TNFR. Em von Bulow et al., Science, 278:138-141 (1997), os investigadores descrevem um recetor de membrana plasmática referido como Ativador Transmembrana e interatador de CAML ou μ TACI μ (*Transmembrane Activator and CAML-Interactor*). É relatado que o recetor de TACI contém um motivo rico em cisteína característico da família de TNFR. Num ensaio *in vitro*, a reticulação de TACI na superfície de células Jurkat transfetadas com anticorpos específicos para TACI conduziu à ativação de NF-KB (veja-se também, documento WO 98/39361 publicado a 18 de setembro de 1998).

Laabi et al., EMBO J., 11:3897-3904 (1992) relataram a identificação de um novo gene designado μ BCM μ cuja expressão foi verificada como coincidindo com a maturação terminal de células B. A grelha de leitura aberta do ADNC normal de BCM previu um polipéptido com 184 aminoácidos de comprimento com um domínio transmembrana único. Posteriormente, estes investigadores denominaram este gene como μ BCMA μ . (Laabi et al., Nucleic Acids Res., 22:1147-1154 (1994)). A expressão de ARNm de BCMA foi relatada como estando ausente nas linhas de células B malignas humanas que representam o estágio de linfócito pró-B, e portanto, acredita-se que esteja ligada ao estágio de diferenciação dos linfócitos (Gras et al., Int. Immunology, 7:1093-1106

(1995)). Em Madry et al., Int. Immunology, 10:1693-1702 (1998), foi descrita a clonagem de ADNc de BCMA murino. É relatado que o ADNc de BCMA codifica um polipéptido com 185 aminoácidos de comprimento tendo 62 de identidade com o polipéptido BCMA humano. O alinhamento das sequências proteicas de BCMA humano e murino revelou um motivo conservado de seis cisteínas na região N-terminal, sugerindo que a proteína BCMA pertence à superfamília de TNFR (Madry et al., *supra*).

Em Marsters et al., Curr. Biol., 6:750 (1996), os investigadores descrevem um polipéptido humano de sequência nativa de comprimento completo, denominado Apo-3, que exibe uma semelhança com a família de TNFR quanto às suas repetições ricas em cisteína e se assemelha a TNFR1 e CD95 no sentido em que contém uma sequência de domínio de morte citoplasmático (veja-se também Marsters et al., Curr. Biol., 6:1669 (1996)). Apo-3 também foi referido por outros investigadores como DR3, wsl-1, TRAMP e LARD (Chinnaiyan et al., Science, 274:990 (1996); Kitson et al., Nature, 384:372 (1996); Bodmer et al., Immunity, 6:79 (1997); Screaton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:4615-4619 (1997)).

Pan et al. divulgaram outro membro da família de recetores de TNF referido como "DR4" (Pan et al., Science, 276:111-113 (1997); veja-se também o documento WO98/32856 publicado a 30 de julho de 1998). Foi relatado que o DR4 contém um domínio de morte citoplasmático capaz de ativar o aparelho de suicídio celular. Pan et al. divulgam que se acredita que DR4 é um recetor para o ligando conhecido como Apo2L/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 acredita ser um recetor para Apo2L/TRAIL (veja-se também o documento WO98/51793 publicado a 19 de novembro de 1998; e o documento WO 98/41629 publicado a 24

de setembro de 1998). Aquela molécula é referida como DR5 (também foi alternativamente referida como Apo-2; 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); documento WO98/35986 publicado a 20 de agosto de 1998; documento EP870.827 publicado a 14 de outubro de 1998; documento WO98/46643 publicado a 22 de outubro de 1998; documento WO99/02653 publicado a 21 de janeiro de 1999; documento WO99/09165 publicado a 25 de fevereiro de 1999 e documento WO99/11791 publicado a 11 de março de 1999). Tal como DR4, é relatado que DR5 contém um domínio de morte citoplasmático e é capaz de sinalizar a apoptose. A estrutura cristalina do complexo formado entre Apo2L/TRAIL e DR5 é descrita em Hymowitz et al., Molecular Cell, 4:563-571 (1999).

Ainda outro recetor contendo domínio de morte, DR6, foi recentemente identificado (Pan et al., FEBS Letters, 431:351-356 (1998)). Além de conter quatro domínios ricos em cisteína extracelulares putativos e um domínio de morte citoplasmático, acredita-se que DR6 contém uma sequência de fecho de leucina putativa que se sobrepõem com um motivo rico em prolina na região citoplasmática. O motivo rico em prolina assemelha-se a sequências que se ligam a domínios 3 de homologia de src, que são encontrados em muitas moléculas transdutoras de sinal intracelular.

Um grupo adicional de recetores recentemente identificados é referido como "recetores chamariz" que se acredita que funcionam como inibidores, em vez de transdutores de sinalização. Este grupo inclui DcR1 (também referido como TRID, LIT ou TRAIL-R3) (Pan et al., Science, 276:111-113 (1997); Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997); 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)) e DcR2 (também designado TRUNDD ou TRAIL-R4) (Marsters *et al.*, Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997); Pan *et al.*, FEBS Letters, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti *et al.*, Immunity, 7:813-820 (1997)), ambas moléculas de superfície celular, bem como OPG (Simonet *et al.*, *supra*; Emery *et al.*, *infra*) e DcR3 (Pitti *et al.*, Nature, 396:699-703 (1998)), ambas as quais são proteínas solúveis secretadas.

Membros adicionais recém-identificados da família de TNFR incluem CAR1, HVEM, GITR, ZTNFR-5, NTR-1 e TNFL1 (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); Nocentini *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6216-6221 (1997); Emery *et al.*, J. Biol. Chem., 273:14363-14367 (1998); documento WO99/04001 publicado a 28 de janeiro de 1999; documento WO99/07738 publicado a 18 de fevereiro de 1999; documento WO99/33980 publicado a 8 de julho de 1999).

Como revisto recentemente por Tewari *et al.*, o TNFR1, TNFR2 e CD40 modulam a expressão de citocinas proinflamatórias e coestimuladoras, recetores de citocinas e moléculas de adesão celular através da ativação do fator 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 fatores de transcrição diméricos cujas subunidades contêm regiões ReI 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 forma complexos com membros da família de inibidores I- κ B; depois da inativação de I- κ B em resposta a determinados estímulos, o NF- κ B libertado transloca-se para o núcleo onde se liga a sequências de ADN específicas e ativa a transcrição génica. Como descrito acima, os membros de TNFR identificados até à data incluem ou carecem de uma região de domínio de morte intracelular. Algumas moléculas de TNFR

que carecem de um domínio de morte, como TNFR2, CD40, HVEM e GITR, são capazes de modular a atividade de NF- κ B. (veja-se, por exemplo, Lotz et al., J. Leukocyte Biol., 60:1-7 (1996)).

Para uma revisão sobre a família TNF de citocinas e os seus recetores, veja-se Ashkenazi e Dixit, Science, 281:1305-1308 (1998); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997); Gruss e Dower, *supra*, e Nagata, Cell, 88:355-365 (1997).

Antigénios de superfície de células B

Os linfócitos são um dos muitos tipos de glóbulos brancos produzidos na medula óssea durante o processo de hematopoiese. Existem duas populações principais de linfócitos: linfócitos B (células B) e linfócitos T (células T). Os linfócitos de particular interesse no presente documento são as células B.

As células B amadurecem dentro da medula óssea e abandonam a medula expressando um anticorpo de ligação a antigénio na sua superfície celular. Quando uma célula B naïve se encontra pela primeira vez com o antigénio para o qual o seu anticorpo ligado à membrana é específico, a célula começa a dividir-se rapidamente e a sua descendência diferencia-se em células B de memória e células efetoras denominadas "células plasmáticas". As células B de memória têm uma esperança de vida mais longa e continuam a expressar um anticorpo ligado à membrana com a mesma especificidade que a célula parental original. As células plasmáticas não produzem anticorpo ligado à membrana mas, em vez disso, produzem o anticorpo numa forma que pode ser secretada. Os anticorpos secretados são as moléculas efetoras principais da imunidade humoral.

O antigénio CD20 (também denominado antigénio de diferenciação restrita a linfócitos B humanos, Bp35) é uma proteína de transmembrana hidrofóbica com uma massa molecular de aproximadamente 35 kD localizada em linfócitos

pré-B e B maduros (Valentine et al. J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287 (1989); e Einfeld et al. EMBO J. 7(3):711-717 (1988)). O antígeno também é expresso em mais de 90 % de linfomas não Hodgkin (NHL) de células B (Anderson et al. Blood 63(6):1424-1433 (1984)), mas não se encontra em células estaminais hematopoiéticas, células pré-B, células plasmáticas normais ou outros tecidos normais (Tedder et al. J. Immunol. 135(2):973-979 (1985)). O CD20 regula uma ou mais etapas precoces no processo de ativação para a iniciação do ciclo celular e diferenciação celular (Tedder et al., *supra*) e possivelmente funciona como um canal de íons cálcio (Tedder et al. J. Cell. Biochem. 14D:195 (1990)).

Dada a expressão de CD20 nos linfomas de células B, este antígeno pode servir como um candidato para o "direcionamento" de tais linfomas. Essencialmente, tal direcionamento pode ser generalizado como se segue: anticorpos específicos para o antígeno de superfície CD20 das células B são administrados a um paciente. Estes anticorpos anti-CD20 ligam-se especificamente ao antígeno CD20 de (aparentemente) células B normais e malignas; o anticorpo ligado ao antígeno de superfície CD20 pode conduzir à destruição e depleção de células B neoplásicas. Adicionalmente, agentes químicos ou marcadores radioativos tendo o potencial para destruir o tumor podem ser conjugados com o anticorpo anti-CD20 de modo que o agente é especificamente "administrado" às células B neoplásicas. Independentemente da abordagem, um objetivo principal consiste em destruir o tumor; a abordagem específica pode ser determinada pelo anticorpo anti-CD20 particular que é utilizado e, portanto, as abordagens disponíveis para direcionar o antígeno CD20 podem variar consideravelmente.

CD19 é outro antígeno que é expresso sobre a superfície de células da linhagem B. Tal como o CD20, CD19 é encontrado em células ao longo da diferenciação da

linhagem a partir do estágio de célula estaminal até um ponto imediatamente antes da diferenciação terminal em células plasmáticas (Nadler, L. *Lymphocyte Typing II* 2: 3-37 e Apêndice, Renling et al. eds. (1986) por Springer Verlag). Contudo, ao contrário de CD20, a ligação de anticorpo a CD19 provoca a internalização do antígeno CD19. O antígeno CD19 é identificado pelo anticorpo HD237-CD19 (também denominado o anticorpo μ B4 μ) (Kiesel et al. *Leukemia Research II*, 12: 1119 (1987)), entre outros. O antígeno CD19 está presente em 4-8 % das células mononucleares do sangue periférico e em mais de 90 % das células B isoladas a partir do sangue periférico, baço, gânglios linfáticos ou amígdalas. CD19 não é detectado nas células T do sangue periférico, monócitos ou granulócitos. Virtualmente todas as leucemias linfoblásticas agudas (ALL) de células não T, leucemias linfocíticas crônicas (CLL) de células B e linfomas de células B expressam CD19 detectável pelo anticorpo B4 (Nadler et al. *J. Immunol.* 131:244 (1983); e Nadler et al. em *Progress in Hematology Vol. XII* pp. 187-206. Brown, E. ed. (1981) por Grune e Stratton, Inc).

Foram identificados anticorpos adicionais que reconhecem antígenos específicos do estágio de diferenciação expressos pelas células da linhagem de células B. Entre estes estão o anticorpo B2 direcionado contra o antígeno CD21; anticorpo B3 direcionado contra o antígeno CD22 e o anticorpo J5 direcionado contra o antígeno CD10 (também denominado CALLA). Veja-se o documento de patente U.S. N.º 5.595.721 publicado a 21 de janeiro de 1997 (Kaminski et al.).

O anticorpo rituximab (RITUXAN®) é um anticorpo monoclonal murino/humano quimérico manipulado geneticamente direcionado contra o antígeno CD20. O rituximab é o anticorpo denominado μ C2B8 μ no documento de patente U.S. N.º 5.736.137 publicado a 7 de abril de 1998 (Anderson et

al.). O RITUXAN® está indicado para o tratamento de pacientes com linfoma não Hodgkin de células B, CD20 positivo, reincidente ou refratário de baixo grau ou folicular. Estudos sobre o mecanismo de ação *in vitro* demonstraram que o RITUXAN® se liga ao complemento humano e lisa linhas de células B linfoides através de CDC (Reff et al. Blood 83(2):435-445 (1994)). Adicionalmente, tem atividade significativa em ensaios para ADCC. Mais recentemente, o RITUXAN® mostrou ter efeitos antiproliferativos em ensaios de incorporação de timidina tritiada e induzir a apoptose diretamente, enquanto outros anticorpos anti-CD19 e CD20 não o fazem (Maloney et al. Blood 88(10):637a (1996)). A sinergia entre RITUXAN® e quimioterapias e toxinas também foi observada experimentalmente. Em particular, o RITUXAN® sensibiliza linhas de células de linfoma de células B humanas aos efeitos citotóxicos da doxorubicina, CDDP, VP-16, toxina da difteria e ricina (Demidem et al. Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3):177-186 (1997)). Estudos pré-clínicos *in vivo* mostraram que o RITUXAN® esgota as células B do sangue periférico, gânglios linfáticos e medula óssea de macacos cinomolgos, supostamente por meio de processos mediados por células e complemento (Reff et al. Blood 83(2):435-445 (1994)).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona anticorpos multivalentes (por exemplo, anticorpos tetravalentes) com quatro ou mais sítios de ligação a antígeno, como definido na reivindicação 1. Numa forma de realização, o anticorpo multivalente compreende cinco ou mais (por exemplo, até cerca de oito) sítios de ligação a antígeno. O antígeno multivalente do presente documento é preferentemente não uma IgA ou IgM de sequência nativa e pode ter apenas uma região Fc.

Os anticorpos multivalente do presente documento têm

propriedades que são desejáveis, entre outras coisas, desde um ponto de vista terapêutico. Por exemplo, o anticorpo multivalente pode (1) ser internalizado (e/ou catabolizado) mais rapidamente que um anticorpo bivalente por uma célula expressando um antígeno ao qual os anticorpos se ligam; (2) ser um anticorpo agonista; e/ou (3) induzir a morte celular e/ou apoptose de uma célula que expressa um antígeno ao qual o anticorpo multivalente é capaz de se ligar. O anticorpo parental que proporciona pelo menos uma especificidade de ligação de antígeno pode ser um que é internalizado (e/ou catabolizado) por uma célula que expressa um antígeno ao qual o anticorpo se liga; e/ou pode ser um anticorpo agonista, indutor da morte celular e/ou indutor da apoptose, e a forma multivalente do anticorpo como descrito no presente documento pode apresentar uma ou mais melhorias numa ou mais destas propriedades. Além disso, o anticorpo parental pode carecer de uma ou mais destas propriedades, mas pode ser dotado com elas quando construído como um anticorpo multivalente como descrito no presente documento.

Os quatro ou mais sítios de ligação a antígeno dos anticorpos multivalentes do presente documento podem todos ligar-se ao mesmo antígeno; ou podem ligar-se a dois ou mais (por exemplo, desde dois a cerca de três) antígenos diferentes.

O anticorpo multivalente pode ligar-se a (1) uma proteína da superfície celular expressa (ou superexpressa) por células tumorais, por exemplo, ao Recetor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), recetor HER2, recetor HER3, recetor HER4, ou DcR3; (2) um recetor na superfamília do recetor de Fator de Necrose Tumoral (TNF) (por exemplo, um recetor de Apo2L, como DR4, DR5, DcR1 ou DcR2); e/ou (3) um antígeno de superfície de células B (como CD19, CD20, CD22 ou CD40). Na forma de realização preferida da invenção, todos os sítios de ligação a antígeno funcionais do

anticorpo multivalente se ligam ao mesmo antígeno como listado acima (por exemplo, todos os quatro sítios de ligação a antígeno de um anticorpo tetravalente se ligam a (1), (2) ou (3)).

A invenção também proporciona imunocombinados que compreendem o anticorpo multivalente conjugado com um agente citotóxico. O agente citotóxico aqui pode ser um que é ativo na morte das células uma vez internalizado.

É divulgado no presente documento uma cadeia polipeptídica que compreende $VD1-(X1)_n-VD2(X2)_n-Fc$, em que $VD1$ é um primeiro domínio variável, $VD2$ é um segundo domínio variável, Fc é uma cadeia polipeptídica de uma região Fc , $X1$ e $X2$ representam um aminoácido ou polipeptídeo e n é 0 ou 1. Por exemplo, a cadeia polipeptídica pode compreender uma cadeia $VH-CH1$ -ligante flexível- $VH-CH1$ -região Fc ; cadeia $VH-CH1-VH-CH1$ -região Fc ; cadeia $VL-CL$ -ligante flexível- $VL-CL$ -região Fc ou cadeia $VL-CL-VL-CL$ -região Fc . A cadeia polipeptídica pode compreender $VH-CH1$ -ligante flexível- $VH-CH1$ -domínio de dimerização; $VH-CH1-VH-CH1$ -domínio de dimerização; $VL-CL$ -ligante flexível- $VL-CL$ -domínio de dimerização ou $VL-CL-VL-CL$ -domínio de dimerização. Por exemplo, a cadeia polipeptídica pode compreender uma cadeia $VH-CH1$ -ligante flexível- $VH-CH1$ -região de dobradiça; $VH-CH1-VH-CH1$ -região de dobradiça. É divulgado no presente documento um anticorpo que compreende uma ou mais (preferentemente duas) de tais cadeias polipeptídicas. O anticorpo preferentemente compreende pelo menos dois (e preferentemente quatro) polipeptídeos de domínio variável de cadeia leve ou cadeia pesada, por exemplo, onde os polipeptídeos de domínio variável de cadeia leve compreendem $VL-CL$ e os polipeptídeos de domínio variável de cadeia pesada compreendem $VH-CH1$.

É divulgado no presente documento uma cadeia polipeptídica que compreende três ou mais domínios variáveis de cadeia pesada ou cadeia leve, em que cada dos

domínios variáveis é capaz de se combinar com três ou mais polipéptidos de domínio variável de cadeia leve ou cadeia pesada para formar três ou mais sítios de ligação a antígeno, cada um direcionado contra o mesmo antígeno. É divulgado no presente documento um anticorpo isolado que compreende a cadeia polipeptídica. Quando a cadeia polipeptídica compreende três ou mais domínios variáveis de cadeia pesada, o anticorpo pode compreender adicionalmente três ou mais polipéptidos de domínio variável de cadeia leve que se podem combinar com os domínios variáveis de cadeia pesada para formar três ou mais sítios de ligação a antígeno. Exemplos de tais anticorpos são mostrados na Fig. 23D (com três sítios de ligação a antígeno) e na Fig. 23E (com quatro sítios de ligação a antígeno). É divulgada no presente documento uma cadeia polipeptídica que compreende a fórmula: (a) VL-CL-ligante flexível-VL-CL-ligante flexível-VL-CL; (b) VH-CH1-ligante flexível-VH-CH1-ligante flexível-VH-CH1; (c) (VL-CL)_n, em que n é três ou mais; ou (d) (VH-CH1)_n, em que n é três ou mais.

A invenção proporciona adicionalmente: um ácido nucleico isolado que codifica o anticorpo multivalente; um vetor que compreende o ácido nucleico que codifica o anticorpo multimérico, opcionalmente, operativamente ligado a sequências de controlo reconhecidas por uma célula hospedeira transformada com o vetor; uma célula hospedeira que compreende (por exemplo, transformada com) o ácido nucleico que codifica o anticorpo multimérico ou cadeia polipeptídica; um método para a produção do anticorpo multivalente que compreende cultivar a célula hospedeira de modo que o ácido nucleico é expresso e, opcionalmente, recuperar o anticorpo multivalente ou cadeia polipeptídica a partir da cultura de células hospedeiras (por exemplo, a partir do meio de cultura das células hospedeiras). Os ácidos nucleicos que codificam (1) os domínios variáveis de cadeia pesada e (2) os domínios variáveis de cadeia leve do

anticorpo multivalente são preferentemente coexpressos por uma célula hospedeira transformada com ambos (1) e (2). Os ácidos nucleicos (1) e (2) podem estar presentes no mesmo vetor, ou em vetores diferentes.

São contempladas aplicações diagnósticas e terapêuticas para os anticorpos multivalentes divulgados no presente documento. É divulgado no presente documento um método para determinar a presença de um antigénio de interesse que compreende a exposição de uma amostra suspeita de conter o antigénio para o anticorpo multivalente e determinar a ligação do anticorpo multivalente à amostra. Ambos métodos de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* são divulgados no presente documento.

É divulgado no presente documento um método para o tratamento de um mamífero que padece de, ou é predisposto a, uma doença ou distúrbio, que compreende administrar ao mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo multivalente como divulgado no presente documento, ou de uma composição que compreende o anticorpo multivalente e um veículo farmacêuticamente aceitável. O distúrbio a ser tratado no presente documento pode ser cancro, em cujo caso o método pode compreender adicionalmente a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente citotóxico ao mamífero. É divulgado no presente documento um método para induzir a apoptose de uma célula cancerosa que compreende a exposição da célula a um anticorpo multivalente como descrito no presente documento, em que o anticorpo multivalente se liga a um recetor na superfamília de recetores do Fator de Necrose Tumoral (TNF). O método pode envolver a morte de uma célula B através da exposição da célula B a um anticorpo multivalente que se liga a um antigénio de superfície das células B. Além disso, o método pode referir-se à morte de uma célula que expressa (ou superexpressa) um recetor ErbB que compreende a exposição

da célula a um anticorpo que se liga ao recetor ErbB.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 é uma representação esquemática de uma IgG nativa e da digestão da mesma com (1) papaína para gerar dois fragmentos Fab e uma região Fc ou (2) pepsina para gerar um fragmento $F(ab')_2$ e múltiplos fragmentos pequenos. As pontes de dissulfureto são representadas por linhas entre os domínios CH1 e CL e os dois domínios CH2. V é domínio variável; C é domínio constante; L significa cadeia leve e H significa cadeia pesada.

As Figuras 2A-E ilustram as estruturas dos cinco isotipos de imunoglobulina principais que ocorrem naturalmente; IgG (Fig. 2A), IgD (Fig. 2B), IgE (Fig. 2C), dímero de IgA (Fig. 2D) e pentâmero de IgM (Fig. 2E).

A Figura 3 ilustra os alinhamentos das regiões Fc de IgG de sequência nativa. Sequências de região Fc de IgG humana de sequência nativa, humIgG1 (alotipos não A e A) (SEQ ID NOs: 1 e 2, respetivamente), humIgG2 (SEQ ID NO:3), humIgG3 (SEQ ID NO:4) e humIgG4 (SEQ ID NO:5), são mostrados. A sequência de IgG1 humana é o alotipo não A, e diferenças entre esta sequência a o alotipo A (nas posições 356 e 358; sistema de numeração EU) são mostradas abaixo da sequência de IgG1 humana. Sequências de região Fc de IgG murina de sequência nativa, murIgG1 (SEQ ID NO:6), murIgG2A (SEQ ID NO:7), murIgG2B (SEQ ID NO:8) e murIgG3 (SEQ ID NO:9), também são mostradas.

As Figuras 4A-B ilustram esquematicamente anticorpos tetravalentes de acordo com a presente invenção. Na Fig. 4A, os quatro Fabs de ligação a antigénio são numerados (1 e 2 para cada braço do anticorpo tetravalente) e X representa um domínio de dimerização. Na Fig. 4B, o domínio de dimerização do

anticorpo tetravalente é uma região Fc.

A Figura 5 mostra a construção usada para expressão de um anticorpo anti-HER2 tetravalente (OctHER2) no Exemplo 1.

As Figuras 6A-C ilustram a ligação de OctHER2 (Fig. 6A); rhuMAb de IgG1 bivalente 4D5-8 expresso por células 293 (Fig. 6B); e HERCEPTIN® em frascos (expresso por células de ovário de hamster chinês (CHO)) (Fig. 6C) para o domínio extracelular (ECD) de HER2 como determinado utilizando um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

A Figura 7 ilustra uma análise de ultracentrifugação da ligação de OctHER2 ao ECD de HER2. São mostradas as massas moleculares médias (teóricas ou determinadas experimentalmente) frente à razão molar de OctHER2 para o ECD de HER2. As massas moleculares médias calculadas teóricas assumindo que o anticorpo tetravalente tem quatro sítios de ligação completamente funcionais são mostradas em círculos; as massas moleculares médias calculadas teóricas assumindo que o anticorpo tetravalente tem três sítios de ligação completamente funcionais são mostradas em quadrados; e os triângulos representam massas moleculares determinada experimentalmente.

As Figuras 8A-D ilustram a atividade inibitória do crescimento de HERCEPTIN® em comparação com OctHER2 utilizando linhas celulares SKBR3 (que superexpressa HER2 3+) (Fig. 8A), MDA 361 (que superexpressa HER2 2+) (Fig. 8B), BT474 (que superexpressa HER2 3+) (Fig. 8C) e MCF7 (que superexpressa HER2 0+) (Fig. 8D).

A Figura 9 ilustra o efeito de ligantes flexíveis sobre a atividade inibidora do crescimento dos anticorpos anti-HER2 tetravalentes em relação a células MDA 231 (superexpressa HER2 1+) ou células SKBR3 (superexpressa HER2 3+).

As Figuras 10A-B comparam a taxa de internalização/catabolismo de OctHER2 (Fig. 10A) com a de HERCEPTIN® (Fig. 10B), em relação a ambas as linhas celulares MDA 453 (superexpressa HER2 2+) e SKBR3 (superexpressa HER2 3+). As Figuras 11A-I são fotografias de microscopia eletrônica que mostram a internalização de OctHER2. As Figuras 11A-F mostram a localização subcelular de ¹²⁵I-OctHER2 em células SKBR3. Foram observados grãos de prata autorradiográficos associados com as vilosidades da membrana celular apical (Fig. 11A), em estreita proximidade com uma reentrância revestida em formação (Fig. 11B, seta), com vesículas citosólicas lisas (Figs. 11C e D) e endossomas (Figs. 11 E e F). Barras = 0,25 µM. As Figs. 11G-I mostram a internalização no tempo 0 horas (Fig. 11G) e 5 horas (Figs. 11H e 11I). As Figuras 12A-E ilustram a apoptose induzida por um anticorpo tetravalente anti-DR5 (Octopus 16E2), um anticorpo IgG bivalente anti-DR5 (IgG 16E2), e Apo2L/TRAIL (Apo2L) sobre linhas celulares de cancro: COLO 205 (Fig. 12A), SK-MES-1 (Fig. 12B), HCT116 (Fig. 12C), e HOP 92 (Fig. 12D), em comparação com uma linha celular de controlo não cancerosa, HUMEC (Fig. 12E). As Figuras 13A-D são lâminas histológicas coradas para detetar células apoptóticas. Tecidos tumorais a partir de ratinhos tratados com Octopus 16E2 ou Apo2L/TRAIL foram fixos em formalina a 10 % e depois incorporados em parafilme e seccionados sobre lâminas que foram depois coradas com hematoxilina e eosina e visualizadas sob uma ampliação de 400X. O efeito de Octopus 16E2 a 6 e 24 horas é mostrado nas Figs. 13A e B, respetivamente; as células tratadas com controlo são mostradas na Fig. 13C; e células tratadas com Apo2/TRAIL são mostradas na Fig. 13D.

A Figura 14 representa a atividade *in vivo* de

Apo2L/TRAIL (60 mg/kg, 5x/semana), IgG bivalente 3H3 (5 mg/kg dado nos dias 0, 3, 5 e 9), IgG bivalente 16E2 (16E2) (5 mg/kg dado nos dias 0, 3, 5 e 9), e Octopus 16E2 (5 mg/kg dado nos dias 0, 3, 5 e 9) em relação a tumores COLO 205 em ratinhos nus atímicos.

A Figura 15 representa um ensaio *in vitro* alamarBlue que confirma a atividade apoptótica do material utilizado nos estudos de ratinhos (Apo2L/TRAIL e Octopus 16E3) em comparação com o controlo positivo padrão de Apo2L. Confirmou-se que o anticorpo anti-IgE (E25) utilizado como controlo negativo nos estudos de ratinho não tinha qualquer atividade apoptótica.

A Figura 16 representa os resultados de um ensaio de apoptose de cristal violeta comparando Octopus 3H3 anti-DR5 com vários lotes do Octopus 16E2 anti-DR5.

As Figuras 17A-B revelam os resultados do ensaio de apoptose alamarBlue em relação a Apo2L/TRAIL (documento W097/25428), anticorpo Octopus 3H3 anti-DR5, anticorpo Octopus 16E2 anti-DR5, e Apo2L/TRAIL com uma etiqueta de epítipo FLAG reticulada por um anticorpo anti-FLAG (documento W097/25428), em relação a células SK-MES-1 (Fig. 17A) e Jurkat (Fig. 17B) na presença de soro fetal bovino a 5 % (FBS).

As Figuras 18A-C ilustram curvas de resposta à dose que mostram o efeito do Octopus 16E2 anti-DR5 (gráficos superiores) em comparação com Apo2L/TRAIL (gráficos inferiores) sobre o crescimento de linhas celulares tumorais humanas de leucemia, cancro pulmonar de células não pequenas, cancro do cólon, cancro do sistema nervoso central (SNC), melanoma, cancro ovárico, cancro renal, cancro de próstata e cancro de mama aos 2 dias. Os resultados são a partir do National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program. Todas as amostras foram testadas a 5 concentrações, começando a 1 % da solução-mãe

(solução-mãe de Octopus 16E2 a 0,2 mg/ml) e 4 x 0,5 diluições log.

As Figuras 19A-C ilustram curvas de resposta à dose que mostram o efeito do Octopus 16E2 anti-DR5 (gráficos superiores) em comparação com Apo2L/TRAIL (gráficos inferiores) sobre o crescimento de linhas celulares tumorais humanas de leucemia, cancro pulmonar de células não pequenas, cancro do cólon, cancro do sistema nervoso central (SNC), melanoma, cancro ovárico, cancro renal, cancro de próstata e cancro de mama aos 6 dias. Os resultados são a partir do National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program. Todas as amostras foram testadas a 5 concentrações, começando a 1 é da solução-mãe (solução-mãe de Octopus 16E2 a 0,2 mg/ml) e 4 x 0,5 diluições log.

As Figuras 20A-B apresentam um resumo quantitativo dos resultados *in vitro* aos 2 dias do National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program comparando o Octopus 16E2 anti-DR5 (Fig. 20A) com Apo2L/TRAIL (Fig. 20B) analisando a inibição do crescimento (GI50), estase (TGI) e toxicidade (CL50).

As Figuras 21A-B apresentam um resumo quantitativo dos resultados *in vitro* aos 6 dias do National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program comparando o Octopus 16E2 anti-DR5 (Fig. 21A) com Apo2L/TRAIL (Fig. 21B) analisando a inibição do crescimento (GI50), estase (TGI) e toxicidade (CL50).

A Figura 22 ilustra a apoptose de células Wil-2 pelo anticorpo RITUXAN® anti-CD20, RITUXAN® reticulado com um anticorpo anti-IgG humana (RITUXAN®-IgG) e um anticorpo anti-CD20 tetravalente (OctCD20).

As Figuras 23A-E são representações ilustrando o anticorpo Octopus/tetravalente de comprimento completo (Fig. 23B), o F(ab)'₂ de Octopus (Fig. 23C), Fab de

POPoct-3 (Fig. 23D) e Fab de POPoct-4 (Fig. 23E) em comparação com a IgG nativa (Fig. 23A). Um gel de Tris-Glicina corado com coomassie representativo de proteínas de Octopus anti-CD20 (C2B8) compara os tamanhos dos anticorpos intactos em condições não redutoras (Fig. 23F), e das cadeias pesadas em condições redutoras, sob as quais as ligações dissulfureto são interrompidas resultando na separação das cadeias pesada e leve (Fig. 23G).

A Figura 24 ilustra a construção da cadeia principal de $F(ab')_2$ de Octopus. Qualquer região VH/CH1 pode ser substituída na cadeia principal de $F(ab')_2$ através dos sítios de enzimas de restrição BamHI, NheI e BspEI.

A Figura 25 ilustra a construção da cadeia pesada de POPoct-3.

A Figura 26 ilustra a construção da cadeia pesada de POPoct-4.

A Figura 27 ilustra a atividade de anticorpos anti-HER2 multivalentes em ensaios de citoestase utilizando células BT474.

As Figuras 28A-B ilustram a atividade de anticorpos anti-HER2 multivalentes em ensaios de citoestase utilizando células SKBR3. As figuras são traçados representativos de ensaios de citoestase n=4.

As Figuras 29A-B mostram a capacidade de internalização de anticorpos anti-HER2 multivalentes em células SKBR3 (Fig. 29A) e células BT474 (Fig. 29B).

As Figuras 30A-B revelam a apoptose de células COLO205 por anticorpos anti-DR5 multivalentes.

As Figuras 31A-B demonstram a sinalização de anticorpos anti-DR5 multivalentes através da via da caspase.

A Figura 32 compara a apoptose induzida por RITUXAN® reticulado com IgG (RITUXAN-IgG) e OctCD20 reticulado

com IgG (OctCD20-IgG).

A Figura 33 mostra a apoptose de células WIL2 por anticorpos anti-CD20 multivalentes, o anticorpo anti-CD20 IF5 (Clark et al. PNAS (USA) 82:1766-1770 (1985)) e anticorpo IF5 reticulado com IgG (IF5 + IgG-X).

A Figura 34 ilustra a adesão de células homotípicas em células WIL2S induzida pelo anticorpo anti-CD20 IF5, anticorpo IF5 reticulado com IgG e POPoct-3 CD20.

A Figura 35 reflete a internalização/catabolismo de RITUXAN® ou OctCD20 em linhas celulares DB, WIL2 e de linfoma de células B Ramos.

Descrição detalhada das formas de realização preferidas

I. Definições

Ao longo da presente memória descritiva e reivindicações, a numeração dos resíduos numa cadeia pesada de imunoglobulina é aquela do índice EU como em Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). O "índice EU como em Kabat" refere-se à numeração de resíduos do anticorpo EU IgG1 humano.

Um "recetor ErbB" é uma proteína tirosina quinase recetora que pertence à família de recetores de ErbB e inclui os recetores EGFR, HER2, ErbB3 e ErbB4 bem como TEGFR (documento de patente U.S. 5.708.156) e outros membros desta família a ser identificados no futuro. O recetor ErbB irá compreender, no geral, um domínio extracelular, que se pode ligar a um ligando de ErbB; um domínio de transmembrana lipofílico; um domínio de tirosina quinase intracelular conservado; e um domínio de sinalização no terminal carboxilo que alberga vários resíduos de tirosina que podem ser fosforilados. O recetor ErbB pode ser um recetor ErbB de sequência nativa ou uma variante de sequência de aminoácidos do mesmo. Preferentemente o recetor ErbB é o recetor ErbB humano de sequência nativa.

Por μ ligando de ErbB μ entende-se um polipéptido que se liga a e/ou ativa um recetor ErbB. O ligando de ErbB de particular interesse no presente documento é um ligando de ErbB humano de sequência nativa como o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) (Savage *et al.*, J. Biol. Chem. 247:7612-7621 (1972)); o Fator de Crescimento Transformante alfa (TGF-alfa) (Marquardt *et al.*, Science 223:1079-1082 (1984)); anfirregulina também conhecida como schwanoma ou fator de crescimento autócrino de queratinócitos (Shoyab *et al.* Science 243:1074-1076 (1989); Kimura *et al.* Nature 348:257-260 (1990); e Cook *et al.* Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing *et al.*, Science 259:1604-1607 (1993); e Sasada *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173 (1993)); fator de crescimento epidérmico de ligação de heparina (HB-EGF) (Higashiyama *et al.*, Science 251:936-939 (1991)); epirregulina (Toyoda *et al.*, J. Biol. Chem. 270:7495-7500 (1995); e Komurasaki *et al.* Oncogene 15:2841-2848 (1997)), uma herregulina (veja-se abaixo); neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway *et al.*, Nature 387:512-516 (1997)); neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567 (1997)); ou cripto (CR-1) (Kannan *et al.* J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335 (1997)). Os ligandos de ErbB que se ligam a EGFR incluem EGF, TGF-alfa, anfirregulina, betacelulina, HB-EGF e epirregulina. Os ligandos de ErbB que se ligam a HER3 incluem herregulinas. Os ligandos de ErbB capazes de se ligar a HER4 incluem betacelulina, epirregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3 e herregulinas.

μ Herregulina μ (HRG) quando utilizado no presente documento refere-se a um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos codificada pelo produto génico de herregulina como divulgado no documento de patente U.S. N.º 5.641.869 ou Marchionni *et al.*, Nature, 362:312-318 (1993), e variantes biologicamente ativas de tais polipéptidos. Exemplos de herregulinas incluem herregulina-alfa,

herregulina-beta1, herregulina-beta2 e herregulina-beta3 (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); e documento de patente U.S. N.º 5.641.869); fator de diferenciação de neu (NDF) (Peles et al. Cell 69: 205-216 (1992)); atividade indutora de recetor de acetilcolina (ARIA) (Falls et al. Cell 72:801-815 (1993)); fatores de crescimento glial (GGFs) (Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)); fator derivado de neurónios sensoriais e motores (SMDF) (Ho et al. J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)); gama-herregulina (Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)). Um exemplo de um fragmento biologicamente ativo/variante de sequência de aminoácidos de um polipéptido HRG de sequência nativa, é um fragmento de domínio semelhante a EGF (por exemplo, HRGbeta1₁₇₇₋₂₄₄).

Um "hetero-oligómero de ErbB" no presente documento é um oligómero associado de forma não covalente que compreende pelo menos dois recetores ErbB diferentes. Tais complexos podem formar-se quando uma célula que expressa dois ou mais recetores ErbB é exposta a um ligando de ErbB e podem ser isolados por imunoprecipitação e analisados por SDS-PAGE como descrito em Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994), por exemplo. Exemplos de tais hetero-oligómeros de ErbB incluem complexos de EGFR-HER2, HER2-HER3 e HER3-HER4. Além disso, o hetero-oligómero de ErbB pode compreender dois ou mais recetores HER2 combinados com um recetor ErbB diferente, como HER3, HER4 ou EGFR. Outras proteínas, como uma subunidade de recetor de citocina (por exemplo, gp130), podem ser incluídas no hetero-oligómero.

Os termos "ErbB1", "recetor de fator de crescimento epidérmico" e "EGFR" são utilizados indistintamente no presente documento e referem-se ao EGFR de sequência nativa como divulgado, por exemplo, em Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987), incluindo variantes do mesmo (por exemplo, um mutante de deleção de RGFR como em

Humphrey et al. PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)). *erbB1* refere-se ao gene que codifica o produto proteico de EGFR. Exemplos de anticorpos que se ligam a EGFR incluem MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (veja-se, documento de patente U.S. N.º 4.943.533, Mendelsohn et al.) e variantes dos mesmos, como 225 quimerizado (C225) e 225 humano remodelado (H225) (veja-se, o documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.).

As expressões μ ErbB2 μ e μ HER2 μ são utilizadas indistintamente no presente documento e referem-se à proteína HER2 humana de sequência nativa descrita, por exemplo, em Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) e Yamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (número de acesso do Genebank X03363), e variantes da mesma. O termo *erbB2* refere-se ao gene que codifica HER2 humano e *neu* refere-se ao gene que codifica p185^{neu} de rato. O HER2 preferido é HER2 humano de sequência nativa. Exemplos de anticorpos que se ligam a HER2 incluem os MAbs 4D5 (ATCC CRL 10463), 2C4 (ATCC HB-12697), 7F3 (ATCC HB-12216) e 7C2 (ATCC HB 12215) (veja-se, documento de patente U.S. N.º 5.772.997; documento WO98/77797 e documento de patente U.S. N.º 5.840.525). Os anticorpos anti-HER2 humanizados incluem huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 e huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) como descrito no Quadro 3 do documento de patente U.S. 5.821.337; 520C9 humanizado (WO93/21319). Os anticorpos anti-HER2 humanos são descritos no documento de patente U.S. N.º 5.772.997 publicado a 30 de junho de 1998 e documento WO 97/00271 publicado a 3 de janeiro de 1997.

μ ErbB3 μ e μ HER3 μ referem-se ao polipéptido recetor como divulgado, por exemplo, nos documentos de patente U.S. N.ºs 5.183.884 e 5.480.968 bem como Kraus et al. PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989), incluindo variantes do mesmo. Exemplos de anticorpos que se ligam a HER3 são descritos no

documento de patente U.S. N.º 5.968.511 (Akita e Sliwowski), por exemplo, o anticorpo 8B8 (ATCC HB 12070) ou uma variante humanizada do mesmo.

Os termos μ ErbB4 μ e μ HER4 μ no presente documento referem-se ao polipéptido recetor como divulgado, por exemplo, no pedido de patente EP N.º 599.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); e Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993), incluindo variantes do mesmo como as isoformas de HER4 divulgadas no documento WO 99/19488.

Um μ marcador de superfície de células B μ no presente documento é um antigénio expresso sobre a superfície de uma célula B que pode ser alvejado com um anticorpo que se liga ao mesmo. Marcadores de superfície de células B exemplificativos incluem os marcadores de superfície leucocitários CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 e CD86. O marcador de superfície de células B de interesse particular é preferentemente expresso em células B em comparação com outros tecidos de células não B de um mamífero e pode ser expresso em células B precursoras e células B maduras. Numa forma de realização, o marcador é um, como CD20 ou CD19, que é encontrado nas células B ao longo da diferenciação da linhagem a partir do estágio de célula estaminal até um ponto imediatamente antes da diferenciação terminal em células plasmáticas. Os marcadores de superfície das células B preferidos no presente documento são CD19, CD20, CD22 e CD40.

O antigénio μ CD20 μ é uma fosfoproteína não glicosilada de cerca de 35 kDa encontrada na superfície de mais de 90 % das células B do sangue periférico ou dos órgãos linfoides. O CD20 é expresso durante o desenvolvimento precoce das células pré-B e permanece até à diferenciação em células plasmáticas. O CD20 está presente em ambas células B

normais bem como células B malignas. Outros nomes para CD20 na bibliografia incluem antígeno restrito a linfócitos B μ e μ Bp35 μ . O antígeno CD20 é descrito em Clark et al. PNAS (USA) 82:1766 (1985), por exemplo. Exemplos de anticorpos que se ligam ao antígeno CD20 incluem: μ C2B8 μ que é agora denominado rituximab μ (μ RITUXAN μ) (documento de patente U.S. N.º 5.736.137); o anticorpo murino 2B8 marcado com ítrio-[90] designado μ Y2B8 μ (documento de patente U.S. N.º 5.736.137); IgG2a μ B1 μ murino opcionalmente marcado com ^{131}I para gerar o anticorpo $\mu^{131}\text{I}$ -B1 μ (BEXXAR μ) (documento de patente U.S. N.º 5.595.721); anticorpo monoclonal murino μ 1F5 μ (Press et al. Blood 69(2):584-591 (1987)); anticorpo μ 2H7 quimérico (documento de patente U.S. N.º 5.677.180 e anticorpos monoclonais L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 ou NU-B2 disponível a partir do International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et al., Em: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))).

O antígeno μ CD19 μ refere-se ao antígeno de cerca de 90 kDa identificado, por exemplo, pelo anticorpo HD237-CD19 ou B4 (Kiesel et al. Leukemia Research II, 12: 1119 (1987)). Tal como o CD20, CD19 é encontrado em células ao longo da diferenciação da linhagem a partir do estágio de célula estaminal até um ponto imediatamente antes da diferenciação terminal em células plasmáticas. A ligação de um anticorpo a CD19 pode provocar a internalização do antígeno CD19. Exemplos de anticorpos que se ligam ao antígeno CD19 incluem os anticorpos anti-CD19 em Hekman et al. Cancer Immunol. Immunother. 32:364-372 (1991) e Vlasveld et al. Cancer Immunol. Immunother. 40:37-47 (1995); e o anticorpo B4 em Kiesel et al. Leukemia Research II, 12: 1119 (1987).

O antígeno μ CD22 μ tem uma massa molecular de cerca de 140.000 kD. CD22 é expresso no citoplasma das células pré-B precoces e células progenitoras, aparece na superfície apenas de células B maduras e na maioria das células de

linfoma não Hodgkin (NHL), e é depois perdido durante a diferenciação terminal antes do estágio de célula plasmática a partir tanto da superfície como do citoplasma. Um exemplo de um anticorpo anti-CD22 é o anticorpo LL2 descrito em Juweid et al. Cancer Research 55:5899-5907 (1995), incluindo variantes quiméricas/humanizadas do mesmo.

O antigénio μ CD40 μ é uma glicoproteína fosforilada de superfície celular que é expressa numa variedade de tipos celulares, incluindo células B, neoplasias malignas de células B, células dendríticas foliculares, células epiteliais basais e carcinomas. O CD40 liga-se ao ligando de CD40 (CD40L). Além de ser um antigénio de superfície de células B, o CD40 também é um membro da superfamília de recetores de TNF. Exemplos de anticorpos que se ligam a CD40 incluem aqueles que (1) bloqueia a interação de CD40/CD40L e têm propriedades antineoplásicas (Armitage et al., documento de patente U.S. N.º 5.674.492); (2) antagonizam a sinalização através de CD40 (deBoer et al., documento de patente U.S. N.º 5.677.165); (3) distribuem um sinal estimulador através de CD40 mas não aumentam a interação entre CD40 e CD40L, *por exemplo*, G28-5 (Ledbetter et al., documento de patente U.S. N.º 5.182.368); (4) aumentam a interação entre CD40 e CD40L, *por exemplo*, CD40.4 (5C3) (PharMingen, San Diego, Califórnia) e S2C6 (depositado com a Coleção Americana de Culturas Tipo (American Type Culture Collection, ATCC), Manassass, Virginia a 25 de maio de 1999 sob o número de acesso PTA-110).

A μ superfamília do recetor do fator de necrose tumoral μ ou μ superfamília do recetor de TNF μ refere-se a polipéptidos recetores ligados por citocinas na família de TNF. Geralmente, estes recetores são recetores de transmembrana de tipo I com uma ou mais sequências de repetições ricas em cisteína no seu domínio extracelular. A

superfamília de recetores de TNF pode ser adicionalmente subdividida em (1) recetores de morte; (2) recetores chamariz e (3) recetores de sinalização que carecem de domínios de morte. Os recetores de morte contêm na sua região citoplasmática ou intracelular um domínio de morte, ou seja, uma região ou sequência que atua para transduzir sinais na célula que podem resultar na apoptose ou na indução de determinados genes. Os recetores chamariz carecem de um domínio de morte funcional e são incapazes de transduzir sinais que resultam em apoptose. Exemplos de citocinas na família de genes de TNF incluem o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-alfa), Fator de Necrose Tumoral-beta (TNF-beta ou linfotóxina), 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), ligando de Apo-3 (também referido como TWEAK), osteoprotegerina (OPG), APRIL, ligando de RANK (também referido como TRANCE) e TALL-1 (também referido como BlyS, BAFF ou THANK). Exemplos de recetores na superfamília de recetores de TNF incluem: Recetor do Fator de Necrose Tumoral de tipo 1 (TNFR1), Recetor de Fator de Necrose Tumoral de tipo 2 (TNFR2), recetor de Fator de Crescimento Nervoso p75 (NGFR), o antígeno de superfície de células B CD40, o antígeno de células T OX-40, o recetor Apo-1 (também designado Fas ou CD95), o recetor Apo-3 (também designado DR3, swl-1, TRAMP e LARD), o recetor designado Ativador Transmembrana e interatador de CAML ou uTACI, proteína BCMA, DR4, DR5 (alternativamente referido como Apo-2; TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 ou KILLER), DR6, DcR1 (também referido como TRID, LIT ou TRAIL-R3), DcR2 (também denominado TRAIL-R4 ou TRUND), OPG, DcR3 (também denominado TR6 ou M68), CAR1, HVEM (também denominado ATAR ou TR2), GITR, ZTNFR-5, NTR-1, TNFL1, CD30, recetor de linfotóxina beta (LTBr), recetor 4-1BB e TR9

(EP988, 371A1).

Os termos μ ligando de Apo-2 μ ou μ Apo2L μ referem-se aos polipéptidos de Apo2L divulgados no documento WO97/25428, publicado a 17 de julho de 1997. Para propósitos do presente pedido, estes termos também se referem aos polipéptidos referidos como TRAIL divulgados no documento WO97/01633, publicado a 16 de janeiro de 1997 e documento de patente U.S. N.º 5.763.223, emitido em 9 de junho de 1998.

Um μ recetor de Apo2L μ é um polipéptido ao qual o Apo2L se pode ligar especificamente. O termo μ recetor de Apo2L μ quando utilizado no presente documento engloba recetores de Apo2L de sequência nativa e variantes dos mesmos. Estes termos englobam o recetor de Apo2L a partir de uma variedade de mamíferos, incluindo seres humanos. O recetor de Apo2L pode ser isolado a partir de uma variedade de fontes, como a partir de tipos de tecidos humanos ou a partir de outra fonte, ou preparados através de métodos recombinantes ou sintéticos. Exemplos de recetores de Apo2L de μ sequência nativa μ incluem o polipéptido Apo-2 ou DR5 (documento WO98/51793), DR4 de sequência nativa como descrito em Pan *et al.* Science 276:111-113 (1997); recetor chamariz 1 de sequência nativa ou DcR1 como em Sheridan *et al.*, Science 277:818-821 (1997); e recetor chamariz 2 de sequência nativa ou DcR2 como em Marsters *et al.* Curr. Biol. 7:1003-1006 (1997); osteoprotegerina de sequência nativa (veja-se Simonet *et al.* Cell 89:309-319 (1997) e Emery *et al.* J. Interferon and Cytokine Research 18(5): A47 Abstract 2.17 (1998)). Exemplos de anticorpos anti-DR5 incluem 3F11.39.7 (ATCC HB- 12456), 3H3.14.5 (ATCC HB-12534), 3D5.1.10 (HB-12536) e 3H1.18.10 (HB-12535), 16E2 e 20E6 (veja-se o documento WO 98/51793). Exemplos de anticorpos anti-DR4 incluem 4E7.24.3 (ATCC HB-12454) e 4H6.17.8 (ATCC HB-12455) (veja-se, o documento WO 99/37684).

μ DcR3 μ de sequência nativa é descrito no documento WO99/14330. Esta publicação de patente descreve os seguintes mAbs dirigidos contra DcR3: 4C4.1.4 (ATCC HB-12573); 5C4.14.7 (ATCC HB-12574); 11C5.2.8 (ATCC HB-12572); 8D3.1.5 (ATCC HB-12571) e 4B7.1.1 (ATCC HB-12575).

Um polipéptido de μ sequência nativa μ compreende um polipéptido que tem a mesma sequência de aminoácidos que um polipéptido derivado a partir da natureza. Assim, um polipéptido de sequência nativa pode ter a sequência de aminoácidos de um polipéptido de ocorrência natural a partir de qualquer mamífero. Tal polipéptido de sequência nativa pode ser isolado da natureza ou pode ser produzido através de meios recombinantes e/ou sintéticos. O termo polipéptido de μ sequência nativa μ engloba especificamente formas truncadas ou secretadas de ocorrência natural do polipéptido (por exemplo, uma sequência de domínio extracelular), formas variantes de ocorrência natural (por exemplo, formas alternativamente submetidas a *splicing*) e variantes alélicas de ocorrência natural do polipéptido.

Uma μ variantep μ polipeptídica significa um polipéptido biologicamente ativo tendo pelo menos cerca de 80 % de identidade de sequência de aminoácidos com o polipéptido de sequência nativa. Tais variantes incluem, por exemplo, polipéptidos em que um ou mais resíduos de aminoácidos são adicionados, ou eliminados, no terminal N ou C do polipéptido. Vulgarmente, uma variante de terá pelo menos cerca de 80 % de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferentemente pelo menos cerca de 90 % de identidade de sequência de aminoácidos, e ainda mais preferentemente pelo menos cerca de 95 % de identidade de sequência de aminoácidos com o polipéptido de sequência nativa.

μ Apoptose μ refere-se à morte celular programada. Eventos fisiológicos normalmente indicativos da ocorrência de apoptose incluem: fragmentação de ADN, retração celular, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular,

e/ou formação de vesículas de membrana (chamadas corpos apoptóticos). Estão disponíveis vários métodos para avaliar os eventos celulares associados com a apoptose. Por exemplo, a translocação de fosfatidil serina (PS) pode ser medida através da ligação de anexina V; a fragmentação de ADN pode avaliada através do escalonamento de ADN ou coloração com iodeto de propídio; e a condensação nuclear/da cromatina em conjunto com a fragmentação do ADN pode ser avaliada através do aumento de quaisquer células hipodiploides.

O termo panticorpo_u é utilizado no sentido mais lato e inclui anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais intactos ou de comprimento completo), anticorpos monoclonais, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), e fragmentos de anticorpos (veja-se abaixo) desde que exibam a atividade biológica desejada.

A menos que indicado o contrário, a expressão panticorpo multivalente_u é utilizada ao longo desta memória descritiva para indicar um anticorpo que compreende três ou mais sítios de ligação a antígeno. O anticorpo multivalente é preferentemente manipulado para ter três ou mais sítios de ligação a antígeno e, geralmente, não é um anticorpo IgM ou IgA de sequência nativa.

μFragmentos de anticorpo_u compreendem apenas uma porção de um anticorpo intacto, geralmente incluindo um sítio de ligação a antígeno do anticorpo intacto e, portanto, retendo a capacidade de se ligar a antígeno. Exemplos de fragmentos de anticorpo englobados pela presente definição incluem: (i) o fragmento Fab, tendo domínios VL, CL, VH e CH1; (ii) o fragmento Fab', que é um fragmento Fab que tem um ou mais resíduos de cisteína no terminal C do domínio CH1; (iii) o fragmento Fd tendo domínios VH e CH1; (iv) o fragmento Fd' tendo domínios VH e CH1 e um ou mais resíduos de cisteína no terminal C do

domínio CH1; (v) o fragmento Fv tendo os domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo; (vi) o fragmento dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste num domínio VH; (vii) regiões CDR isoladas; (viii) fragmentos F(ab')₂, um fragmento bivalente incluindo dois fragmentos Fab' ligados por uma ponte de dissulfureto na região de dobradiça; (ix) moléculas de anticorpo de cadeia simples (por exemplo, Fv de cadeia simples; scFv) (Bird et al., Science 242:423-426 (1988); e Huston et al., PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988)); (x) "diacorpos" com dois sítios de ligação a antigénio, compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (veja-se, por exemplo, o documento EP 404.097; documento WO 93/11161 e Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); (xi) "anticorpos lineares" compreendendo um par de segmentos Fd em tandem (VH-CH1-VH-CH1) que, juntamente com polipéptidos de cadeia leve complementares, formam um par de regiões de ligação a antigénio (Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995); e documento de patente U.S. N.º 5.641.870).

O termo "anticorpo monoclonal" como utilizado no presente documento refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto para possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades mínimas. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, estando direcionados contra um antigénio único. Adicionalmente, em contraste com preparações de anticorpos policlonais que incluem tipicamente diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal está direcionado contra um único determinante no antigénio. O modificador "monoclonal" não deve ser interpretado como necessitando a

produção do anticorpo por nenhum método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais para serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma, primeiramente descrito por Kohler et al., Nature 256:495 (1975), ou podem ser feitos por métodos recombinantes de ADN (veja-se, por exemplo, documento de patente U.S. N.º 4.816.567). Os anticorpos monoclonais também podem ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos utilizando as técnicas descritas em Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) ou Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), por exemplo.

Os anticorpos monoclonais no presente documento, incluem especificamente anticorpos quiméricos nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencentes a uma classe ou subclasse particular de anticorpos, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo às sequências correspondentes em anticorpos derivados a partir de outra espécie ou pertencendo a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos dos tais anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (documento de patente U.S. N.º 4.816.567; e Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

Formas humanizadas de anticorpos não humanos (por exemplo, murinos) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Maioritariamente, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) nas quais resíduos de uma região hipervariável do recipiente são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, rato, coelho ou primata não humano tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Nalguns casos, resíduos de região estrutural (FR) da imunoglobulina humana são

substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Adicionalmente, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recetor ou no anticorpo dador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas das ansas hipervariáveis correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas das FRs são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado, opcionalmente, também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) de uma imunoglobulina, tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, veja-se 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).

Um anticorpo humano é um que possui uma sequência de aminoácidos a qual corresponde à de um anticorpo produzido por um ser humano e/ou que tenha sido produzido usando qualquer das técnicas para produzir anticorpos humanos como divulgado no presente documento. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado compreendendo resíduos de ligação ao antigénio não humanos. Os anticorpos humanos podem ser diretamente produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na técnica. Numa forma de realização, o anticorpo humano é selecionado a partir de uma biblioteca de fagos, onde essa biblioteca de fagos 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)). Os anticorpos humanos também podem ser feitos através da introdução de loci de imunoglobulina humana em animais transgênicos, por exemplo, ratinhos nos

quais os genes de imunoglobulina endógenos foram parcial ou completamente inativados. Depois do desafio, é observada a produção de anticorpos humanos, que se assemelha bastante à vista em seres humanos em todos os aspetos, incluindo rearranjo génico, montagem, e repertório de anticorpos. Esta abordagem é descrita, por exemplo, nos documentos de patente U.S. N.ºs 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, 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 que produzem um anticorpo direcionado contra um antigénio alvo (tais linfócitos B podem ser recuperados a partir de um indivíduo ou podem ter sido imunizados *in vitro*). Veja-se, por exemplo, Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991); e o documento de patente U.S. 5.750.373.

O termo *μvariávelμ* refere-se ao facto de que determinadas porções dos domínios variáveis diferem extensivamente quanto à sequência entre anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para o seu antigénio particular. Contudo, a variabilidade não está uniformemente distribuída ao longo dos domínios variáveis de anticorpos. Está concentrada em três segmentos denominados regiões hipervariáveis nos domínios variáveis tanto de cadeia leve como de cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são denominadas regiões estruturais (FRs). Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves nativas

compreendem, cada um, quatro FRs, adotando grandemente uma configuração de folha beta, conectada por três regiões hipervariáveis, que formam ansas que conectam, e em alguns casos fazem parte, da estrutura de folha beta. As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas em conjunto em estreita proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis a partir da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação a antígeno dos anticorpos (veja-se Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efectoras, como participação do anticorpo na citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC).

O termo *região hipervariável* quando utilizado no presente documento refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação a antígeno. A *região hipervariável* geralmente compreende resíduos de aminoácidos a partir de uma *região de determinação de complementaridade* ou *μCDR*" (por exemplo resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou aqueles resíduos a partir de uma *ansa hipervariável* (por exemplo, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Resíduos *μde região estrutural* ou de *μFR* são aqueles resíduos de domínio variável que não os resíduos da *região hipervariável* como definido no presente documento.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, anticorpos intactos podem ser atribuídos a diferentes *μ*classes. Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias destas podem ser adicionalmente divididas em *μ*subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1 (incluindo alotipos A e não A), IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de anticorpos denominam-se α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente. As estruturas da subunidade e as configurações tridimensionais das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

As cadeias leves dos anticorpos a partir de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, denominados *κ* (capa) e *λ* (lambda), com base nas sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

O termo *μ*região Fc é utilizado para definir a região C-terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina que pode ser gerada por digestão por 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 de cadeia pesada de IgG humana é normalmente definida como estendendo-se desde um resíduo de aminoácido aproximadamente na posição Cys226, ou desde aproximadamente a posição Pro230, até ao terminal carboxilo da região Fc. A região Fc de uma imunoglobulina geralmente compreende dois domínios constantes, um domínio CH2 e um domínio CH3 e opcionalmente compreende um domínio CH4.

Por *μ*cadeia de região Fc no presente documento entende-se uma de duas cadeias polipeptídicas de uma região Fc.

O *μ*domínio CH de uma região Fc de IgG humana (também referido como domínio *μ*Cy2) estende-se normalmente desde

um resíduo de aminoácido aproximadamente na posição 231 até um resíduo de aminoácido aproximadamente na posição 340. O domínio CH2 é único no sentido em que não está estreitamente emparelhado com outro domínio. Em vez disso, duas cadeias de hidratos de carbono ramificadas ligadas em N estão interpostas entre os dois domínios CH2 de uma molécula IgG nativa intacta. Foi especulado que o hidrato de carbono pode 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 no presente documento pode ser um domínio CH2 de sequência nativa ou domínio CH2 variante.

O domínio CH3µ compreende uma extensão de resíduos C-terminal a um domínio CH2 numa região Fc (ou seja, desde um resíduo de aminoácido aproximadamente na posição 341 até um resíduo de aminoácidos aproximadamente na posição 447 de uma IgG). A região CH3 no presente documento pode ser um domínio CH3 de sequência nativa ou um domínio CH3 variante (por exemplo, um domínio CH3 com uma µprotuberânciaµ introduzida numa cadeia do mesmo e uma µcavidadeµ introduzida correspondente na outra cadeia do mesmo; veja-se o documento de patente U.S. N.º 5.821.333). Tais domínios CH3 variantes podem ser utilizados para produzir anticorpos multiespecíficos (por exemplo, biespecíficos) como descritos no presente documento.

µRegião de dobradiçaµ é geralmente definida como estendendo-se desde aproximadamente Glu216, ou aproximadamente Cys226, até aproximadamente Pro230 da IgG1 humana (Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985)). As regiões de dobradiça de outros isotipos de IgG podem ser alinhadas com a sequência de IgG1 colocando os primeiro e último resíduos de cisteína que formam as ligações S-S inter-cadeia pesada nas mesmas posições. A região de dobradiça do presente documento pode ser uma região de dobradiça de sequência nativa ou uma região de dobradiça

variante. As duas cadeias polipeptídicas de uma região de dobradiça variante retêm pelo menos um resíduo de cisteína por cadeia polipeptídica, de modo que duas cadeias polipeptídicas da região de dobradiça variante podem formar uma ligações dissulfureto entre as duas cadeias. A região de dobradiça preferida no presente documento é uma região de dobradiça humana de sequência nativa, por exemplo, uma região de dobradiça de IgG1 humana de sequência nativa.

Uma região Fc funcional possui pelo menos uma função efetora de uma região Fc de sequência nativa. Funções efetoras exemplificativas incluem ligação de C1q; citotoxicidade dependente de complemento (CDC); ligação a recetor Fc; citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulação negativa dos recetores de superfície celular (por exemplo, recetor de células B; BCR), etc. Tais funções efetoras requerem geralmente que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por exemplo, um domínio variável de anticorpo) e pode ser avaliada utilizando vários ensaios conhecidos na técnica para a avaliação de tais funções efetoras de anticorpos.

Uma região Fc de sequência nativa compreende uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência de aminoácidos de uma região Fc encontrada na natureza. A Fig. 3 proporciona sequências de aminoácidos de regiões Fc de IgG murinas e humanas de sequência nativa.

Uma região Fc variante compreende uma sequência de aminoácidos que difere daquela de uma região Fc de sequência nativa em relação a pelo menos uma modificação de aminoácidos. Preferentemente, a região Fc variante tem pelo menos uma substituição de aminoácidos em comparação com uma região Fc de sequência nativa ou com a região Fc de um polipéptido parental, por exemplo, desde cerca de uma até cerca de dez substituições de aminoácidos, e preferentemente desde cerca de uma a cerca de cinco

substituições de aminoácidos numa região Fc de sequência nativa ou na região Fc do polipéptido parental. A região Fc variante do presente documento possuirá preferentemente 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 parental, e mais preferentemente pelo menos cerca de 90 % de identidade de sequência com a mesma, mais preferentemente pelo menos cerca de 95 % de identidade de sequência com a mesma.

μCitotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos e μADCC referem-se a uma reação mediada por células na qual células citotóxicas não específicas que expressam recetores de Fc (FcRs) (por exemplo, células *natural killer* (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem anticorpo ligado numa célula alvo e subsequentemente provocam a lise da célula alvo. As células primárias para mediar ADCC, células NK, expressam somente FcγRIII, enquanto os monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR em células hematopoiéticas encontra-se resumida no Quadro 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para avaliar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, um ensaio de ADCC *in vitro*, pode ser realizado como o descrito no documento de patente U.S. N.º 5.500.362 ou 5.821.337. As células efetoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células *Natural Killer* (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, num modelo animal tal como o divulgado em Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

μCélulas efetoras humanas são leucócitos que expressam um ou mais FcRs e realizam funções efetoras. Preferentemente, as células expressam pelo menos FcγRIII e realizam a função efetora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que medeiam ADCC incluem células mononucleares do

sangue periférico (PBMC), células natural killer (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; com PBMCs e células NK sendo preferidas. As células efectoras podem ser isoladas a partir de uma fonte nativa das mesmas, por exemplo, a partir do sangue ou PBMCs como descrito no presente documento.

Os termos μ recetor de Fc μ e μ FcR μ são utilizados para descrever um recetor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR preferido é um que se liga a um anticorpo IgG (um recetor gama) e incluir recetores das subclasses Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII, incluindo variantes alélicas e formas alternativamente submetidas a *splicing* destes recetores. Os recetores Fc γ RII incluem Fc γ RIIA (um μ recetor de ativação) e Fc γ RIIB (um μ recetor de inibição), que têm sequências de aminoácidos semelhantes que diferem primariamente nos domínios citoplasmáticos dos mesmos. O recetor de ativação Fc γ RIIA contém um motivo de ativação do imunorrecetor baseado em tirosina (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O recetor de ativação Fc γ RIIB contém um motivo de inibição do imunorrecetor baseado em tirosina (ITIM) no seu domínio citoplasmático (revisto em Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Os FcRs 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 FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são englobados pelo termo μ FcR μ no presente documento. O termo também inclui o recetor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternas para o feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976); e Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)).

μ Citotoxicidade dependente do complemento ou μ CDC μ referem-se à lise de um alvo na presença de complemento. A via de ativação do complemento é iniciada pela ligação do

primeiro componente do sistema complemento (C1q) a uma molécula (por exemplo, um anticorpo) complexado com um antígeno cognato. Para avaliar a ativação do complemento, um ensaio de CDC, por exemplo, como descrito em Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996), pode ser realizado.

Um anticorpo de afinidade maturada é um com uma ou mais alterações numa ou mais CDRs do mesmo, que resultam numa melhoria na afinidade do anticorpo para o antígeno, em comparação com um anticorpo parental que não possui aquela(s) alteração(ões). Os anticorpos de afinidade maturada preferidos terão afinidades nanomolares ou mesmo picomolares para o antígeno alvo. Os anticorpos de afinidade maturada são produzidos por procedimentos conhecidos na técnica. Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) descreve a maturação da afinidade por rearranjo dos domínios VH e VL. A mutagênese aleatória de uma CDR e/ou resíduos 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).

µPercentagem (ε) de identidade da sequência de aminoácidosµ é definida no presente documento como a percentagem de resíduos de aminoácidos numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos numa sequência selecionada, após alinhamento das sequências e introdução de intervalos, se necessário, para alcançar a máxima percentagem de identidade de sequência, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade da sequência. O alinhamento para propósitos de determinação da percentagem de identidade da sequência de aminoácidos pode ser alcançado de várias formas que estão dentro da experiência da técnica, por

exemplo, utilizando programas de computador disponíveis publicamente, como os programas BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 ou Megalign (DNASTAR). Os peritos na especialidade podem determinar parâmetros apropriados para medição do alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para alcançar o alinhamento máximo sob o comprimento total das sequências a serem comparadas. Para os propósitos do presente documento, contudo, são obtidos valores de ϵ de identidade de sequência de aminoácidos como é descrito posteriormente utilizando o programa informático de comparação de sequências ALIGN-2. O programa informático de comparação de sequências ALIGN-2 foi criado por Genentech, Inc., foi depositado com documentação de utilizador no U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, onde se encontra registado sob o N.º de Registo de Direitos de Autor U.S. TXU510087, e está publicamente disponível através de Genentech, Inc., South San Francisco, Califórnia. O programa ALIGN-2 deverá ser compilado para utilização num sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos os parâmetros de comparação de sequências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Para os propósitos do presente documento, a ϵ de identidade de sequência de aminoácidos de uma dada sequência de aminoácidos A a, com, ou frente a uma dada sequência de aminoácidos B (que pode alternativamente ser mencionado como dada sequência de aminoácidos A que tem ou compreende uma determinada ϵ de identidade de sequência de aminoácidos a, com, ou frente a uma dada sequência de aminoácidos B) é calculada conforme se segue:

$$100 \text{ vezes a fração } X/Y$$

onde X é o número de resíduos de aminoácidos pontuados como correspondências idênticas pelo programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 no alinhamento desse programa de A e B, e onde Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Será apreciado que quando o comprimento da sequência de

aminoácidos A não seja igual ao comprimento da sequência de aminoácidos B, a ϵ de identidade de sequência de aminoácidos de A com B não será igual à ϵ de identidade de sequência de aminoácidos de B com A.

Uma μ cadeia de polipéptidos μ é um polipéptido em que cada dos domínios do mesmo está unido a outro(s) domínio(s) por uma ou mais ligações peptídicas, em oposição a interações não covalentes ou ligações dissulfureto.

Um μ ligante flexível μ no presente documento refere-se a um péptido que compreende dois ou mais resíduos de aminoácidos unidos por uma ou mais ligações peptídicas, e proporciona maior liberdade rotacional a dois polipéptidos (como duas regiões Fd) ligadas desta forma. Tal liberdade rotacional permite que dois ou mais sítios de ligação a antigénio unidos pelo ligante flexível acedam ao(s) antigénio(s) alvo de forma mais eficaz. Exemplos de sequências peptídicas de ligante flexível incluem gly-ser, gly-ser-gly-ser (SEQ ID NO:10), ala-ser e gly-gly-gly-ser (SEQ ID NO:11). Preferentemente, o ligante flexível compreende 2 até cerca de 10 resíduos de aminoácidos, e mais preferentemente quatro ou menos resíduos.

Um μ domínio de dimerização μ é formado pela associação de pelo menos dois resíduos de aminoácidos (geralmente resíduos de cisteína) ou de pelo menos dois péptidos ou polipéptidos (que podem ter as mesmas, ou diferentes, sequências de aminoácidos). Os péptidos ou polipéptidos podem interagir uns com os outros através de uma ou mais associações covalentes e/ou não covalentes. Exemplos de domínios de dimerização no presente documento incluem uma região Fc; uma região de dobradiça; um domínio CH3; um domínio CH4; um par CH1-CL; uma μ interface μ com uma μ saliência μ e/ou μ protuberância μ como descrito no documento de patente U.S. N.º 5.821.333; um fecho de leucina (por exemplo, fecho de leucina jun/fos, veja-se Kostelney *et al.*, J. Immunol., 148: 1547-1553 (1992); ou um fecho de

leucina GCN4 de levedura); um fecho de isoleucina; um par dímero-recetor (por exemplo, recetor de interleucina-8 (IL-8R); e heterodímeros de integrina como LFA-1 e GPIIIb/IIIa), ou a uma ou mais regiões de dimerização dos mesmos; polipéptidos de ligandos diméricos (por exemplo, fator de crescimento nervoso (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), interleucina-8 (IL-8), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); veja-se Arakawa *et al.* J. Biol. Chem. 269(45): 27833-27839 (1994) e Radziejewski *et al.* Biochem. 32(48): 1350 (1993)), ou a uma ou mais regiões de dimerização dos mesmos; um par de resíduos de cisteína capazes de formar uma ligação dissulfureto; um par de péptidos ou polipéptidos, cada compreendendo pelo menos um resíduo de cisteína (por exemplo, desde cerca de um, dois ou três até cerca de dez resíduos de cisteína) de modo que a uma ou mais ligações dissulfureto podem formar-se entre os péptidos ou polipéptidos (doravante "uma dobradiça sintética"); e domínios variáveis de anticorpo. O domínio de dimerização mais preferido no presente documento é uma região Fc ou uma região de dobradiça.

"Resíduos de aminoácidos de ocorrência natural" (ou seja, resíduos de aminoácidos codificados pelo código genético) podem ser selecionados a partir do grupo que consiste em: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutâmico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptofano (Trp); tirosina (Tyr) e valina (Val). Um "resíduo de aminoácido não de ocorrência natural" refere-se a um resíduo, diferente daqueles resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente, listados acima, que é capaz de se ligar de forma covalente a um ou mais resíduos de aminoácidos adjacentes numa cadeia

polipeptídica. Exemplos de resíduos de aminoácidos não de ocorrência natural incluem norleucina, ornitina, norvalina, homoserina e outros análogos de resíduos de aminoácidos como aqueles descritos em Ellman *et al.* Meth. Enzym. 202:301-336 (1991). Para gerar tais resíduos de aminoácidos não de ocorrência natural, os procedimentos de Noren *et al.* Science 244:182 (1989) e Ellman *et al.*, *supra*, podem ser utilizados. Resumidamente, estes procedimentos envolvem ativar quimicamente um ARNt supressor com um resíduo de aminoácido não de ocorrência natural seguido por transcrição e tradução *in vitro* do ARN.

Um polipéptido "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que poderiam interferir com utilizações diagnósticas ou terapêuticas para o polipéptido, e podem incluir enzimas, hormonas, e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em formas de realização preferidas, o polipéptido será purificado (1) até mais do que 95 % em peso de polipéptido conforme determinado pelo método de Lowry, e mais preferentemente mais do que 99 % em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácidos interna ou N-terminal através da utilização de um sequenciador de copo rotatório, ou (3) até à homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras utilizando azul de Coomassie ou, preferentemente, coloração de prata. O polipéptido isolado inclui o polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes uma vez que, pelo menos, um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Vulgarmente, contudo, o polipéptido isolado será preparado por, pelo menos, uma etapa de purificação.

Um "sítio de ligação a antígeno funcional" de um anticorpo é um que é capaz de se ligar a um antígeno alvo.

A afinidade de ligação a antígeno do sítio de ligação a antígeno não é necessariamente tão forte como a do anticorpo parental a partir do qual o sítio de ligação a antígeno é derivado, mas a capacidade de se ligar ao antígeno deve ser medida utilizando qualquer de uma variedade de métodos conhecidos para a avaliação da ligação de um anticorpo a um antígeno. Além disso, a afinidade de ligação a antígeno de cada um dos sítios de ligação a antígeno de um anticorpo multivalente no presente documento não tem de ser quantitativamente a mesma. Para os anticorpos multiméricos do presente documento, o número de sítios de ligação a antígeno funcionais podem ser avaliados utilizando análise por ultracentrifugação como descrito no Exemplo 2 abaixo. De acordo com este método de análise, diferentes razões de antígeno alvo para anticorpo multimérico são combinadas e a massa molecular média dos complexos é calculada assumindo números diferentes de sítios de ligação funcionais. Estes valores teóricos são comparados com os valores experimentais reais obtidos de modo a avaliar o número de sítios de ligação a antígeno funcionais.

Por ativação de um recetor por ligando entende-se a transdução de sinal (por exemplo, para uma tirosina quinase recetora, provocada por um domínio de quinase intracelular de uma tirosina quinase recetora que fosforila resíduos de tirosina no recetor ou um polipéptido substrato) mediada por ligação de ligando ao recetor (ou a um complexo recetor que compreende o recetor de interesse). No caso de um recetor ErbB, geralmente, isto envolverá a ligação de um ligando de ErbB a um hetero-oligómero de ErbB que ativa um domínio de quinase de um ou mais dos recetores ErbB no hetero-oligómero e resulta, desta forma, na fosforilação de resíduos de tirosina num ou mais dos recetores ErbB e/ou fosforilação de resíduos de tirosina num ou mais polipéptidos substrato adicionais.

Um anticorpo que μ bloqueia a ativação de um recetor por um ligando é um que reduz ou previne tal ativação como definido acima no presente documento. Tal bloqueio pode ocorrer por qualquer meio, por exemplo, interferindo com: a ligação do ligando ao recetor, a formação de complexos recetores, a atividade de tirosina quinase de uma tirosina quinase recetora num complexo recetor e/ou a fosforilação de um ou mais resíduos de tirosina quinase no, ou pelo recetor. Exemplos de anticorpos que bloqueiam a ativação de um recetor ErbB por um ligando incluem os anticorpos monoclonais 2C4 e 7F3 (que bloqueiam a ativação de HRG de hetero-oligómeros de HER2/HER3 e HER2/HER4; e a ativação de EGF, TGF-beta ou anfirregulina de um hetero-oligómero de EGFR/HER2); e os anticorpos L26, L96 e L288 (Klapper *et al.* Oncogene 14:2099-2109 (1997)), que bloqueiam a ligação de EGF e NDF a células T47D que expressam EGFR, HER2, HER3 e HER4.

Um anticorpo que tem uma μ característica biológica é um anticorpo designado é um que possui uma ou mais das características biológicas desse anticorpo que o distinguem de outros anticorpos que se ligam ao mesmo antigénio.

Um μ agente de inibição do crescimento quando utilizado no presente documento refere-se a um composto ou composição que inibe o crescimento de uma célula *in vitro* e/ou *in vivo*. Assim, o agente de inibição do crescimento pode ser um que reduza significativamente a percentagem de células em fase S. Exemplos de agentes de inibição do crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (num local diferente da fase S), como agentes que induzem a interrupção de G1 e a interrupção da fase M. Bloqueadores clássicos da fase M incluem as vincas (vincristina e vinblastina), TAXOL®, inibidores de topo II como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido e bleomicina. Aqueles agentes que interrompem G1 também atuarão sobre a interrupção da fase S, por exemplo, agentes

de alquilação de ADN como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo, e ara-C. Informações adicionais podem ser encontradas em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., capítulo 1, intitulado *Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs* por Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13.

Exemplos de anticorpos anti-HER2 inibidores do crescimento são aqueles que se ligam a HER2 e inibem o crescimento de células cancerosas que superexpressam HER2. Anticorpos anti-HER2 inibidores do crescimento preferidos inibem o crescimento de células tumorais de mama SKBR3 em cultura em mais de 20 μ M, e preferentemente superior a 50 μ M (por exemplo, desde cerca de 50 μ M até cerca de 100 μ M) a uma concentração de anticorpo de cerca de 0,5 a 30 μ g/mL, onde o inibidor de crescimento é determinado seis dias depois da exposição das células SKBR2 ao anticorpo (veja-se o documento de patente U.S. N.º 5.677.171 emitido a 14 de outubro de 1997).

Um anticorpo que induz a morte celular é um que faz com que uma célula viável se torne não viável. A célula é geralmente uma que expressa o antígeno ao qual o anticorpo se liga, especialmente quando a célula superexpressa o antígeno. Preferentemente, a célula é uma célula cancerosa, por exemplo, uma célula de mama, ovário, estômago, endométrio, glândulas salivares, pulmão, rim, cólon, tireoide, pancreática ou de bexiga. *In vitro*, a célula pode ser uma célula SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 ou SKOV3. A morte celular *in vitro* pode ser determinada na ausência de complemento e células imunitárias efectoras para distinguir a morte celular induzida por citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Assim, o ensaio para a morte celular

pode ser realizado utilizando soro inativado por calor (ou seja, na ausência de complemento) e na ausência de células imunitárias efectoras. Para determinar se o anticorpo é capaz de induzir a morte celular, a perda da integridade da membrana como avaliada pela absorção de iodeto de propídio (PI), azul de tripano (veja-se, Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 (1995)) ou 7AAD pode ser avaliada em relação a células não tratadas.

Um anticorpo que induz a apoptose é um que induz a morte celular programada como determinado pela ligação de anexina V, fragmentação de ADN, retração celular, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular, e/ou formação de vesículas de membrana (chamadas corpos apoptóticos). A célula é uma que expressa o antígeno ao qual o anticorpo se liga e pode ser uma que superexpressa o antígeno. A célula pode ser uma célula tumoral, por exemplo, uma célula de mama, ovário, estômago, endométrio, glândulas salivares, pulmão, rim, cólon, tireoide, pancreática ou de bexiga. *In vitro*, a célula pode ser uma célula SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 ou SKOV3. Estão disponíveis vários métodos para avaliar os eventos celulares associados com a apoptose. Por exemplo, a translocação de fosfatidil serina (PS) pode ser medida através da ligação de anexina; a fragmentação de ADN pode ser avaliada através do escalonamento de ADN como divulgado no exemplo do presente documento; e a condensação nuclear/da cromatina em conjunto com a fragmentação do ADN pode ser avaliada através do aumento de quaisquer células hipodiploides. Preferentemente, o anticorpo que induz a apoptose é um que resulta em cerca de 2 a 50 vezes, preferentemente cerca de 5 a 50 vezes e mais preferentemente cerca de 10 a 50 vezes, a indução da ligação de anexina em relação a uma célula não tratada num ensaio de ligação a anexina utilizando células que expressam o antígeno ao qual o anticorpo se liga.

Exemplos de anticorpos que induzem a apoptose incluem os anticorpos monoclonais anti-HER2 7F3 (ATCC HB- 12216), e 7C2 (ATCC HB 12215), incluindo variantes de afinidade maturada e/ou humanizadas dos mesmos; os anticorpos anti-DR5 3F11.39.7 (ATCC HB-12456); 3H3.14.5 (ATCC HB-12534); 3D5.1.10 (ATCC HB-12536) e 3H3.14.5 (ATCC HB - 12534), incluindo variantes de afinidade maturada e/ou humanizadas dos mesmos; os anticorpos anti-recetor de DR5 humano 16E2 e 20E6, incluindo variantes de afinidade maturada e/ou humanizadas dos mesmos (documento W098/51793); os anticorpos anti-DR4 4E7.24.3 (ATCC HB- 12454); 4H6.17.8 (ATCC HB-12455); 1H5.25.9 (ATCC HB-12695); 4G7.18.8 (ATCC PTA-99 e 5G11.17.1 (ATCC HB-12694), incluindo variantes de afinidade maturada e/ou humanizadas dos mesmos.

De modo a rastrear para anticorpos que se ligam a um epítipo num antigénio ligado por um anticorpo de interesse, um ensaio de bloqueio cruzado de rotina tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988), pode ser realizado.

Um anticorpo agonista é um anticorpo que se liga a, ou ativa, um recetor. Geralmente, a capacidade de ativação dos recetores do anticorpo agonista será pelo menos quantitativamente semelhante (e pode ser essencialmente quantitativamente semelhante) a um ligando agonista nativo do recetor. Um exemplo de um anticorpo agonista é um que se liga a um recetor na superfamília de recetores de TNF e induz a apoptose de células que expressam o recetor de TNF. Ensaio para determinar a indução da apoptose são descritos nos documentos W098/51793 e W099/37684.

Um distúrbio é qualquer condição que beneficiaria do tratamento com o anticorpo. Isto inclui distúrbios ou doenças crónicas e agudos incluindo aquelas condições patológicas que predispoem o mamífero ao distúrbio em questão. Exemplos não limitantes de distúrbios a serem

tratados no presente documento incluem tumores malignos e benignos; leucemias e neoplasias malignas linfoides; distúrbios neuronais, gliais, astrocíticos, hipotalâmicos e outros distúrbios glandulares, macrofágicos, epiteliais, estromais e blastocíticos; e distúrbios inflamatórios, angiogénicos e imunológicos.

O termo μ quantidade terapêuticamente eficaz refere-se a uma quantidade de um fármaco eficaz para tratar uma doença ou distúrbio num mamífero. No caso do cancro, a quantidade terapêuticamente eficaz do fármaco pode reduzir o número de células cancerosas; reduzir o tamanho do tumor; inibir (isto é, desacelerar em algum grau e preferentemente deter) a infiltração de células cancerosas em órgãos periféricos; inibir (ou seja, desacelerar em algum grau e preferentemente deter) as metástases tumorais; inibir, em algum grau, o crescimento tumoral; e/ou aliviar em certa medida um ou mais dos sintomas associados ao distúrbio. Na medida em que o fármaco pode prevenir o crescimento e/ou destruir as células cancerosas existentes, pode ser citostático e/ou citotóxico. Para a terapêutica do cancro, a eficácia *in vivo* pode, por exemplo, ser medida avaliando o tempo até à progressão da doença (TTP) e/ou determinar as taxas de resposta (RR).

μ Tratamento refere-se tanto ao tratamento terapêutico e profilático ou a medidas preventivas. Aqueles em necessidade de tratamento incluem aqueles já com o distúrbio bem como aqueles nos quais o distúrbio deve ser prevenido.

Os termos μ cancro e μ canceroso referem-se ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada pelo crescimento celular não regulado. Exemplos de cancros incluem mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais particulares de tais cancros incluem cancro de células escamosas, cancro pulmonar de

células pequenas, cancro pulmonar de células não pequenas, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de células pequenas do pulmão, cancro do peritoneu, cancro hepatocelular, cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro do colo do útero, cancro ovárico, cancro do fígado, cancro da bexiga, hepatoma, cancro da mama, cancro de cólon, cancro colorretal, carcinoma do endométrio ou do útero, carcinoma das glândulas salivares, cancro renal, cancro do fígado, cancro de próstata, cancro da vulva, cancro da tireoide, carcinoma hepático e vários tipos de cancro da cabeça e pescoço.

Uma "doença autoimune" no presente documento é uma doença ou distúrbio não maligno que surge e está dirigido contra os próprios tecidos do indivíduo. Exemplo de distúrbios ou doenças autoimunes incluem, mas não são limitados a, respostas inflamatórias tais como doenças inflamatórias da pele incluindo psoríase e dermatite (por exemplo, dermatite atópica); esclerodermia sistémica e esclerose; respostas associadas à doença intestinal inflamatória (tal como doença de Crohn e colite ulcerativa); síndrome do desconforto respiratório (incluindo síndrome do desconforto respiratório em adultos; SDRA); dermatite; meningite; encefalite; uveíte; colite; glomerulonefrite; condições alérgicas tais como eczema e asma e outras condições patológicas envolvendo infiltração de células T e respostas inflamatórias crónicas; aterosclerose; deficiência de adesão de leucócitos; artrite reumatoide; lúpus eritematoso sistémico (LES); diabetes mellitus (por exemplo, diabetes mellitus do tipo I ou diabetes mellitus dependente de insulina); esclerose múltipla; síndrome de Reynaud; tiroidite autoimune; encefalomielite alérgica; síndrome de Sjogren; diabetes de aparição juvenil; e respostas imunes associadas com hipersensibilidade aguda e retardada mediada por citocinas e linfócitos T tipicamente encontrados em tuberculose,

sarcoidose, polimiosite, granulomatose e vasculite; anemia perniciosa (doença de Addison); doenças que envolvem a diapedese leucocitária; distúrbio inflamatório do sistema nervoso central (SNC); síndrome de lesão de múltiplos órgãos; anemia hemolítica (incluindo, mas não limitada a crioglobulinemia ou anemia positiva de Coombs); miastenia gravis; doenças mediadas por complexos antígeno-anticorpo; doença de membrana basal anti-glomerular; síndrome antifosfolipídica; neurite alérgica; doença de Graves; síndrome miastênica de Lambert-Eaton; penfigoide bulhoso; pênfigo; poliendocrinopatias autoimunes; doença de Reiter; síndrome da pessoa rígida; doença de Behcet; arterite de células gigantes; nefrite por complexos imunes; nefropatia por IgA; polineuropatias por IgM; púrpura trombocitopênica imune (ITP) ou trombocitopenia autoimune, etc.

Por antígeno exógeno entende-se uma molécula ou moléculas que não é/são endógenas ou nativas de um mamífero que é exposto a elas. O antígeno exógeno pode desencadear uma resposta imunitária, por exemplo, uma resposta mediada por células T e/ou humoral no mamífero. Geralmente, o antígeno exógeno provocará a produção de anticorpos contra ele. Exemplos de antígenos exógenos contemplados no presente documento incluem agentes terapêuticos imunogênicos, por exemplo, proteínas como anticorpos, particularmente anticorpos que compreendem resíduos de aminoácidos não humanos (por exemplo, anticorpos de roedor, quiméricos/humanizados e anticorpos primatizados); toxinas (opcionalmente conjugadas com uma molécula de direcionamento como um anticorpo, em que a molécula de direcionamento também pode ser imunogênica); vetores virais de terapêutica gênica, como retrovírus e adenovírus; enxertos; agentes infecciosos (por exemplo, bactérias e vírus); aloantígenos (ou seja, um antígeno que ocorre em alguns, mas não todos os membros da mesma espécie) como diferenças nos tipos sanguíneos, antígenos linfocitários

humanos (HLA), antígenos de plaquetas, antígenos expressos em órgãos transplantados, componentes sanguíneos, fatores de gravidez (Rh) e hemofílicos (por exemplo, Fator VIII e Fator IX).

Por bloquear uma resposta imunitária contra um antígeno exógeno entende-se reduzir ou prevenir pelo menos uma resposta imunomediada que resulta da exposição a um antígeno exógeno. Por exemplo, é possível diminuir a resposta humoral contra o antígeno exógeno, ou seja, prevenindo ou reduzindo a produção dos anticorpos dirigidos contra o antígeno no mamífero. Alternativamente, ou adicionalmente, é possível suprimir o idiótipo; pacificar a remoção de células revestidas com aloanticorpo; e/ou afetar a apresentação do aloantígeno através do esgotamento de células apresentadoras de antígeno.

O termo enxerto conforme é utilizada no presente documento refere-se a materiais biológicos derivados de um dador para transplante num recipiente. Os enxertos incluem tais materiais diversos como, por exemplo, células isoladas tais como células de ilhota; tecido tal como membrana amniótica de um recém-nascido, medula óssea, células precursoras hematopoiéticas, e tecido ocular, tal como tecido da córnea; e órgãos tais como a pele, coração, fígado, baço, pâncreas, lóbulo tireoide, pulmão, rim, órgãos tubulares (por exemplo, intestino, vasos sanguíneos, ou esôfago), etc. Os órgãos tubulares podem ser utilizados para substituir porções danificadas do esôfago, vasos sanguíneos, ou duto biliar. Os enxertos de pele podem ser utilizados não só para queimaduras, mas também como um penso para intestino danificado ou para fechar certos defeitos como a hérnia diafragmática. O enxerto é derivado de qualquer fonte de mamífero, incluindo de ser humano, quer de cadáveres ou dadores vivos. Preferentemente o enxerto é medula óssea ou um órgão tal como o coração e o dador do enxerto e o hospedeiro são correspondentes para

antigénios HLA de classe II.

O termo *μhospedeiro mamífero* como utilizado no presente documento refere-se a qualquer recipiente de transplante compatível. Por *μcompatível* entende-se um hospedeiro mamífero que aceitará o enxerto doado. Preferentemente, o hospedeiro é humano. Se ambos o dados do enxerto e o hospedeiro são humanos, estes são preferentemente correspondentes quanto aos antigénios de HLA de classe II de modo a melhorar a histocompatibilidade.

O termo *μdador* como utilizado no presente documento refere-se às espécies mamíferas, mortas ou vivas, a partir das quais o enxerto é derivado. Preferentemente, o dador é humano. Os dadores humanos são preferentemente dadores voluntários com grupo sanguíneo relacionado que no exame físico são considerados normais e do mesmo grupo sanguíneo ABO principal, uma vez que cruzar barreiras de grupos sanguíneos principais possivelmente prejudica a sobrevivência do aloenxerto. É, contudo, possível transplantar, por exemplo, um rim de um dador do tipo O num recetor do tipo A, B ou AB.

O termo *μtransplante* e variações dos mesmos referem-se à inserção de um enxerto num hospedeiro, quer o transplante seja sinérgico (onde o dador e o recetor são geneticamente idênticos), alogeneico (onde o dador e recetor são de origens genéticas diferentes mas da mesma espécie), ou xenogeneico (onde o dador e recetor são de diferentes espécies). Assim, num cenário típico, o hospedeiro é humano e o enxerto é um isoenxerto, derivado a partir de um ser humano da mesma ou diferente origem genética. Noutro cenário, o enxerto é derivado a partir de uma espécie diferente daquela na qual é transplantado, como um coração de babuíno transplantado num hospedeiro recetor humano, e incluindo animais de espécies amplamente separadas desde o ponto de vista filogenético, por exemplo, uma válvula cardíaca de porco, ou células de ilhotas beta

animais ou células neuronais transplantadas num hospedeiro humano.

A expressão *dessensibilizar* um mamífero a aguardar transplante refere-se a reduzir ou abolir a sensibilidade ou reatividade alérgica a um transplante, antes da administração do transplante ao mamífero. Isto pode ser alcançado por qualquer mecanismo, como uma redução nos anticorpos antídoto no mamífero dessensibilizado, por exemplo, onde tais anticorpos antídoto são direcionados contra antígenos linfocitários humanos (HLA).

O termo *agente citotóxico* como aqui utilizado refere-se a uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou provoca a destruição de células. O termo destina-se a incluir isótopos radioativos (por exemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterapêuticos, e toxinas como toxinas de molécula pequena ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes dos mesmos.

Um *agente quimioterapêutico* é um composto químico útil no tratamento de cancro. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes como tiotepa e ciclofosfamida (CYTOXANTM); alquil sulfonatos como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosfaoramida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo a sua adozelesina, análogos sintéticos de carzelesina e bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CBI-TMI); eleuterobina;

pancratistatina; uma sarcodictiína; espongistatina; mostardas de azoto tais como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracilo; nitrosoureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como os antibióticos de enediína (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina γ_1^1 e caliqueamicina, θ_1^1 , veja-se, *por exemplo*, Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); dinemicina, incluindo dinemicina A; uma esperamicina; bem como cromóforo neocarzinostatina e cromóforos de antibiótico de cromoproteína enediína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos como metotrexato e 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fluradabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; androgénios como calusterona, propionato de dromostalonona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositor de ácido

fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; uma epotilona; etoglúcido; nitrato de gálio; hidroxiureia; lentinano; lonidamina; maitansinoides como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermânio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2, 2',2 μ -triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (μ Ara-C μ); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por exemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) e doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França); clorambucilo; gencitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor da topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer dos citados acima. Também são incluídos nesta definição agentes anti-hormonais que atuam para regular ou inibir a ação de hormonas sobre tumores tais como anti-estrogénios incluindo por exemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazóis inibidores da aromatase, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona e toremifeno (Fareston); e antiandrogénios tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelina; e sais, ácidos ou

derivados farmacêuticamente aceitáveis de qualquer dos citados acima.

O termo *citocina* é um termo genérico para proteínas libertadas por uma população celular que atuam sobre outra célula como mediadores intracelulares. Exemplos de tais citocinas são linfocinas, monocinas e hormonas polipépticas tradicionais. Incluídas entre as citocinas estão hormonas de crescimento tais como hormona de crescimento humana, N-metionil-hormona de crescimento humana e hormona do crescimento bovina; hormona da paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteicas tais como a hormona folículo-estimulante (FSH), hormona estimulante da tiroide (TSH) e hormona luteinizante (LH); fator de crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblastos; prolactina; lactogénio placentário; fator de necrose tumoral alfa e beta; substância inibidora mulleriana; péptido associado a gonadotropina de ratinho; inibina; ativina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento nervoso tal como NGF-alfa; fator de crescimento de plaquetas; fatores de crescimento transformante (TGFs) tais como TGF-alfa e TGF-beta; fator de crescimento I e II semelhante a insulina; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferões tais como interferão-alfa, beta e gama, fatores de estimulação de colónias (CSFs) como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulócitos macrófagos (GM-CSF) e CSF de granulócitos (G-CSF); interleucinas (ILs) como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; um fator de necrose tumoral como TNF-alfa ou TNF-beta; e outros fatores polipeptídicos incluindo LIF e ligando kit (KL). Como utilizado no presente documento, o termo *citocina* inclui proteínas a partir de fontes naturais ou a partir de culturas celulares recombinantes e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa.

O termo *profármaco* como utilizado neste pedido refere-se a uma forma de precursor ou derivado de uma substância farmacologicamente ativa que é menos citotóxica para as células tumorais em comparação com o fármaco parental e é capaz de ser enzimaticamente ativada ou convertida na forma parental mais ativa. Veja-se, por exemplo, Wilman, *Prodrugs in Cancer Chemotherapy*, Biochemical Society Transactions, 14, pp. 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.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Os profármacos desta invenção incluem, mas não estão limitados a, profármacos que contêm fosfato, profármacos que contêm tiofosfato, profármacos que contêm sulfato, profármacos que contêm peptídeos, profármacos modificados com D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contêm beta-lactama, profármacos contendo fenoxiacetamina opcionalmente substituídos ou profármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituídos, profármacos de 5-fluorocitosina e outros de 5-fluorouridina que podem ser convertidos no fármaco livre citotóxico mais ativo. Os exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivados numa forma de profármaco para utilização nesta invenção incluem, mas não estão limitados a, aqueles agentes quimioterapêuticos descritos acima.

Um *fator angiogênico* é um fator de crescimento que estimula o desenvolvimento de vasos sanguíneos. O fator angiogênico preferido no presente documento é o Fator de Crescimento Endotelial vascular (VEGF).

A palavra *marcador* quando utilizada no presente documento refere-se a um composto ou composição detectável que é conjugada direta ou indiretamente com o polipeptídeo. O marcador pode ser ele próprio detectável (por exemplo, marcadores de radioisótopos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, podem catalisar a

alteração química de um composto ou composição de substrato que é detetável.

Uma molécula de ácido nucleico isolada é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada a partir 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 é outra que não na forma ou configuração na qual é encontrada na natureza. Moléculas de ácido nucleico isoladas distinguem-se portanto da molécula de ácido nucleico tal como existe em células naturais. Contudo, 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 cromossômica, diferente daquela das células naturais.

A expressão *sequências de controlo* refere-se a sequências de ADN necessárias para a expressão de uma sequência de codificação operativamente ligada num organismo hospedeiro particular. As sequências de controlo que são adequadas para procarióticas, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência operadora, e um sítio de ligação a ribossomas. As células eucarióticas são conhecidas por utilizar promotores, sinais de poliadenilação e potenciadores.

Um ácido nucleico está *operativamente ligado* quando é colocado numa relação funcional com outra sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, o ADN para uma pré-sequência ou líder de secreção está operativamente ligado ao ADN para um polipéptido se for expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou potenciador está operativamente ligado a uma sequência codificadora se afeta a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação a ribossomas está operativamente ligado a uma sequência de codificação se está posicionado de forma a

facilitar a tradução. Geralmente, μ operativamente ligado μ significa que as sequências de ADN a serem ligadas são contíguas, e, no caso de um líder de secreção, contíguas e na fase de leitura. Contudo, os potenciadores não têm de ser contíguos. A ligação é alcançada através da ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existirem, os adaptadores ou ligantes de oligonucleótidos sintéticos são utilizados de acordo com a prática convencional.

Como utilizado no presente documento, as expressões μ célula μ , μ linha celular μ e μ cultura celular μ são utilizadas indistintamente e todas tais designações incluem a descendência. Assim, as palavras μ transformantes μ e μ células transformadas μ incluem a célula em causa primária e culturas derivadas da mesma sem ter em conta o número de transferências. Também se entende que toda a descendência pode não ser precisamente idêntica quanto ao conteúdo de ADN, devido a mutações deliberadas ou inadvertidas. A descendência mutante que tem a mesma função ou atividade biológica conforme rastreada na célula originalmente transformada está incluída. Quando se pretendam designações distintas, tal será evidente a partir do contexto.

II. Modos para levar a cabo a invenção

A. Anticorpos multivalentes

A invenção do presente documento refere-se a um método para fabricar um anticorpo multivalente. Várias técnicas para gerar o anticorpo μ parental μ ou μ de partida μ a partir do qual o um ou vários domínio variáveis do anticorpo multivalente podem ser derivados serão descritos posteriormente no presente pedido.

O anticorpo multivalente de particular interesse no presente documento é um que compreende quatro ou mais sítios de ligação a antigénio. Geralmente, todos os sítios de ligação a antigénio são μ funcionais μ como definido acima no presente documento. Preferentemente, o anticorpo

multivalente não existe na natureza e não é um anticorpo IgM ou IgA de sequência nativa. O anticorpo multivalente do presente documento é preferentemente não produzido *in vitro* por reticulação química de um par de anticorpos (por exemplo, como em Ghetie *et al.* (1997), *supra* ou Wolff *et al.* (1993), *supra*). O presente pedido também proporciona anticorpos multivalentes que não requerem um ou mais resíduos de cisteína introduzidos num anticorpo parental de modo a produzir o anticorpo multivalente através de uma ou mais pontes dissulfureto entre um par de regiões Fc (por exemplo, como em Shopes *et al.* (1992), *supra* ou Caron *et al.* (1992), *supra*).

A primeira cadeia polipeptídica compreende dois domínios variáveis de cadeia pesada e a segunda cadeia polipeptídica também compreende dois domínios variáveis de cadeia pesada, que podem ser combinados com domínios variáveis de cadeia leve correspondentes (pelo menos dois por cada cadeia polipeptídica) para gerar quatro ou mais sítios de ligação a antígeno.

O anticorpo multivalente compreende uma região Fc (por exemplo, uma sequência nativa ou região Fc variante). A região Fc é preferentemente "funcional" como definido acima no presente documento e, portanto, é capaz de realizar uma ou mais funções efetoras de anticorpo, como ADCC ou CDC. Preferentemente, o anticorpo multivalente tem apenas uma região Fc.

Os quatro ou mais sítios de ligação a antígeno são proporcionados no sentido do terminal amino em relação à região Fc (em vez de no terminal carboxi da região Fc como em Coloma e Morrison, (1997) *supra*). Isto pode ser alcançado proporcionando uma primeira cadeia polipeptídica representada pela fórmula VD1-X1-VD2-X2-Fc, em que (1) VD1 é um primeiro domínio variável de cadeia pesada ou leve (preferentemente um domínio variável de cadeia pesada), (2) VD2 é um segundo domínio variável de cadeia pesada ou leve

(preferentemente um domínio variável de cadeia pesada), (3) Fc compreende uma cadeia de uma região Fc e (4) X1 e X2 representam um aminoácido ou polipéptido interveniente opcional. O ligante flexível pode compreender um péptido como gly-ser, gly-ser-gly-ser (SEQ ID NO:10), ala-ser ou gly-gly-gly-ser (SEQ ID NO:11).

O anticorpo multivalente compreende quatro ou mais polipéptidos Fab, cada um capaz de se ligar a antígenos. Os fragmentos Fab são proporcionados na direção amino terminal em relação à região Fc (onde o anticorpo multivalente tem uma região Fc). Por exemplo, dois ou mais fragmentos Fd podem ser fusionados com o terminal amino de uma cadeia de uma região Fc. A cadeia polipeptídica assim manipulada pode ser combinada com (1) outra cadeia polipeptídica formada por dois ou mais fragmentos Fd fusionados com o terminal amino da outra cadeia da região Fc, bem como (2) domínios VL complementares (por exemplo, quatro ou mais domínios VL cada um dos quais, opcionalmente, está fusionado a um domínio CL). Opcionalmente, o anticorpo compreende um ligante flexível entre os dois ou mais fragmentos Fd.

Os quatro ou mais sítios de ligação a antígeno funcionais do anticorpo multivalente no presente documento são cada, preferentemente, formados por um domínio variável de cadeia pesada e leve. Assim, quando dois ou mais domínios variáveis de cadeia pesada estão fusionados (opcionalmente com um ou mais resíduos de aminoácidos intervenientes como indicado acima), dois ou mais polipéptidos contendo domínios variáveis de cadeia leve complementares são combinados com os domínios variáveis de cadeia pesada (por exemplo, através da coexpressão da proteína de fusão e do um ou mais polipéptidos de domínio variável de cadeia leve na mesma células hospedeira). O anticorpo compreende quatro, ou cinco, ou mais (por exemplo, até cerca de 8) polipéptidos de domínio variável

de cadeia leve, cada um dos quais, opcionalmente, compreendem um domínio CL.

Numa forma de realização do presente documento, o anticorpo com quatro ou mais sítios de ligação a antígeno pode compreender uma cadeia polipeptídica que compreende quatro ou mais domínios variáveis de cadeia pesada ou leve, em que cada dos domínios variáveis está combinado com, ou associado com, quatro ou mais polipéptidos de domínio variável de cadeia leve ou cadeia pesada de tal modo para formar os sítios de ligação a antígeno. Assim, quando a cadeia polipeptídica compreende quatro ou mais domínios variáveis de cadeia pesada, está combinada com, ou associada com quatro ou mais polipéptidos de domínio variável de cadeia leve (por exemplo, com polipéptidos VL-CL). Alternativamente, quando a cadeia polipeptídica compreende quatro ou mais domínios variáveis de cadeia leve, está combinada com, ou associada com quatro ou mais polipéptidos de domínio variável de cadeia pesada (por exemplo, com polipéptidos VH-CH1). Preferentemente cada dos quatro ou mais sítios de ligação a antígeno está direcionado contra o mesmo antígeno. Exemplos de antígenos ligados por tais anticorpos incluem (1) um recetor na superfamília de recetores de Tumor de Necrose Tumoral (TNF) como DR4 e DR5; (2) um antígeno de superfície de células B como CD20; (3) um recetor ErbB exemplificado pelo recetor HER2 ou (4) uma proteína de superfície celular expressa pelas células tumorais. Por exemplo, a cadeia polipeptídica pode compreender quatro domínios variáveis de cadeia pesada que são capazes de se combinar com quatro polipéptidos de domínio variável de cadeia leve (preferentemente polipéptidos VL-CL) para gerar quatro sítios de ligação a antígeno direcionados contra o mesmo antígeno. Tais anticorpos são exemplificados pelos ilustrados na Fig. 23D (com quatro sítios de ligação a antígeno) e Fig. 23E (com quatro sítios de ligação a

antigénio).

Os anticorpos multivalentes do presente documento têm propriedades desejáveis particularmente para terapêutica e diagnóstico *in vivo*. Por exemplo, o anticorpo multivalente pode ser internalizado e catabolizado por uma célula que expressa um antigénio, ao qual o anticorpo se liga, mais rapidamente do que um anticorpo bivalente. Assim, a invenção proporciona um imunoconjugado que compreende o anticorpo multivalente conjugado com um agente citotóxico (por exemplo, um que é ativo na morte das células uma vez internalizado). Vários agentes citotóxicos para gerar um imunoconjugado são descritos no presente documento, mas o agente citotóxico preferido é um isótopo radioativo, um maitansinoide ou uma caliqueamicina.

O anticorpo multivalente, e/ou um anticorpo parental a partir do qual pelo menos uma das especificidades de ligação a antigénio do anticorpo multivalente é derivada, podem ter determinadas propriedades. Por exemplo, o anticorpo multivalente e/ou o anticorpo parental pode (1) ser um anticorpo agonista (por exemplo, onde um antigénio ligado pelo anticorpo é um recetor na família de recetores de TNF ou um antigénio de superfície de células B); (2) induzir a apoptose (por exemplo, onde um antigénio ligado pelo anticorpo é um recetor ErbB ou um recetor na superfamília de recetores de TNF); (3) ligar uma proteína da superfície celular (como um antigénio de superfície de células B ou um recetor ErbB) expressa nas células tumorais; (4) ligar uma proteína de superfície celular (por exemplo, Recetor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), recetor HER2, recetor ErbB3, recetor ErbB4, ou recetor Dcr3) superexpresso pelas células tumorais; e/ou (5) ser um anticorpo inibidor do crescimento.

O anticorpo multivalente do presente documento pode ter especificidade para apenas um antigénio, ou mais do que um antigénio (por exemplo, desde dois até cerca de três

antigénios). Numa forma de realização, os três ou mais sítios de ligação a antigénio funcionais do anticorpo multivalente podem todos ligar-se ao mesmo antigénio (preferentemente ao epítipo sobre aquele antigénio, em cujo caso o anticorpo multivalente poderia ser considerado como sendo "monoespecífico"). Este pedido também proporciona anticorpos "multiespecíficos". Assim, os três ou mais sítios de ligação a antigénio funcionais podem ligar-se a dois ou mais (por exemplo, desde dois até cerca de três) antigénios ou epítopos diferentes.

O presente pedido mostra que um anticorpo multivalente direcionado contra um antigénio recetor pode ser manipulado, o qual, surpreendentemente, tem capacidade agonística e/ou de indução da apoptose que é quantitativamente semelhante à do ligando nativo. Por "quantitativamente semelhante" aqui entende-se que o anticorpo multivalente tem uma atividade num ensaio que determina a atividade agonística e/ou de indução da apoptose, dentro de cerca de dez vezes, e preferentemente dentro de cerca de cinco vezes da atividade agonística e/ou de indução da apoptose do ligando nativo. Nesta forma de realização, o anticorpo com atividade agonística e/ou de indução da apoptose pode ser um com especificidade para um recetor na superfamília de recetores de TNF, por exemplo, um recetor Apo2L, como DR4, DR5, DcR1 e DcR2 (preferentemente DR4 ou DR5), em cujo caso a atividade do anticorpo num ensaio de apoptose como aqueles descritos no Exemplo 3 abaixo está dentro de cerca de dez vezes, por exemplo, dentro de cerca de cinco vezes, da atividade de Apo2L nesse ensaio.

O anticorpo multivalente do presente documento pode, numa forma de realização da invenção, ligar-se a um antigénio de superfície de células B. Antigénios de superfície de células B preferidos incluem CD19, CD20, CD22 e CD40, e mais preferentemente CD20.

Várias aplicações para os anticorpos multivalente do presente documento são contempladas e descritas em maior detalhe abaixo. Quando o anticorpo multivalente possui uma ou mais regiões Fc funcionais, antecipa-se que tem a capacidade de mediar funções efetoras (como ADCC e CDC) e tem uma semivida mais longa do que anticorpos multivalentes que carecem de uma região Fc. Tais anticorpos multivalentes podem ser utilizados onde a morte de células, como de células cancerosas ou tumorais, é desejada. Outras formas dos anticorpos multivalentes do presente documento que carecem uma região Fc podem ser desejáveis quando é desejada uma semivida mais curta (por exemplo, para o tratamento de doenças ou distúrbios cardiovasculares ou inflamatórios, ou quando o anticorpo é conjugado com um agente citotóxico); quando a internalização do anticorpo é desejada (por exemplo, para terapêutica com um imunconjugado que compreende o anticorpo e um agente citotóxico); para penetração melhorada de um tumor sólido; quando a expressão do anticorpo multivalente numa célula hospedeira não mamífera (por exemplo, uma célula hospedeira procariótica como uma células hospedeira de *E. coli*) é desejada; para terapêutica de doenças ou distúrbios não oncológicos; e/ou para evitar o "efeito de primeira dose" observado depois da administração aos pacientes de determinados anticorpos que possuem uma ou mais funções efetoras. Tais formas do anticorpo podem compreender um anticorpo multivalente incluindo um domínio de dimerização, em que o domínio de dimerização compreende uma região de dobradiça de anticorpo fusionada a um domínio de fecho de leucina (o domínio de fecho de leucina facilita a associação dos polipéptidos que formam o domínio de dimerização, mas podem ser subsequentemente removidos proteoliticamente antes da administração a um paciente) (veja-se a Fig. 23C); um anticorpo multivalente com três sítios de ligação a antigénio como aquela mostrada na Fig.

23D; ou um anticorpo multivalente com quatro sítios de ligação a antígeno como aquele ilustrado na Fig. 23E.

B. Especificidade de ligação a antígeno

O anticorpo multivalente do presente documento é direcionado contra, ou liga-se especificamente a, um ou mais antígenos alvo. Preferentemente, pelo menos um dos antígenos ligados pelo anticorpo multivalente é um polipéptido biologicamente importante e a administração do anticorpo a um mamífero que sofre de uma doença ou distúrbio pode resultar num benefício terapêutico nesse mamífero. Contudo, os anticorpos direcionados contra antígenos não polipeptídicos (como antígenos glicolipídicos associados a tumores; veja-se o documento de patente 5.091.178) são também contemplados.

Quando o antígeno é um polipéptido, pode ser uma molécula transmembranar (por exemplo, um recetor) ou ligando como um fator de crescimento. Antígenos exemplificativos incluem moléculas como renina; uma hormona do crescimento, incluindo hormona de crescimento humana e hormona de crescimento bovina; fator de libertação de hormona do crescimento; hormona da paratiroide; hormona estimulante da tiroide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadeia A de insulina; cadeia B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagão; fatores de coagulação como fator VIIIC, fator IX, fator tecidual (TF) e fator de von Willebrands; fatores anticoagulação como Proteína C; fator natriurético atrial; tensioativo pulmonar; um ativador de plasminogénio, como uma uroquinase ou ativador de plasminogénio de tipo de tecido ou urina humana (t-PA); bombesina; trombina; fator de crescimento hematopoiético; fator de necrose tumoral alfa e beta; encefalinase; RANTES (regulada na ativação, normalmente expressa e secretada por células T); proteína inflamatória de macrófagos humana (MIP-1-alfa); uma albumina sérica tal como albumina sérica

humana; substância inibidora Muelleriana; cadeia A da relaxina; cadeia B da relaxina; prorrelaxina; péptido associado a gonadotropina de ratinho; uma proteína microbiana, como beta-lactamase; ADNase; IgE; um antigénio associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA), como CTLA-4; inibina; ativina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); recetores de hormonas ou fatores de crescimento; proteína A ou D; fatores reumatoides; um fator neurotrófico tal como fator neurotrófico derivado de osso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, ou -6 (NT-3, NT-4, NT-5, ou NT-6), ou um fator de crescimento nervoso como NGF- β ; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento fibroblástico tal como aFGF e bFGF; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento transformante (TGF) tal como TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 ou TGF- β 5; fator de crescimento semelhante a insulina I e II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de ligação a fator de crescimento semelhante a insulina; proteínas CD como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 e CD25 (subunidade Tac do recetor de IL-2); eritropoietina; fatores osteoindutivos; imunotoxinas; uma proteína morfogenética óssea (BMP); um interferão como interferão-alfa, -beta, e -gama; fatores estimulantes de colónias (CSFs), *por exemplo*, M-CSF, GM-CSF e G-CSF; interleucinas (ILs), *por exemplo*, IL-1 a IL-10; superóxido dismutase; recetores de células T; proteínas de membrana de superfície; fator acelerador do decaimento; antigénio viral como, *por exemplo*, uma porção do envelope de SIDA; proteínas de transporte; recetores de migração dirigida; adressinas; proteínas reguladoras; integrinas como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, e ICAM, VLA-4 ou VCAM; um antigénio associado a tumor como recetor HER2, HER3 ou HER4; e fragmentos de qualquer dos polipéptidos listados acima.

Alvos moleculares preferidos para os anticorpos

englobados pela presente invenção incluem marcadores da superfície leucocitária ou proteínas CD como CD1a-c, CD2, CD2R, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16, CD16b, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a-d, CD43, CD44, CD44R, CD45, CD45A, CD45B, CD450, CD46-CD48, CD49a-f, CD50, CD51, CD52, CD53-CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CDw65, CD66a-e, CD68-CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a-b, CD80-CD83, CDw84, CD85-CD89, CDw90, CD91, CDw92, CD93-CD98, CD99, CD99R, CD100, CDw101, CD102-CD106, CD107a-b, CDw108, CDw109, CD115, CDw116, CD117, CD119, CD120a-b, CD121a-b, CD122, CDw124, CD126-CD129 e CD130; membros da família do recetor ErbB como o recetor de EGF, recetor HER2, recetor HER3 ou recetor HER4; antigénio(s) específico(s) da próstata; moléculas de adesão celular como IIB/IIIa, LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina $\alpha 4/\beta 7$ e integrina $\alpha v/\beta 3$ incluindo subunidades α ou β das mesmas (por exemplo, anticorpos anti-CD11a, anti-CD18 ou anti-CD11b); fatores de crescimento como VEGF; fator tecidual (TF); interferão alfa (IFN α); uma interleucina, como IL-8; IgE; antigénios de grupo sanguíneo; recetor flk2/flt3; recetor de obesidade (OB); recetor c-mpl; CTLA-4; proteína C, etc.

Antigénios solúveis ou fragmentos dos mesmos, opcionalmente conjugados com outras moléculas, podem ser utilizados como imunogénios para a geração de anticorpos. Para moléculas transmembranares, como recetores, fragmentos dos mesmos (por exemplo, o domínio extracelular de um recetor) podem ser utilizados como o imunogénio. Alternativamente, as células que expressam a molécula transmembranar podem ser utilizadas como o imunogénio. Tais células podem ser derivadas a partir de uma fonte natural (por exemplo, linhas celulares de cancro) ou podem ser

células que foram transformadas por técnicas recombinantes para expressar a molécula transmembranar. Outros antígenos e formas dos mesmos úteis para a preparação dos anticorpos serão aparentes para os peritos na especialidade.

Antígenos alvo preferidos para os anticorpos multivalentes do presente documento incluem (1) receptores ErbB, incluindo EGFR, HER2, HER3 e HER4; (2) receptores na superfamília de receptores de TNF, por exemplo, receptores Apo2L, como DR4, DR5, DcR1 e DcR2; (3) antígenos de superfície de células B, especialmente CD19, CD20, CD22 e CD40; (4) antígenos expressos por células tumorais; (5) antígenos superexpressos por células tumorais (por exemplo, receptores ErbB; DcR3); (6) receptores ativados por ligandos multiméricos (por exemplo, diméricos ou triméricos) (por exemplo, receptores na superfamília dos receptores de TNF; receptores VEGF, etc.). Numa forma de realização, três ou mais (por exemplo, quatro a cerca de oito) dos sítios de ligação a antígeno do anticorpo multivalente podem ser todos direcionados contra o mesmo determinante antigénico ou epítipo num dos antígenos anteriores.

O presente pedido também proporciona anticorpos multiespecíficos, ou seja, anticorpos que têm especificidades de ligação para pelo menos dois epítipos diferentes ou determinantes antigénicos. Anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos; BsAbs) têm potencial significativo numa ampla gama de aplicações clínicas como agentes de direcionamento para imunodiagnóstico e terapêutica *in vitro* e *in vivo*, e para imunoensaaios de diagnóstico.

Os anticorpos biespecíficos têm sido muito úteis na sondagem de propriedades funcionais das moléculas de superfície celular e na definição da capacidade dos diferentes receptores Fc para mediar a citotoxicidade (Fanger et al., Crit. Rev. Immunol. 12:101-124 (1992)).

Nolan et al., Biochem. Biophys. Acta. 1040:1-11 (1990) descrevem outras aplicações de diagnóstico para os BsAbs. Em particular, os BsAbs podem ser construídos para imobilizar enzimas para utilização em imunoenaios enzimáticos. Para alcançar isto, um braço do BsAb pode ser desenhado para se ligar a um epítipo específico na enzima de modo que a ligação não causa a inibição enzimática, o outro braço do BsAb liga-se à matriz de imobilização assegurando uma elevada densidade enzimática no local desejado. Exemplos de tais BsAbs de diagnóstico incluem o BsAb de coelho anti-IgG/anti-ferritina descrito por Hammerling et al., J. Exp. Med. 128:1461-1473 (1968) que foi utilizado para localizar antigénios de superfície. Os BsAbs que têm especificidades de ligação para a peroxidase de rábano (HRP) bem como uma hormona também foram desenvolvidos. Outra potencial aplicação imunoquímica para os BsAbs envolve a sua utilização em imunoenaios de dois sítios. Por exemplo, dois BsAbs são produzidos ligando-se a dois epítipos separados na proteína analito: um BsAb liga o complexo a uma matriz insolúvel, o outro liga uma enzima indicadora (veja-se Nolan et al., *supra*).

Anticorpos multiespecíficos também podem ser utilizados para imunodiagnóstico *in vitro* ou *in vivo* de várias doenças como o cancro (Songsivilai et al., Clin. Exp. Immunol. 79:315 (1990)). Para facilitar esta utilização de diagnóstico do BsAb, um braço do BsAb pode ligar-se a um antigénio associado a tumor e o outro braço pode ligar-se a um marcador detetável como um quelante que se liga fortemente a um radionuclídeo. Utilizando esta abordagem, Le Doussal et al., produziram um BsAb útil para radioimunodeteção de carcinomas colorretais e de tiroide que tinham um braço que se ligava a um antigénio carcinoembrionário (CEA) e outro braço que se ligava a ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA). Veja-se Le Doussal et al., Int. J. Cancer Suppl. 7:58-62 (1992) e Le Doussal et

al., J. Nucl. Med. 34:1662-1671 (1993). Stickney et al. descrevem, de forma semelhante, uma estratégia para detectar cânceres colorretais que expressam CEA utilizando radioimunodeteção. Estes investigadores descrevem um BsAb que se liga a CEA bem como a hidroxietiltiourea-benzil-EDTA (EOTUBE). Veja-se Stickney et al., Cancer Res. 51:6650-6655 (1991).

Os anticorpos multiespecíficos também podem ser utilizados para terapêutica humana na citotoxicidade redirecionada proporcionando um braço que se liga a um alvo (por exemplo, agente patogénico ou célula tumoral) e outro braço que se liga a uma molécula desencadeadora citotóxica, como o recetor de células T ou um recetor de Fc gama. Consequentemente, os anticorpos multiespecíficos podem ser utilizados para direcionar os mecanismos de defesa imunitária do paciente especificamente para a célula tumoral ou agente infeccioso. Utilizando esta estratégia, foi demonstrado que os anticorpos biespecíficos que se ligam ao Fc gama RIII (ou seja, CD16) podem mediar a morte das células tumorais por células *natural killer* (NK)/linfócitos granulares grandes (LKG) *in vitro* e são eficazes na prevenção do crescimento tumoral *in vivo*. Segal et al., Chem. Immunol. 47:179 (1989) e Segal et al., Biologic Therapy of Cancer 2(4) DeVita et al. eds. J.B. Lippincott, Philadelphia (1992) p. 1. De forma semelhante, foi desenvolvido um anticorpo biespecífico tendo um braço que se liga a Fc gama RIII e outro que se liga ao recetor HER2 para terapêutica de tumores ováricos e de mama que superexpressam o antígeno HER2. (Hsieh-Ma et al. Cancer Research 52:6832-6839 (1992) e Weiner et al. Cancer Research 53:94-100 (1993)). Os anticorpos biespecíficos também medeiam a morte por células T. Normalmente, os anticorpos biespecíficos ligam o complexo de CD3 nas células T a um antígeno associado a um tumor. Um BsAb F(ab')₂ completamente humanizado que consiste em anti-CD3

ligado a anti-p185^{HER2} foi utilizado para direcionar células T para matar células tumorais que superexpressam o recetor HER2. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175(1):217 (1992). Os anticorpos biespecíficos foram testados em vários ensaios clínicos de fase precoce com resultados encorajadores. Num ensaio, 12 pacientes com cancro pulmonar, ovárico ou de mama foram tratados com infusões de linfócitos T direcionados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/antitumoral (MOC31). deLeij et al. Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger e Segal Eds., Lienhart (1991) p. 249. As células alvejadas induziram uma lise local considerável das células tumorais, uma reação inflamatória leve, mas nenhuns efeitos secundários tóxicos ou respostas de anticorpo anti-ratinho. Num ensaio muito preliminar de um anticorpo biespecífico anti-CD3/anti-CD19 num paciente com neoplasia maligna de células B, foi também alcançada uma redução significativa das contagens de células tumorais periféricas. Clark et al. Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger e Segal Eds., Lienhart (1991) p. 243. Veja-se também Kroesen et al., Cancer Immunol. Immunother. 37:400-407 (1993), Kroesen et al., Br. J. Cancer 70:652-661 (1994) e Weiner et al., J. Immunol. 152:2385 (1994) em relação a aplicações terapêuticas para anticorpos multiespecíficos.

Os anticorpos multiespecíficos também podem ser utilizados como agentes fibrinolíticos ou adjuvantes de vacinas. Adicionalmente, estes anticorpos podem ser utilizados no tratamento de doenças infecciosas (por exemplo, para direcionar células efetoras para células infectadas com vírus como VIH ou vírus da gripe ou protozoários como *Toxoplasma gondii*), utilizados para administrar imunotoxinas a células tumorais, ou direcionar complexos imunes a recetores da superfície celular (veja-se Fanger et al., *supra*).

Vários anticorpos multiespecíficos são contemplados no presente documento. Por exemplo, o anticorpo multiespecífico pode ligar-se a dois ou mais epítomos diferentes de um antígeno de interesse. Alternativamente, o anticorpo multiespecífico pode ter especificidade para (1) um antígeno expresso por uma célula alvo (por exemplo, onde a célula alvo é uma célula tumoral) e (2) uma molécula desencadeadora num leucócito, como uma molécula recetora de células T (por exemplo, CD2 ou CD3), ou recetores Fc para IgG (Fc gama R), como Fc gama RI (CD64), Fc gama RII (CD32) e Fc gama RIII (CD16) de modo a focar os mecanismos de defesa celular na célula que expressa o antígeno. Os anticorpos multiespecíficos podem também ser usados para localizar agentes citotóxicos em células que expressam o antígeno alvo. Estes anticorpos possuem um braço de ligação a antígeno alvo e um braço que se liga ao agente citotóxico (por exemplo, saporina, interferão alfa, alcaloide da vinca, cadeia A de ricina, metotrexato ou hapteno de isótopos radioativos).

O documento WO 96/16673 descreve um anticorpo biespecífico anti-HER2/anti-Fc gama RIII e o documento de patente U.S. N.º 5.837.234 divulga um anticorpo biespecífico anti-HER2/anti-Fc gamma RI. Um anticorpo biespecífico anti-HER2/Fc alfa é mostrado no documento WO98/02463. O documento de patente U.S. N.º 5.821.337 ensina um anticorpo biespecífico anti-HER2/anti-CD3.

C. Preparação do anticorpo parental

De modo a gerar o anticorpo multivalente, um anticorpo uparental ou pode partidar com domínios variáveis direcionado contra um antígeno pode ser preparado utilizando várias metodologias para produzir anticorpos, como aquelas descritas abaixo no presente documento. As sequências dos domínios variáveis do anticorpo de partida ou parental podem ser utilizadas na concepção do anticorpo multivalente do presente documento.

(i) Anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais são produzidos preferentemente em animais por múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antigénio relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antigénio relevante com uma proteína que seja imunogénica na espécie a ser imunizada, por exemplo, hemocianina de lapa californiana, albumina sérica, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja utilizando um agente bifuncional ou derivatizante, por exemplo, éster de maleimidobenzóil sulfosuccinimida (conjugação por meio de resíduos de cisteína), N-hidroxysuccinimida (por meio de resíduos de lisina), gluteraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 , ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, em que R e R^1 são grupos alquilo diferentes.

Os animais são imunizados contra o antigénio, conjugados imunogénicos, ou derivados combinando, por exemplo, 100 μg ou 5 μg da proteína ou conjugado (para coelhos ou ratinhos, respetivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injetando a solução por via intradérmica em múltiplos locais. Um mês depois os animais são reforçados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de péptido ou conjugado em adjuvante completo de Freund por injeção subcutânea em múltiplos locais. De sete a 14 dias mais tarde são recolhidas amostras sanguíneas dos animais e o soro é analisado quanto ao título de anticorpos. Os animais são reforçados até estabilizar o título. Preferentemente, o animal é reforçado com o conjugado do mesmo antigénio, mas conjugado a uma proteína diferente e/ou através de um reagente de reticulação diferente. Os conjugados também podem ser feitos em culturas celulares como proteínas de fusão. Igualmente, são utilizados convenientemente agentes de agregação tais como alúmen para potenciar a resposta imunitária.

(ii) Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais são obtidos de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, ou seja, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto para possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades mínimas. Assim, o modificador "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos diferenciados.

Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando o método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), ou podem ser produzidos por meio de métodos de ADN recombinante (documento de patente U.S. N.º 4.816.567).

No método de hibridoma, um ratinho ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um hamster, é imunizado como foi descrito anteriormente no presente documento para induzir linfócitos que produzam ou sejam capazes de produzir anticorpos que se liguem especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são fusionados depois com células de mieloma utilizando um agente de fusão adequado, tais como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e crescidas num meio de cultura adequado que contém preferentemente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma originais, não fusionadas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não possuem a enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio HAT), cujas substâncias previnem o crescimento de células deficientes

em HGPRT.

As células de mieloma preferidas são aquelas que são fusionadas eficazmente, suportam a produção a alto nível estável de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo selecionadas, são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Entre estes, as linhas celulares de mieloma preferidas são linhas de mieloma murino, como as derivadas de tumores de ratinho MOPC-21 e MPC-11 disponíveis do Centro de Distribuição de Células do Instituto Salk, San Diego, Califórnia, Estados Unidos, e as células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis da Coleção Americana de Culturas Tipo, Rockville, Maryland, Estados Unidos. Também foram descritas linhas celulares de mieloma humano e heteromieloma de ratinho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); e Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987)).

O meio de cultura no qual as células de hibridoma crescem é analisado para a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferentemente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise de Scatchard de Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Depois de serem identificadas as células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados por meio de procedimentos de diluição limitativa e cultivados por meio de métodos padrão (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Os meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores ascíticos num animal.

Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones também são separados convenientemente do meio de cultura, fluido ascítico ou soro por meio de procedimentos de purificação de anticorpos convencionais tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

O ADN que codifica os anticorpos monoclonais é prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (por exemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que são capazes de se ligar especificamente a ADNs que codificam as cadeias pesadas e leves dos anticorpo murinos). As células de hibridoma agem como uma fonte preferida do dito ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vetores de expressão, que, quando são transfetados em células hospedeiras, tais como *E. coli*, células COS símias, células de ovário de hámster chinês (CHO), ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem proteína de anticorpo, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Os artigos de revisão sobre expressão recombinante em bactérias de ADN que codifica o anticorpo incluem Skerra *et al.*, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) e Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992). A expressão recombinante de anticorpos será descrita em maior detalhe abaixo.

Numa forma de realização adicional, anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados das bibliotecas de fagos de anticorpos geradas utilizando as técnicas descritas em McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628

(1991) e Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos humanos e murinos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de afinidade elevada (intervalo nM) através de redistribuição de cadeias (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), bem como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construir bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Assim, estas técnicas são alternativas viáveis às técnicas de hibridoma de anticorpo monoclonal tradicionais para isolamento de anticorpos monoclonais.

O ADN pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência de codificação para domínios constantes de cadeia pesada e leve humanos em lugar das sequências de ratinho homólogas (documento de patente U.S. N.º 4.816.567; e Morrison, *et al.*, Proc. Nat/ Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), ou juntando covalentemente à sequência de codificação da imunoglobulina toda ou parte da sequência de codificação para um polipéptido não imunoglobulínico.

Tipicamente os ditos polipéptidos não imunoglobulínicos substituem os domínios constantes de um anticorpo, ou substituem os domínios variáveis de um local de combinação de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico que compreende um local de combinação de antígeno que tem especificidade por um antígeno e outro local de combinação de antígeno que tem especificidade por um antígeno diferente.

(iii) *Anticorpos humanos*

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos através de uma adaptação do método de hibridoma primeiramente descrito por Kohler e Milstein utilizando linfócitos B humanos como o parceiro de fusão. Os linfócitos B humanos que produzem um anticorpo de interesse podem, por exemplo,

ser isolados a partir de um indivíduo humano, depois de se obter o consentimento informado. Por exemplo, o indivíduo pode estar a produzir anticorpos contra um autoantigénio como ocorre com determinados distúrbios como lúpus eritematoso sistémico (Shoenfeld *et al.* J. Clin. Invest. 70:205 (1982)), púrpura trombocitopénica imunomediada (ITP) (Nugent *et al.* Blood 70(1):16-22 (1987)), ou cancro. Alternativamente, ou adicionalmente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Por exemplo, podem expor-se linfócitos de sangue periférico humanos isolados *in vitro* a um agente lisomotrófico (por exemplo, éster L-leucina-O-metílico, éster dimetílico do ácido L-glutâmico ou éster L-leucil-L-leucina-O-metílico) (documento de patente U.S. N.º 5.567.610, Borrebaeck *et al.*); e/ou linfócitos do sangue periférico humano esgotados de células T *in vitro* com adjuvantes como 8-mercaptopguanosina e citocinas (documento de patente U.S. N.º 5.229.275, Goroff *et al.*).

Os linfócitos B recuperados a partir do indivíduo ou imunizados *in vitro*, são depois, no geral, imortalizados de modo a gerar um anticorpo monoclonal humano. Técnicas para imortalizar os linfócitos B incluem, mas não estão limitadas a: (a) fusão do linfócito B humano com células de mielomas humanos, de ratinho ou heteromieloma de ratinho-humano; (b) transformação viral (por exemplo, com um vírus Epstein-Barr; veja-se Nugent *et al.*, *supra*, por exemplo); (c) fusão com uma linha celular linfoblastoide ou (d) fusão com células de linfoma.

Os linfócitos podem ser fusionados depois com células de mieloma utilizando um agente de fusão adequado, como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e crescidas num meio de cultura adequado que contém preferentemente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das

células de mieloma originais, não fusionadas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não possuem a enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio HAT), cujas substâncias previnem o crescimento de células deficientes em HGPRT. Linhas celulares de mieloma humano e heteromieloma de ratinho-humano adequadas foram descritas (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987)). O meio de cultura no qual as células de hibridoma crescem é analisado quanto à produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferentemente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Depois de serem identificadas as células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados por meio de procedimentos de diluição limitativa e cultivados por meio de métodos padrão (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.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 secretados pelos subclones também são separados convenientemente do meio de cultura, fluido ascítico ou soro por meio de procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tais como, por exemplo, cromatografia de proteína A, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Os anticorpos humanos também podem ser gerados utilizando um hospedeiro não humano, tal como um ratinho,

que é capaz de produzir anticorpos humanos. Conforme indicado acima, estão agora disponíveis ratinhos transgênicos que são capazes, após a sua imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de junção (J_H) da cadeia pesada de um anticorpo em ratinhos mutantes quiméricos e de linha germinal resulta na inibição completa da produção de anticorpos endógena. A transferência da coleção de genes de imunoglobulinas germinais humanos em tais ratinhos mutantes germinais resultará na produção de anticorpos humanos após desafio antigênico. Veja-se, por exemplo, 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); documento de patente U.S. N.º 5.591.669; documento de patente U.S. N.º 5.589.369 e documento de patente U.S. N.º 5.545.807. Os anticorpos humanos também podem ser preparados utilizando ratinhos SCI-hu (Duchosal et al. Nature 355:258-262 (1992)).

Noutra forma de realização, o anticorpo humano pode ser selecionado a partir de uma biblioteca de apresentação em fagos de anticorpos humanos. A preparação de bibliotecas de anticorpos ou fragmentos dos mesmos é bem conhecida na técnica e qualquer dos métodos conhecidos pode ser utilizado para construir uma família de vetores de transformação que podem ser introduzidos nas células hospedeiras. Bibliotecas de cadeias leves e pesada 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. Veja-se, 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); documento WO 98/05344; documento WO 98/15833; documento WO 97/47314; documento WO 97/44491; documento WO 97/35196; documento WO 95/34648; documento de patente U.S. N.º 5.712.089; documento de patente U.S. N.º 5.702.892; documento de patente U.S. N.º 5.427.908; documento de patente U.S. N.º 5.403.484; documento de patente U.S. N.º 5.432.018; documento de patente U.S. N.º 5.270.170; documento WO 92/06176; documento WO 99/06587; documento de patente U.S. N.º 5.514.548; documento WO97/08320 e documento de patente U.S. N.º 5.702.892. O antígeno de interesse é detetado frente à biblioteca de fagos utilizando procedimentos conhecidos no campo para selecionar fagos-anticorpos que se ligam ao antígeno alvo.

(iv) *Anticorpos humanizados*

Foram descritos na técnica métodos para humanizar anticorpos não humanos. Preferentemente, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos nele de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são denominados com frequência resíduos "importados", que são recolhidos tipicamente de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), substituindo as sequências das regiões hipervariáveis pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (documento de patente U.S. N.º 4.816.567) 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 nos quais alguns resíduos das regiões hipervariáveis e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

A escolha de domínios variáveis humanos, tanto leves como pesados, a ser utilizado na preparação dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o método denominado de "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é rastreada contra toda a biblioteca de sequências de domínios variáveis humanas conhecidas. A sequência humana que está mais próxima daquela do roedor é então aceite como a estrutura humana para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Outro método utiliza uma estrutura particular derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser usada para diversos anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993)).

É ainda importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para o antigénio e outras propriedades biológicas favoráveis. Para alcançar este objetivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências de origem e vários produtos humanizados conceptuais utilizando modelos tridimensionais das sequências de origem e humanizadas. Os modelos de imunoglobulinas tridimensionais estão comumente disponíveis e são familiares àqueles peritos na especialidade. Estão disponíveis programas informáticos os quais ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulinas

candidatas selecionadas. A inspeção destas apresentações permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, ou seja, a análise de resíduos que influem na capacidade da imunoglobulina candidata para se ligar a seu antígeno. Desta maneira, podem ser selecionados e ser combinados do recipiente e importados sequências de modo que se consiga a característica de anticorpo desejada, tal como afinidade aumentada pelo antígeno ou os antígenos alvo, e conseguida. Geralmente, os resíduos das regiões hipervariáveis estão diretamente e muito substancialmente envolvidos na influência da ligação ao antígeno.

(v) Fragmentos de anticorpos

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados por meio de digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja-se, por exemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); e Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Contudo, estes fragmentos podem agora ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir das bibliotecas em fagos de anticorpos discutidas acima. Alternativamente, podem ser recuperados diretamente fragmentos Fab'-SH de E. coli e ser acoplados quimicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, os fragmentos F(ab')₂ podem ser diretamente isolados a partir de cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para o perito. Noutras formas de realização, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia simples (scFv). Veja-se o documento WO 93/16185.; documento de patente U.S. N.º 5.571.894 e documento de patente U.S. N.º 5.587.458. O fragmento de

anticorpo também pode ser um "anticorpo linear", por exemplo, como descrito no documento de patente U.S. N.º 5.641.870, por exemplo. Tais fragmentos de anticorpos podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

(vi) Sequências variantes de anticorpo

São contempladas uma ou mais modificações dos anticorpos descritos no presente documento. Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. As variantes da sequência de aminoácidos do anticorpo são preparadas pela introdução de alterações nucleotídicas apropriadas no ácido nucleico do anticorpo, ou através de síntese peptídica. Tais modificações incluem, por exemplo, eliminações a partir de, e/ou inserções em e/ou substituições de, resíduos dentro das sequências de aminoácidos do anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição é realizada para alcançar a construção final, desde que a construção final possua as características desejadas. As mudanças de aminoácidos também podem alterar processos pós-traducionais do anticorpo, como alterar o número ou posição dos sítios de glicosilação. Tais alterações podem ser feitas ao anticorpo parental e/ou anticorpo multivalente e/ou podem ser introduzidas na sequência de aminoácidos do anticorpo multivalente no momento em que a sequência é feita.

Um método útil para a identificação de determinados resíduos ou regiões do anticorpo que são localizações preferidas para mutagênese é chamado "mutagênese dirigida com alanina" como descrito por Cunningham e Wells Science, 244:1081-1085 (1989). Aqui, é identificado um resíduo ou grupo de resíduos alvo (por exemplo, resíduos com carga tais como arg, asp, his, lys, e são substituídos por um aminoácido neutro ou com carga negativa (mais preferentemente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com antigénio. Aquelas

localizações de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são, então, refinadas por introdução de mais ou outras variantes nos, ou para os, sítios de substituição. Assim, enquanto o sítio para introdução da variação na sequência de aminoácidos é predeterminado, a natureza da mutação *per se* não tem de ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o rendimento de uma mutação num local dado, realiza-se mutagénese dirigida com ala ou aleatória no codão ou região alvo e os anticorpos multivalentes expressos são rastreadas quanto à atividade desejada.

As inserções de sequências de aminoácidos incluem fusões amino e/ou carboxilo terminais variando em comprimento de um resíduo a polipéptidos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-sequência de resíduos de aminoácidos individuais ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionilo N-terminal ou o anticorpo fusionado a um polipéptido citotóxico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão ao terminal N ou C do anticorpo de uma enzima (por exemplo, para ADEPT) ou um polipéptido que aumenta a semivida sérica do anticorpo.

Um outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácidos. Estas variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo substituído por um resíduo diferente. Os sítios de maior interesse para mutagénese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas também são contempladas alterações de FR. As substituições conservativas são mostradas no Quadro 1 sob o título de "substituições preferidas". Se tais substituições resultam numa alteração na atividade biológica, então, as substituições mais substanciais, denominadas "substituições exemplificativas" no Quadro 1, ou como adicionalmente descrito abaixo em referência às classes de aminoácidos, podem ser

introduzidas e os produtos rastreados.

Quadro 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

São conseguidas modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo selecionando substituições que diferem significativamente no seu efeito na manutenção de (a) a estrutura da cadeia principal polipeptídica na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) da carga ou

hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou (c) do volume da cadeia lateral. Os resíduos de origem natural são divididos em grupos baseados em propriedades de cadeia lateral comuns:

- (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílicos 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 troca de um membro de uma destas classes para uma outra classe.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação adequada do anticorpo também pode ser substituído, geralmente com serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e prevenir a reticulação aberrante. De modo inverso, uma ou mais ligações de cisteína podem ser adicionadas ao anticorpo para melhorar a sua estabilidade.

Um tipo de variante de substituição particularmente preferido envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo parental (por exemplo, um anticorpo humanizado ou humano). Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para posterior desenvolvimento terão propriedades biológicas melhoradas relativamente ao anticorpo parental a partir do qual são geradas. Uma forma conveniente de gerar tais variantes de substituição envolve a maturação da afinidade utilizando apresentação em fagos. Resumidamente, diversos sítios da região hipervariável (por exemplo, 6-7 sítios) são mutados para gerar todas as substituições de aminoácidos possíveis em cada sítio. Os anticorpos multivalentes assim gerados são apresentados de uma forma monovalente a partir de partículas de fago filamentoso como fusões ao produto do

gene III de M13 compactado dentro de cada partícula. As variantes expressas em fagos são então rastreadas quanto à sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação), como divulgado no presente documento. Com a finalidade de identificar locais de região hipervariável candidatos para modificação, pode ser realizada mutagênese de rastreio de alanina para identificar resíduos de região hipervariável que contribuem significativamente à ligação de 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 que tais variantes são geradas, o painel de variantes é submetido a rastreio como descrito no presente documento e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para posterior desenvolvimento.

Outro tipo de variante de aminoácido do anticorpo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo. Alterar significa eliminar uma ou mais frações de hidratos de carbono encontrados no anticorpo, e/ou adicionando um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no anticorpo.

A glicosilação de anticorpos é tipicamente ou N-ligada ou O-ligada. N-ligada refere-se à ligação da fração de hidrato de carbono à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas de asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é um aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática da fração de hidrato de carbono à cadeia lateral de asparagina. Assim, a presença de qualquer uma destas sequências tripeptídicas num polipéptido cria um potencial sítio de glicosilação. A glicosilação O-ligada

refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose, ou xilose a um ácido de hidroxamino, mais frequentemente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina possam também ser utilizadas.

A adição de sítios de glicosilação ao anticorpo é convenientemente conseguida alterando a sequência de aminoácidos de tal modo que contenha uma ou mais das sequências tripeptídicas acima descritas (para sítios de glicosilação N-ligados). A alteração também pode ser feita pela adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina na sequência do anticorpo original (para sítios de glicosilação O-ligados).

As moléculas de ácido nucleico codificando variantes da sequência de aminoácidos do anticorpo são preparadas por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não são limitados a, isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes de sequência de aminoácidos de ocorrência natural) ou preparação através de mutagénese mediada por oligonucleótidos (ou sítio-dirigida), mutagénese por PCR, e mutagénese por cassete de uma versão variante ou não variante previamente preparada do anticorpo.

Pode ser desejável modificar o anticorpo da invenção em relação à função efetora, por exemplo, de modo a potenciar a citotoxicidade mediada por células dependente de antígeno (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente do complemento (CDC) do anticorpo. Isto pode ser conseguido introduzindo uma ou mais modificações de aminoácidos numa região Fc do anticorpo, gerando assim uma região Fc variante. A variante de região Fc pode compreender uma sequência de região Fc humana (por exemplo, uma região Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana) que compreende uma modificação de aminoácidos (por exemplo, uma substituição) numa ou mais posições de aminoácidos.

Numa forma de realização, a região Fc variante pode mediar a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) na presença de células efetoras humanas de forma mais eficaz, ou ligar-se a um recetor Fc gama (FcγR) com melhor afinidade, do que uma região Fc de sequência nativa. Tais variantes de região Fc podem compreender uma modificação de aminoácidos numa ou mais das posições 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 ou 430 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat.

A variante de região Fc com ligação reduzida a um FcγR pode compreender uma modificação de aminoácidos numa ou mais das posições de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 ou 439 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat.

Por exemplo, a variante de região Fc pode apresentar uma ligação reduzida a um FcγRI e compreender uma modificação de aminoácidos numa ou mais das posições de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 327 ou 329 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat.

A variante de região Fc pode apresentar uma ligação reduzida a um FcγRII e compreender uma modificação de aminoácidos numa ou mais das posições de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 ou 439 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat.

A variante de região Fc de interesse pode apresentar uma ligação reduzida a um FcγRIII e compreender uma modificação de aminoácidos numa ou mais das posições de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269,

270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 ou 437 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat.

Noutra forma de realização, a variante de região Fc apresenta uma ligação melhorada ao Fc γ R e compreende uma modificação de aminoácidos numa ou mais das posições de aminoácidos 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 298, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 326, 330, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 ou 430 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat.

Por exemplo, a variante de região Fc pode apresentar uma ligação aumentada a um Fc γ RIII e, opcionalmente, pode adicionalmente apresentar uma ligação diminuída a um Fc γ RII. Uma tal variante exemplificativa compreende uma ou mais modificações de aminoácidos na(s) posição(ões) 298 e/ou 333 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat.

A variante de região Fc pode apresentar uma ligação aumentada a um Fc γ RII e compreender uma modificação de aminoácidos numa ou mais das posições de aminoácidos 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 326, 330, 331, 337, 340, 378, 398 ou 430 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat. Tais variantes de região Fc com ligação aumentada a um Fc γ RII podem opcionalmente apresentar ainda uma ligação diminuída a um Fc γ RIII e podem, por exemplo, compreender uma modificação de aminoácidos em qualquer uma ou mais das posições de aminoácidos 268, 272, 298, 301, 322 ou 340 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat.

A região Fc variante pode alternativa ou adicionalmente ter afinidade de ligação ao recetor Fc

neonatal (FcRn) alterada. Tais regiões Fc variantes podem compreender uma modificação de aminoácidos numa ou mais das posições 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 ou 447 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat. As variantes de região Fc com ligação reduzida a um FcRn podem compreender uma modificação de aminoácidos numa ou mais das posições de aminoácidos 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 ou 447 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat. As variantes de região Fc mencionadas anteriormente podem, alternativamente, apresentar uma ligação aumentada a um FcRn e compreender uma modificação de aminoácidos numa ou mais das posições de aminoácidos 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ou 434 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat.

Variantes de região Fc com ligação a Clq e/ou citotoxicidade dependente do complemento (CDC) alterada (ou seja, melhorada ou diminuída) são descritas no documento WO99/51642. Tais variantes podem compreender uma substituição de aminoácidos numa ou mais das posições 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 ou 334 da região Fc. Veja-se, também, Duncan e Winter Nature 322:738-40 (1988); documento de patente U.S. N.º 5.648.260; documento de patente U.S. N.º 5.624.821 e documento WO94/29351 relacionados com as variantes de região Fc.

Para aumentar a semivida em soro do anticorpo, pode ser incorporado um epítipo de ligação a recetor de recuperação no anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo) como é descrito no documento de patente U.S. 5.739.277, por exemplo. Como utilizado no presente

documento, a expressão "epítipo de ligação a recetor de recuperação" refere-se a um epítipo da região Fc de uma molécula de IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, ou IgG₄) que é responsável por aumentar a semivida sérica *in vivo* da molécula de IgG.

(vii) *Imunoconjugados*

A invenção também se refere a imunoconjugados que compreendem um anticorpo conjugado com um agente citotóxico como um agente quimioterapêutico, toxina (por exemplo, uma toxina de molécula pequena ou uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes das mesmas), ou um isótopo radioativo (ou seja, um radioconjugado).

Agentes quimioterapêuticos úteis na geração de tais imunoconjugados foram descritos acima.

Conjugados de um anticorpo e uma ou mais toxinas de molécula pequena, como caliqueamicina, uma maitansina (documento de patente U.S. N.º 5.208.020), um tricoteno, e CC1065 são também contemplados no presente documento.

Numa forma de realização preferida da invenção, o anticorpo é conjugado com uma ou mais moléculas de maitansina (por exemplo, cerca de 1 a cerca de 10 moléculas de maitansina por molécula de anticorpo). A maitansina pode, por exemplo, ser convertida em May-SS-Me que pode ser reduzida a May-SH3 e submetida a reação com um anticorpo modificado (Chari *et al.* Cancer Research 52: 127-131 (1992)) para gerar um imunoconjugado de maitansinoide-anticorpo.

Outro imunoconjugado de interesse compreende um anticorpo conjugado com uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família de antibióticos de caliqueamicina é capaz de produzir quebras no ADN de cadeia dupla em concentrações subpicomolares. Análogos estruturais da caliqueamicina que podem ser utilizados incluem, mas não estão limitados a, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG e θ_1^I

(Hinman et al. Cancer Research 53: 3336-3342 (1993) e Lode et al. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)). Vejam-se, também, os documentos de patente U.S. N.ºs 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586 e 5.773.001.

Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos das mesmas que podem ser utilizados incluem a cadeia A de difteria, fragmentos ativos de não ligação da toxina da difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de *Mormodica charantia*, curcina, crotina, inibidor da *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restritocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Veja-se, por exemplo, o documento WO 93/21232 publicado em 28 de outubro de 1993.

A presente invenção contempla ainda um imunoc conjugado formado entre um anticorpo e um composto com atividade nucleolítica (por exemplo, uma ribonuclease ou uma ADN endonuclease, como uma desoxirribonuclease; ADNase).

Uma variedade de isótopos radioativos estão disponíveis para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioativos de Lu.

Conjugados do anticorpo e agente citotóxico podem ser produzidos utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados funcionais de imidoésteres (como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres ativos (como suberato de disuccinimidilo), aldeídos (como gluteraldeído), compostos de bis-azido (coo bis (p-azidobenzoílo) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilenodiamina),

diisocianatos (como 2,6-diisocianato de tolieno), e compostos de flúor bis-ativo (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta et al. *Science* 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentacético (MX-DTPA) marcado com carbono 14 é um agente quelante exemplificativo para a conjugação de radionucleótidos com o anticorpo. Veja-se o documento WO 94/11026. O ligante pode ser um "ligante clivável" que facilita a libertação do fármaco citotóxico na célula. Por exemplo, um ligante ácido-lábil, ligante sensível à peptidase, ligante de dimetilo ou ligante contendo dissulfureto (Chari et al. *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) podem ser utilizados.

Alternativamente, pode ser produzida uma proteína de fusão que compreende o anticorpo e agente citotóxico, por exemplo, através de técnicas recombinantes ou síntese peptídica.

Ainda noutra forma de realização, o anticorpo pode ser conjugado com um "recetor" (como estreptavidina) para utilização no pré-direcionamento tumoral em que o conjugado de anticorpo-recetor é administrado ao paciente, seguido pela remoção de conjugado não ligado a partir da circulação utilizando um agente de eliminação e depois administração de um "ligando" (por exemplo, avidina) que é conjugado com um agente citotóxico (por exemplo, um radionucleótido).

(viii) *Terapêutica com profármacos mediada por enzimas dependente de anticorpos (Antibody Dependent Enzyme Mediated Prodrug Therapy, ADEPT)*

Os anticorpos da presente invenção podem ser também utilizados em ADEPT através da conjugação do anticorpo com uma enzima ativadora de profármaco que converte um profármaco (por exemplo, um agente quimioterapêutico de peptidilo, veja-se o documento WO 94/01145) num fármaco anticanceroso ativo. Veja-se, por exemplo, o documento WO

88/07378 e o documento de patente U.S. N.º 4.975.278.

O componente enzimático do imunoconjugado útil para ADEPT inclui qualquer enzima capaz de atuar sobre um profármaco de tal modo a convertê-lo na sua forma citotóxica mais ativa.

Enzimas que são úteis no método desta invenção incluem, mas não estão limitadas a, fosfatase alcalina útil para converter profármacos que contêm fosfato em fármacos livres; arilssulfatase útil para converter profármacos que contêm sulfato em fármacos livres; citosina desaminase útil para converter 5-fluorocitosina não tóxica no fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteases, como protease de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (como catepsinas B e L), que são úteis para converter profármacos que contêm péptidos em fármacos livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para converter profármacos que contêm substituintes de D aminoácidos; enzimas que clivam hidratos de carbono como beta-galactosidade e neuraminidase úteis para converter profármacos glicosilados em fármacos livres; beta-lactamase útil para converter fármacos derivatizados com beta-lactamas em fármacos livres; e amidases de penicilina, como amidase de penicilina V ou amidase de penicilina G, úteis para converter fármacos derivatizados nos seus azotos amina com grupos fenoxiacetilo ou fenilacetilo, respetivamente, em fármacos livres. Alternativamente, os anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos na técnica como abzymas, podem ser utilizados para converter os profármacos da invenção em fármacos ativos livres (veja-se, por exemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Os conjugados de anticorpo-abzima podem ser preparados como descrito no presente documento para administração da abzima a uma população de células tumorais.

As enzimas desta invenção podem ser ligadas covalentemente aos anticorpos através de técnicas bem

conhecidas na técnica como a utilização dos reagentes de reticulação heterobifuncionais discutidos acima. Alternativamente, proteínas de fusão que compreendem pelo menos a região de ligação a antígeno de um anticorpo da invenção ligada a pelo menos uma porção funcionalmente ativa de uma enzima da invenção podem ser construídas utilizando técnicas de ADN recombinante bem conhecidas na técnica (veja-se, por exemplo, Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (1984)).

(ix) Outras modificações de anticorpos

Outras modificações do anticorpo são contempladas no presente documento. Por exemplo, o anticorpo pode ser ligado a um de uma variedade de polímeros não proteicos, por exemplo, polietilenoglicol, propilenoglicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietilenoglicol e polipropilenoglicol. O anticorpo também pode ser aprisionado em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial (por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respetivamente), em sistemas de administração de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microsferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edição, Oslo, A., Ed., (1980).

Os anticorpos divulgados no presente documento também podem ser formulados como imunolipossomas. Lipossomas contendo o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na técnica, como descrito em Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); documentos de patente U.S. N.ºs 4.485.045 e 4.544.545 e documento WO97/38731 publicado a 23 de outubro de 1997. Lipossomas com tempo de circulação potenciado são divulgados no documento de patente U.S. N.º

5.013.556.

Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados através do método de evaporação de fase reversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudidos através de filtros de tamanho de poro definido para proporcionar lipossomas com o diâmetro desejado. Os fragmentos Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados com os lipossomas como descrito em Martin *et al.* J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) através de uma reação de intercâmbio de dissulfureto. Um agente quimioterapêutico é opcionalmente contido dentro do lipossoma. Veja-se Gabizon *et al.* J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

D. Vetores, células hospedeiras e métodos recombinantes

A invenção também proporciona ácidos nucleicos isolados que codificam um anticorpo como divulgado no presente documento, vetores e células hospedeira que compreendem o ácido nucleico, e técnicas recombinantes para a produção do anticorpo.

Para a produção recombinante do anticorpo, o ácido nucleico codificante é isolado e inserido num vetor replicável para clonagem adicional (amplificação do ADN) ou para expressão. O ADN que codifica o anticorpo é prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (por exemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam o anticorpo). Estão disponíveis muitos vetores. Os componentes do vetor normalmente incluem, mas não são limitados a, um ou mais dos seguintes: uma sequência sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento potenciador, um promotor, uma sequência de terminação da transcrição.

(i) Componente da sequência sinal

O anticorpo multivalente pode ser produzido de forma recombinante, não apenas diretamente, mas também como um polipéptido de fusão com um polipéptido heterólogo, que é preferentemente uma sequência sinal ou outro polipéptido com um sítio de clivagem específico no terminal N da proteína ou polipéptido maduro. A sequência sinal heteróloga selecionada, é preferentemente, uma que é reconhecida e processada (isto é, clivada por uma peptidase sinal) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procariotas que não reconhecem nem processam a sequência sinal do anticorpo multivalente nativo, a sequência sinal é substituída por uma sequência sinal procariota selecionada, por exemplo, a partir do grupo de líderes da fosfatase alcalina, penicilase, Ipp, ou de enterotoxina termoestável II. Para a secreção de leveduras a sequência sinal nativa pode ser substituída por, por exemplo, pelo líder de invertase de levedura, líder do fator α (incluindo os líderes dos fatores α de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*), ou líder da fosfatase ácida, o líder da glucosamilase de *C. albicans*, ou o sinal descrito no documento WO 90/13646. Na expressão de células de mamífero, as sequências sinal de mamífero, bem como os líderes de secreção virais, por exemplo, o sinal gD de herpes simplex, estão disponíveis.

O ADN para tal região precursora é ligado num quadro de leitura ao ADN que codifica o anticorpo multivalente.

(ii) *Componente de origem de replicação*

Tanto os vetores de expressão como de clonagem contêm uma sequência de ácidos nucleicos que permite que o vetor se replique numa ou mais células hospedeiras selecionadas. Geralmente, nos vetores de clonagem esta sequência é uma que permite que o vetor se replique independentemente do ADN cromossômico do hospedeiro, e inclui origens de replicação ou sequências de replicação autônoma. 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 leveduras, e várias origens virais (SV40, políoma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para a clonagem de vetores em células de mamíferos. No geral, o componente de origem de replicação não é necessário para vetores de expressão de mamífero (a origem de SV40 pode tipicamente ser utilizada apenas porque contém o promotor precoce).

(iii) Componente do gene de seleção

Os vetores de expressão e clonagem podem conter um gene de seleção, também designado marcador selecionável. Os genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos e outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos, por exemplo, o gene que codifica a D-alanina racemase para *Bacillus*.

Um exemplo de um esquema de seleção utiliza um fármaco para deter o crescimento de uma célula hospedeira. Aquelas células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem uma proteína que confere resistência a fármacos e assim sobrevivem ao regime de seleção. Os exemplos de tal seleção dominante utilizam os fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Outro exemplo de marcadores selecionáveis adequados para células de mamífero são aqueles que permitem a identificação de células competentes para incorporar o ácido nucleico do anticorpo multivalente, tais como DHFR, timidina quinase, metalotioneína-I e -II, preferentemente genes de metalotioneína de primata, adenosina desaminase, ornitina descarboxilase, etc.

Por exemplo, as células transformadas com o gene de seleção DHFR são, primeiro, identificadas por cultura de todos os transformantes num meio de cultura que contém

metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada aquando da utilização de DHFR de tipo selvagem é a linha de células de ovário de hamster chinês (CHO) deficiente em atividade de DHFR.

Alternativamente, as células hospedeiras (particularmente hospedeiras de tipo selvagem que contêm DHFR endógena) transformadas ou cotransformadas com sequências de ADN que codificam um anticorpo multivalente, proteína DHFR do tipo selvagem, e um outro marcador selecionável, tal como aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase (APH), podem ser selecionadas por crescimento celular em meio contendo um agente de seleção para o marcador selecionável, tal como um antibiótico aminoglicosídeo, por exemplo, canamicina, neomicina, ou G418. Veja-se o documento de patente U.S. N.º 4.965.199.

Um gene de seleção adequado para utilização em leveduras é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)). O gene *trp1* proporciona um marcador de seleção para uma estirpe mutante de levedura que carece da atividade para 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 a deteção de transformação através do crescimento na ausência de triptofano. De forma semelhante, as estirpes de levedura deficientes em Leu2 (ATCC 20.622 or 38.626) são complementadas por plasmídeos conhecidos que carregam o gene *Leu2*.

Adicionalmente, vetores derivados a partir do plasmídeo circular pKD1 de 1,6 kb podem ser utilizados para a transformação de leveduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, um sistema de expressão para produção a larga escala de quimosina de bezerro recombinante foi relatado para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990). Vetores de expressão multicópias estáveis

para a secreção de albumina sérica humana madura através de estirpes industriais de *Kluyveromyces* também foram divulgados. Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991).

(iv) *Componente promotor*

Os vetores de expressão e clonagem contêm normalmente um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operativamente ligado ao ácido nucleico do anticorpo multivalente. Promotores adequados para utilização com hospedeiros procariotas incluem o promotor *phoA*, os sistemas promotores de β -lactamase e lactose, fosfatase alcalina, um sistema de promotor de triptofano (*trp*) e promotores híbridos tais como o promotor *tac*. Contudo, outros promotores bacterianos conhecidos são adequados. Os promotores para utilização em sistemas bacterianos também conterão uma sequência de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente ligada ao ADN que codifica o anticorpo multivalente.

Sequências de promotores são conhecidas para eucariotas. Virtualmente, todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases a montante do sítio onde a transcrição é iniciada. Uma outra sequência encontrada 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT onde N pode ser qualquer nucleótido. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucarióticos está uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para a adição da cauda poli-A à extremidade 3' da sequência de codificação. Todas estas sequências são adequadamente inseridas em vetores de expressão eucarióticos.

Exemplos de sequências promotoras adequadas para utilização 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, fosfoglucoose isomerase e glucoquinase.

Outros promotores de levedura, que são promotores induzíveis tendo a vantagem adicional de transcrição controlada por condições de crescimento, são as regiões promotoras para a álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas com o metabolismo do azoto, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, e enzimas responsáveis para utilização de maltose e galactose. Os vetores e promotores adequados para utilização na expressão de leveduras são descritos adicionalmente em EP 73.657. Os potenciadores de levedura são vantajosamente utilizados com promotores de levedura.

A transcrição do anticorpo multivalente a partir de vetores em células hospedeiras de mamíferos é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir de genomas de vírus como poliomavírus, vírus da varíola aviária, adenovírus (tal como Adenovírus 2), papilomavírus bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e mais preferentemente o Vírus Símio 40 (SV40), a partir de promotores de mamífero heterólogos, por exemplo, o promotor da actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, desde que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas da célula hospedeira.

Os promotores precoce e tardio do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição de SV40 que também contém a origem de replicação viral de SV40. O promotor precoce imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição HindIII E. Um sistema para expressar ADN em hospedeiros mamíferos utilizando o papilomavírus bovino como um vetor é divulgado no documento de patente U.S. N.º 4.419.446. Uma

modificação deste sistema é descrita no documento de patente U.S. N.º 4.601.978. Veja-se também Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982) sobre a expressão do ADNc de β -interferão humano em células de ratinho sob o controlo de um promotor de timidina quinase a partir do vírus de herpes simplex. Alternativamente, a repetição terminal longa do vírus do sarcoma de Rous pode ser utilizada como o promotor.

(v) *Componente de elemento potenciador*

A transcrição do ADN que codifica o anticorpo multivalente desta invenção por eucariotas superiores é frequentemente aumentada inserindo uma sequência potencializadora no vetor. Muitas sequências potenciadoras são agora conhecidas de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina). Tipicamente, contudo, utilizar-se-á um potenciador de um vírus de células eucarióticas. Exemplos incluem o potenciador do SV40 na última parte da origem de replicação (100-270 pb), o potenciador do promotor inicial de citomegalovírus, o potenciador de polioma na última parte da origem de replicação e potenciadores de adenovírus. Veja-se também Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para ativação de promotores eucarióticos. O potencializador pode ser unido por *splicing* no vetor numa posição 5' ou 3' em relação à sequência de codificação do anticorpo multivalente, mas é preferentemente localizado num sítio a 5' do promotor.

(vi) *Componente de terminação da transcrição*

Os vetores de expressão utilizados nas células hospedeiras eucarióticas (de leveduras, fungícas, de inseto, vegetais, animais, de ser humano, ou células nucleadas a partir de outros organismos multicelulares) irão também conter sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilização do ARNm. Tais sequências estão normalmente disponíveis a partir das

regiões não traduzidas 5' e, ocasionalmente, 3', de ADN ou ADNc eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do ARNm que codifica o anticorpo multivalente. Um componente de terminação da transcrição útil é a região de poliadenilação da hormona de crescimento bovina. Veja-se o documento WO 94/11026 e o vetor de expressão divulgado neste.

(vii) *Seleção e transformação de células hospedeiras*

Células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão do ADN nos vetores do presente documento são as células procariotas, leveduras ou células eucariotas superiores descritas acima. Procariotas adequados para este propósito incluem eubactérias, tais como organismos Gram-negativos e Gram-positivos, por exemplo, *Enterobacteriaceae* tais como *Escherichia*, por exemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por exemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por exemplo, *Serratia marcescans*, e *Shigella*, bem como *Bacillus* tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41 P divulgado em DD 266.710 publicado em 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. Um hospedeiro de clonagem de *E. coli* preferido é *E. coli* 294 (ATCC 31.446), embora outras estirpes como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) e *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) sejam adequadas. Estes exemplos são ilustrativos, em vez de limitantes.

Adicionalmente aos procariotas, os micróbios eucariotas tais como fungos filamentosos ou leveduras são hospedeiros de expressão ou clonagem adequados para os vetores que codificam o anticorpo multivalente. *Saccharomyces cerevisiae*, ou a levedura de padeiro comum, é o mais comumente utilizado entre os microrganismos hospedeiros eucariotas inferiores. Contudo, uma série de outros géneros, espécies, e estirpes estão comumente

disponíveis e são úteis no presente documento, como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedeiros de *Kluyveromyces* como, por exemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* e *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* como *Schwanniomyces occidentalis*; e fungos filamentosos como, por exemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, e hospedeiros de *Aspergillus* como *A. nidulans* e *A. niger*.

As células hospedeiras adequadas para a expressão do anticorpo multivalente glicosilado são derivadas a partir de organismos multicelulares. Exemplos de células de invertebrado incluem células vegetais e de insetos. Numerosas estirpes e variantes de baculovírus e células hospedeiras de insetos permissivas correspondentes de hospedeiros tais como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), e *Bombyx mori* foram identificadas. Uma variedade de estirpes virais para a transfeção estão publicamente disponíveis, por exemplo, 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 os vírus do presente documento de acordo com a presente invenção, particularmente para transfeção de células de *Spodoptera frugiperda*.

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

Contudo, o interesse tem sido maior para células de vertebrados, e a propagação de células de vertebrados em cultura (cultura de tecidos) tornou-se um procedimento de rotina. Exemplos de linhas celulares de hospedeiros mamíferos úteis são a linha CV1 de rim de macaco

transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim embrionário humano (293 ou células 293 subclonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de rim de hamster bebê (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 do colo do útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de ratazana 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 G2) e células de mieloma ou linfoma (por exemplo, células Y0, J558L, P3 e NS0) (veja-se o documento de patente U.S. N.º 5.807.715).

As células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão ou clonagem para a produção dos anticorpos multivalentes descritos acima, e cultivadas em meios nutritivos convencionais modificados como apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes, ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas.

(viii) Cultura das células hospedeiras

As células hospedeiras usadas para produzir o anticorpo multivalente desta invenção podem ser cultivadas numa variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis tais como F10 de Ham (Sigma), Meio Essencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e meio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) são adequados para a 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), documentos de patente U.S. N.ºs 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655 ou 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195 ou documento de patente U.S. Re. 30.985 podem ser utilizados como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios podem ser suplementados conforme necessário com hormonas e/ou outros fatores de crescimento (como insulina, transferrina, ou fator de crescimento epidérmico), sais (como cloreto de sódio, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões (como HEPES), nucleótidos (como adenosina e timidina), antibióticos (como fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compostos inorgânicos normalmente presentes em concentrações finais no intervalo micromolar), e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos em concentrações apropriadas que seriam conhecidas pelos peritos na especialidade. As condições de cultura, tais como temperatura, pH, e semelhantes, são aquelas previamente utilizadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e serão aparentes para o perito na especialidade.

(ix) *Purificação*

Ao utilizar técnicas recombinantes, o anticorpo multivalente pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplásmico, ou ser diretamente secretado para o meio. Se o anticorpo multivalente for produzido intracelularmente, como uma primeira etapa, os detritos particulados, sejam células hospedeiras ou fragmentos lisados, são removidos, 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 secretados para o espaço periplásmico de *E. coli*. Resumidamente, pasta celular é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA, e fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF)

durante cerca de 30 min. Os detritos celulares podem ser removidos por centrifugação. Quando o anticorpo multivalente é secretado para o meio, os sobrenadantes de tais sistemas de expressão são geralmente primeiro concentrados utilizando um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de proteases, tal como PMSF, pode ser incluído em qualquer das etapas anteriores para inibir a proteólise e podem ser incluídos antibióticos para prevenir o crescimento de contaminantes adventícios.

A composição do anticorpo multivalente preparada a partir das células pode ser purificada utilizando, por exemplo, cromatografia de hidroxilapatite, eletroforese em gel, diálise e cromatografia de afinidade, com a cromatografia de afinidade sendo a técnica de purificação preferida. A adequabilidade da proteína A como um ligando de afinidade depende da espécie e isotipo de qualquer região Fc de imunoglobulina que esteja presente no anticorpo multivalente. A proteína A pode ser utilizada para purificar anticorpos que estão baseados nas cadeias pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ ou $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isotipos de ratinho e para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligando de afinidade está ligado é, muito frequentemente, agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis, tais como vidro de porosidade controlada ou poli(estireno-divinil)benzeno, permitem taxas de fluxo mais rápidas e tempos de processamento mais curtos que os que podem ser alcançados com agarose. Quando o anticorpo multivalente compreende um domínio CH3, a resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação proteica tais como fracionamento numa coluna de permuta iônica,

precipitação com etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina-SEPHAROSE™, cromatografia numa resina de permuta aniônica ou catiônica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatofocagem, SDS-PAGE, e precipitação com sulfato de amônio, estão também disponíveis dependendo do anticorpo multivalente a ser recuperado.

E. Formulações farmacêuticas

Formulações terapêuticas do anticorpo multivalente são preparadas para armazenamento através de mistura do anticorpo multivalente que têm o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes opcionais farmacêuticamente aceitáveis (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980)), sob a forma de soluções aquosas, formulações liofilizadas ou outras secas. Veículos, excipientes, ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os recetores nas dosagens e concentrações empregues, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, butilo ou álcool benzílico; parabenos de alquilo tais como parabeno de metilo ou propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixa massa molecular (menos do que 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros hidratos de carbono incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de

Zn-proteína); e/ou tensioativos não iônicos tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietilenoglicol (PEG).

A formulação no presente documento também pode conter mais de um composto ativo conforme for necessário para a indicação particular a ser tratada, preferentemente aqueles que têm atividades complementares que não se afetam de forma adversa entre si. Exemplos de combinações de compostos ativos são proporcionados na Secção G abaixo intitulada "Utilizações *in vivo* para o anticorpo multivalente". Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido.

Os ingredientes ativos também podem ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de administração de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microsferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980).

As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente conseguido por filtração através de membranas de filtração estéreis.

Podem ser preparadas preparações de libertação sustentada. Exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo multivalente, cujas matrizes estão sob a forma de artigos moldados, por exemplo, películas ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), ou poli(álcool vinílico)), polilácticos (documento de patente

N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ etil-L-glutamato, vinilacetato de etileno não degradável, copolímeros degradáveis de ácido glicólico-ácido láctico tais como o LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Enquanto polímeros tais como etileno vinilo acetato e ácido láctico-ácido glicólico possibilitam a libertação de moléculas durante mais de 100 dias, determinados hidrogéis libertam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando os anticorpos encapsulados permanecem no corpo durante um período de tempo longo, elas podem desnaturar-se ou agregar-se como um resultado da exposição à humidade a 37 °C, resultando numa perda de atividade biológica e possíveis alterações na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser concebidas para a estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se se descobre que o mecanismo de agregação consiste na formação de ligações S-S intermoleculares através do intercâmbio de tio-dissulfureto, a estabilização pode ser alcançada através da modificação dos resíduos de sulfidril, liofilização de soluções ácidas, controlo do teor de humidade, utilização de aditivos apropriados e desenvolvimento de composições de matriz polimérica específicas.

F. Utilizações não terapêuticas para o anticorpo multivalente

O anticorpo multivalente da invenção pode ser utilizado como um agente de purificação de afinidade. Neste processo, o anticorpo multivalente é imobilizado sobre uma fase sólida como resina Sephadex ou papel de filtro, utilizando métodos bem conhecidos na técnica. O anticorpo multivalente imobilizado é colocado em contacto com uma amostra que contém o antigénio a ser purificado e, posteriormente, o suporte é lavado com um solvente adequado

que removerá substancialmente todo o material na amostra exceto o antigénio a ser purificado, que está ligado ao anticorpo multivalente imobilizado. Finalmente, o suporte é lavado com outro solvente adequado, como tampão de glicina, pH 5,0, que libertará o antigénio a partir do anticorpo multivalente.

O anticorpo multivalente também pode ser útil em ensaios de diagnóstico, por exemplo, para detetar a expressão de um antigénio de interesse em células, tecidos ou soro específicos.

Para aplicações diagnósticas, o anticorpo multivalente tipicamente será marcado com uma fração detetável. Numerosos marcadores estão disponíveis, os quais podem ser geralmente agrupados nas seguintes categorias:

(a) Radioisótopos, como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I . O anticorpo multivalente pode ser marcado com o radioisótopo utilizando as técnicas descritas em *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 e 2, Coligen et al., Ed. Wiley- Interscience, Nova Iorque, Nova Iorque, Pubs. (1991), por exemplo, e a radioatividade pode ser medida utilizando contagem de cintilação.

(b) Marcadores fluorescentes como quelatos de terras raras (quelatos de európio) ou fluoresceína e os seus derivados, rodamina e os seus derivados, dansilo, Lissamina, ficoeritrina e vermelho do Texas estão disponíveis. Os marcadores fluorescentes podem ser conjugados com o anticorpo multivalente utilizando as técnicas divulgadas em *Current Protocols in Immunology*, *supra*, por exemplo. A fluorescência pode ser quantificada utilizando um fluorímetro.

(c) Vários marcadores de enzima-substrato estão disponíveis e o documento de patente U.S. N.º 4.275.149 proporciona uma revisão sobre alguns deles. A enzima geralmente catalisa uma alteração química do

substrato cromogénico que pode ser medida usando várias técnicas. Por exemplo, a enzima pode catalisar uma mudança de cor num substrato, que pode ser medida por espectrofotometria. Alternativamente, a enzima pode alterar a fluorescência ou a quimioluminiscência do substrato. As técnicas para quantificar uma alteração na fluorescência são descritas acima. O substrato quimioluminiscente torna-se eletronicamente excitado por uma reação química e pode então emitir luz que pode ser medida (usando um quimioluminómetro, por exemplo) ou doa energia para um aceitador fluorescente. Exemplos de marcadores enzimáticos incluem luciferases (por exemplo, luciferase de pirilampo e luciferase bacteriana; o documento de Patente U.S. N° 4.737.456), a luciferina, 2,3-diidroftalazinodionas, malato desidrogenase, urease, peroxidase como peroxidase de rábano (HRPO), fosfatase alcalina, β -galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacarídeo oxidases (por exemplo, glucose oxidase, galactose oxidase, e glucose-6-fosfato desidrogenase), oxidases heterocíclicas (como uricase e xantina oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase e semelhantes. As técnicas para conjugar enzimas a anticorpos são descritas em O'Sullivan et al., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (ed J. Langone e H. Van Vunakis), Academic press, Nova Iorque, 73:147-166 (1981).

Exemplos de combinações de enzima-substrato incluem, por exemplo:

(i) peroxidase de rábano (HRPO) com hidrogeno peroxidase como substrato, em que a hidrogeno peroxidase oxida um precursor de corante (por exemplo, ortofenilenodiamina (OPD) ou cloridrato de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB));

- (ii) fosfatase alcalina (AP) com fosfato de para-nitrofenilo como substrato cromogénico e
- (iii) β -D-galactosidase (β -D-Gal) com um substrato cromogénico (por exemplo, P-nitrofenil- β -D-galactosidase) ou substrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidase.

Numerosas outras combinações enzima-substrato estão disponíveis para os peritos na especialidade. Para uma revisão geral destes, vejam-se os documentos de patente U.S. N.ºs 4.275.149 e 4.318.980.

Algumas vezes, o marcador é indiretamente conjugado com o anticorpo multivalente. O perito na especialidade conhecerá várias técnicas para alcançar este efeito. Por exemplo, O anticorpo multivalente pode ser conjugado com biotina e qualquer uma das três grandes categorias de marcadores mencionados acima pode ser conjugada com avidina, ou vice-versa. A biotina liga-se seletivamente à avidina e, portanto, o marcador pode ser conjugado com o anticorpo multivalente desta maneira indireta. Alternativamente, para alcançar a conjugação indireta do marcador com o anticorpo multivalente, o anticorpo multivalente é conjugado com um pequeno hapteno (por exemplo, digoxina) e um dos diferentes tipos de marcadores mencionados acima é conjugado com um anticorpo multivalente anti-hapteno (por exemplo, anticorpo anti-digoxina). Assim, pode ser conseguida a conjugação indireta do marcador com o anticorpo multivalente.

Noutra forma de realização da invenção, o anticorpo multivalente não tem de ser marcado, e a presença do mesmo pode ser detetada utilizando um anticorpo marcado que se liga ao anticorpo multivalente.

O anticorpo multivalente da presente invenção pode ser empregue num método de ensaio conhecido, como ensaios de ligação competitivos, ensaios de tipo *sandwich* diretos e indiretos e ensaios de imunoprecipitação. Zola, Monoclonal

Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

O anticorpo multivalente pode também ser utilizado para ensaios diagnósticos *in vivo*. No geral, o anticorpo multivalente é marcado com um radionuclídeo (como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P ou ^{35}S) de modo que o antígeno ou células que o expressam se podem localizar utilizando imunocintigrafia.

F. Utilizações *in vivo* para o anticorpo multivalente

Contempla-se que o anticorpo multivalente divulgado no presente documento possa ser utilizado para tratar um mamífero, por exemplo, um paciente que padece de, ou é predisposto a, uma doença ou distúrbio que poderia beneficiar-se da anticorpo multivalente.

Quando o anticorpo se liga a um recetor ErbB, como HER2, as condições a serem tratadas com o mesmo incluem tumores benignos ou malignos; leucemias e neoplasias malignas linfoides; outros distúrbios como distúrbios neuronais, gliais, astrocíticos, hipotalâmicos, glandulares, macrofágicos, epiteliais, estromais, blastocéllicos, inflamatórios, angiogénicos e imunológicos. No geral, a doença ou distúrbio a ser tratado com o anticorpo que se liga a um recetor ErbB é cancro.

Exemplos de cancro a serem tratados no presente documento incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemina ou neoplasias malignas linfoides. Exemplos mais particulares de tais cancros incluem cancro de células escamosas, cancro de pulmão incluindo cancro pulmonar de células pequenas, cancro pulmonar de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão, cancro do peritонеu, cancro hepatocelular, cancro gástrico ou do estômago incluindo cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro do colo do útero, cancro ovárico, cancro do fígado, cancro da bexiga, hepatoma, cancro da

mama, cancro de cólon, cancro colorretal, carcinoma do endométrio ou do útero, carcinoma das glândulas salivares, cancro de rim ou renal, cancro do fígado, cancro de próstata, cancro da vulva, cancro da tiroide, carcinoma hepático bem como cancro da cabeça e pescoço.

O cancro irá compreender, no geral, células que expressam um antigénio ligado pelo anticorpo, de modo que o anticorpo é capaz de se ligar ao cancro. Numa forma de realização, o cancro pode ser caracterizado por superexpressão do antigénio (por exemplo, superexpressão de um recetor ErbB). Para determinar a expressão do antigénio pelo cancro, estão disponíveis vários ensaios de diagnóstico/prognóstico. Numa forma de realização, a superexpressão do antigénio pode ser analisada por IHC, por exemplo, utilizando o HERCEPTEST® (Dako) onde o antigénio é HER2. No teste de ICH de HER2, secções de tecido incorporadas em parafina a partir de uma biopsia tumoral podem ser submetidas ao ensaio de IHC e podem-lhe ser conferidos critérios de intensidade de coloração da proteína HER2 do seguinte modo:

Pontuação não é observada qualquer coloração ou coloração
0 de membrana em menos de 10 % das células tumorais.

Pontuação uma coloração ligeira/quase impercetível da
1+ membrana é detetada em mais de 10 % das células tumorais. As células são apenas coradas em parte da sua membrana.

Pontuação é observada uma coloração fraca a moderada
2+ completa da membrana em mais de 10 % das células tumorais.

Pontuação é observada uma coloração moderada a forte
3+ completa da membrana em mais de 10 % das células tumorais.

Aqueles tumores com pontuações 0 ou 1+ para a avaliação da superexpressão de HER2 podem ser

caracterizados como não superexpressando HER2, enquanto os tumores com pontuações 2+ ou 3+ podem ser caracterizados como superexpressando HER2.

Como alternativa, ou adicionalmente, os ensaios FISH como o INFORM™ (vendido por Ventana, Arizona) ou PATHVISION™ (Vysis, Illinois) podem ser levados a cabo em tecido fixado com formalina, incorporado em parafina para determinar a extensão (se existir) da superexpressão do antígeno por parte do tumor.

Numa forma de realização, o cancro será um que expressa (e pode superexpressar) um recetor ErbB selecionado a partir do grupo que consiste em EGFR, ErbB3 e ErbB4. Exemplos de cancros que podem expressar/superexpressar EGFR, ErbB3 ou ErbB4 incluem cancro celular escamoso, cancro de pulmão incluindo cancro pulmonar de células pequenas, cancro pulmonar de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão, cancro do peritонеu, cancro hepatocelular, cancro gástrico ou do estômago incluindo cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro do colo do útero, cancro ovárico, cancro do fígado, cancro da bexiga, hepatoma, cancro da mama, cancro de cólon, cancro colorretal, carcinoma do endométrio ou do útero, carcinoma das glândulas salivares, cancro de rim ou renal, cancro do fígado, cancro de próstata, cancro da vulva, cancro da tiroide, carcinoma hepático bem como cancro de cabeça e pescoço bem como glioblastomas.

O cancro a ser tratado no presente documento pode ser um caracterizado por ativação excessiva de um recetor ErbB, por exemplo, EGFR. Tal ativação excessiva pode ser atribuível à superexpressão ou produção aumentada do recetor ErbB ou de um ligando de ErbB. Numa forma de realização da invenção, um ensaio de diagnóstico ou prognóstico será realizado para determinar se o cancro do paciente é caracterizado pela ativação excessiva de um

recetor ErbB. Por exemplo, a amplificação do gene ErbB e/ou superexpressão de um recetor ErbB no cancro pode ser determinada. Vários ensaios para determinar tal amplificação/superexpressão estão disponíveis na técnica e incluem os ensaios de IHC, FISH e de antigénios libertados descritos acima. De forma alternativa, ou adicionalmente, os níveis de ligando de ErbB, como TGF-alfa, no tumor ou associados com ele podem ser determinados de acordo com procedimentos conhecidos. Tais ensaios podem detetar proteínas e/ou ácidos nucleicos que o codificam na amostra a ser testada. Numa forma de realização, os níveis de ligando de ErbB no tumor podem ser determinados utilizando imunohistoquímica (IHC); veja-se, por exemplo, Scher *et al.* Clin. Cancer Research 1:545-550 (1995). Alternativamente, ou adicionalmente, é possível avaliar os níveis de ácidos nucleicos que codificam o ligando de ErbB na amostra a ser testada; por exemplo, através de técnicas de hibridação *in situ* fluorescente ou FISH, *southern blot* e de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Além disso, a superexpressão ou amplificação do recetor ErbB ou ligando de ErbB pode ser avaliada utilizando um ensaio de diagnóstico *in vivo*, por exemplo, através da administração de uma molécula (como um anticorpo) que se liga à molécula a ser detetada e é marcado com um marcador detetável (por exemplo, um isótopo radioativo) e rastreando externamente o paciente quanto à localização do marcador.

Quando o anticorpo se liga a um antigénio de superfície de células B, o anticorpo pode ser utilizado para tratar um linfoma de células B (incluindo linfoma não Hodgkin de baixo grau/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeno (SL); NHL de grau intermédio/folicular; NHL de grau intermédio difuso; NHL de grau elevado imunoblástico; NHL de grau elevado linfoblástico; NHL de grau elevado de células pequenas não clivadas; NHL de doença volumosa;

linfoma de células do manto; linfoma relacionado com SIDA e macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crônica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas e leucemia mieloblástica crônica; e distúrbio linfoproliferativo pós-transplante (PTLD).

O anticorpo, por exemplo, o anticorpo anti-antigénio de superfície de células B, também pode ser utilizado para tratar uma doença autoimune. Exemplo de distúrbios ou doenças autoimunes incluem, mas não são limitados a, respostas inflamatórias tais como doenças inflamatórias da pele incluindo psoríase e dermatite (por exemplo, dermatite atópica); esclerodermia sistémica e esclerose; respostas associadas à doença intestinal inflamatória (tal como doença de Crohn e colite ulcerativa); síndrome do desconforto respiratório (incluindo síndrome do desconforto respiratório em adultos; SDRA); dermatite; meningite; encefalite; uveíte; colite; glomerulonefrite; condições alérgicas tais como eczema e asma e outras condições patológicas envolvendo infiltração de células T e respostas inflamatórias crónicas; aterosclerose; deficiência de adesão de leucócitos; artrite reumatoide; lúpus eritematoso sistémico (LES); diabetes mellitus (por exemplo, diabetes mellitus do tipo I ou diabetes mellitus dependente de insulina); esclerose múltipla; síndrome de Reynaud; tiroidite autoimune; encefalomielite alérgica; síndrome de Sjogren; diabetes de aparição juvenil; e respostas imunes associadas com hipersensibilidade aguda e retardada mediada por citocinas e linfócitos T tipicamente encontrados em tuberculose, sarcoidose, polimiosite, granulomatose e vasculite; anemia perniciosa (doença de Addison); doenças que envolvem a diapedese leucocitária; distúrbio inflamatório do sistema nervoso central (SNC); síndrome de lesão de múltiplos órgãos; anemia hemolítica (incluindo, mas não limitada a crioglobulinemia ou anemia positiva de Coombs); miastenia gravis; doenças mediadas por complexos

antigénio-anticorpo; doença de membrana basal anti-glomerular; síndrome antifosfolipídica; neurite alérgica; doença de Graves; síndrome miasténica de Lambert-Eaton; penfigoide bulhoso; pênfigo; poliendocrinopatias autoimunes; doença de Reiter; síndrome da pessoa rígida; doença de Behcet; arterite de células gigantes; nefrite por complexos imunes; nefropatia por IgA; polineuropatias por IgM; púrpura trombocitopénica imune (ITP) ou trombocitopenia autoimune, etc.

Os anticorpos direcionados contra antigénios de superfície de células B também podem ser utilizados para bloquear uma resposta imunitária contra um antigénio exógeno. Por antigénio exógeno aqui entende-se uma molécula ou moléculas que não é/são endógenas ou nativas de um mamífero que é exposto a elas. O antigénio exógeno pode desencadear uma resposta imunitária, por exemplo, uma resposta mediada por células T e/ou humoral no mamífero. No geral, o antigénio exógeno provocará a produção de anticorpos contra ele. Exemplos de antigénios exógenos contemplados no presente documento incluem agentes terapêuticos imunogénicos, por exemplo, proteínas como anticorpos, particularmente anticorpos que compreendem resíduos de aminoácidos não humanos (por exemplo, anticorpos de roedor, quiméricos/humanizados e anticorpos primatizados); toxinas (opcionalmente conjugadas com uma molécula de direcionamento como um anticorpo, em que a molécula de direcionamento também pode ser imunogénica); vetores virais de terapêutica génica, como retrovírus e adenovírus; enxertos; agentes infecciosos (por exemplo, bactérias e vírus); aloantigénios (ou seja, um antigénio que ocorre em alguns, mas não todos os membros da mesma espécie) como diferenças nos tipos sanguíneos, antigénios linfocitários humanos (HLA), antigénios de plaquetas, antigénios expressos em órgãos transplantados, componentes sanguíneos, fatores de gravidez (Rh) e hemofílicos (por

exemplo, Fator VIII e Fator IX).

O anticorpo anti-antigénio de superfície de células B também pode ser utilizado para dessensibilizar um mamífero que aguarda um transplante.

Os anticorpos direcionados contra um recetor numa superfamília de recetor de TNF pode ser empregue para ativar ou estimular a apoptose em células cancerosas.

Em determinadas formas de realização, um imunoconjugado que compreende o anticorpo conjugado com um agente citotóxico é administrado ao paciente. Preferentemente, o imunoconjugado e/ou antigénio ao qual está ligado/são internalizados pela célula, resultando numa eficácia terapêutica aumentada do imunoconjugado na morte das células cancerosas ao qual se liga. Numa forma de realização preferida, o agente citotóxico atua sobre ou interfere com o ácido nucleico na célula cancerosa. Exemplos de tais agentes citotóxicos incluem quaisquer dos agentes quimioterapêuticos indicados no presente documento (como um maitansinoide ou uma caliqueamicina), um isótopo radioativo, ou uma ribonuclease ou uma ADN endonuclease. Conforme indicado acima, o anticorpo multivalente também pode ser utilizado para ADEPT.

O presente pedido contempla a combinação do anticorpo multivalente (ou imunoconjugado do mesmo) com um ou mais agentes terapêuticos, especialmente para o tratamento de cancro. Por exemplo, o anticorpo multivalente pode ser coadministrado com outro anticorpo multivalente (ou anticorpos multivalentes), um anticorpo (ou anticorpos) monovalentes ou bivalentes, um ou mais agentes quimioterapêuticos (incluindo cocktails de agentes quimioterapêuticos), outro(s) agente(s) citotóxico(s), um ou mais agentes antiangiogénicos, citocinas, e/ou um ou mais agentes inibidores do crescimento. Quando o anticorpo multivalente induz a apoptose, pode ser particularmente desejável combinar o anticorpo multivalente com um ou mais

outro(s) agente(s) terapêutico(s) que também induz(em) a apoptose. Por exemplo, os anticorpos pró-apoptóticos (por exemplo, anticorpos bivalentes ou multivalentes) direcionados contra antigénios da superfície de células B (por exemplo, anticorpos anti-CD20 RITUXAN®, ZEVALIN® ou BEXXAR®) podem ser combinados com (1) anticorpos pró-apoptóticos (por exemplo, anticorpos bivalentes ou multivalentes direcionados contra um recetor na superfamília de recetores de TNF, como anticorpos anti-DR4 ou anti-DR5) ou (2) com citocinas na família de citocinas de TNF (por exemplo, Apo2L). Igualmente, anticorpos anti-ErbB (por exemplo, anticorpo anti-HER2 HERCEPTIN®) podem ser combinados com (1) e/ou (2). De forma alternativa, ou adicionalmente, o paciente pode receber terapêutica de radiação combinada (por exemplo, irradiação com feixe externo ou terapêutica com um agente radioativo marcado, como um anticorpo). Tais terapêuticas combinadas indicadas acima incluem a administração combinada (onde os dois ou mais agentes são incluídos na mesma formulação ou em formulações separadas), e a administração separada, em cujo caso, a administração do anticorpo multivalente pode ocorrer antes, e/ou depois, da administração da terapêutica ou terapêuticas adjuntas.

O anticorpo multivalente (e agente de terapêutica adjunta) é/são administrados através de quaisquer meios adequados, incluindo administração parentérica, subcutânea, intraperitonal, intrapulmonar e intranasal, e, se desejada para tratamento local, administração intralesional. As infusões parentéricas incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitonal, ou subcutânea. Adicionalmente, o anticorpo multivalente é adequadamente administrado por infusão de pulsos, particularmente com doses decrescentes do anticorpo multivalente. Preferentemente a dosagem é dada por injeções, mais preferentemente injeções intravenosas ou subcutâneas,

dependendo em parte de se a administração é breve ou crônica.

Além da administração da proteína de anticorpo ao paciente, o presente pedido contempla a administração do anticorpo por terapêutica gênica. Tal administração de um ácido nucleico que codifica o anticorpo é englobada pela expressão administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo. Veja-se, por exemplo, o documento WO96/07321 publicado a 14 de março de 1996 relacionado com a utilização de terapêutica gênica para gerar anticorpos intracelulares.

Existem duas principais abordagens para colocar o ácido nucleico (opcionalmente contido num vetor) dentro das células do paciente; *in vivo* e *ex vivo*. Para a administração *in vivo* o ácido nucleico é administrado diretamente no paciente, normalmente no sítio onde o anticorpo é necessário. Para o tratamento *ex vivo*, as células do paciente são removidas, o ácido nucleico é introduzido nestas células isoladas e as células modificadas são administradas ao paciente seja diretamente ou, por exemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que são implantadas no paciente (veja-se, por exemplo, os documentos de patente U.S. n.ºs 4.892.538 e 5.283.187). Existe uma variedade de técnicas disponíveis para introduzir ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo de se o ácido nucleico é transferido para células cultivadas *in vitro*, ou *in vivo* nas células do hospedeiro pretendido. Técnicas adequadas para a transferência de ácidos nucleicos para células de mamífero *in vitro* incluem a utilização de lipossomas, eletroporação, microinjeção, fusão celular, DEAE-dextrano, o método de precipitação de fosfato de cálcio, etc. Um vetor comumente utilizado para a administração *ex vivo* do gene é um retrovírus. As técnicas de transferência de ácidos nucleicos *in vivo* atualmente preferidas incluem a

transfecção com vetores virais (como adenovírus, vírus herpes simplex I, ou vírus adeno-associados) e sistemas à base de lípidos (lípidos úteis para a transferência mediada por lípidos do gene são DOTMA, DOPE e DC-Chol, por exemplo). Em algumas situações é desejável proporcionar à fonte de ácidos nucleicos um agente que se dirija às células alvo, como um anticorpo específico para uma proteína da superfície da membrana celular ou para a célula alvo, um ligando para um recetor sobre a célula alvo, etc. Quando são empregues lipossomas, proteínas que se ligam a uma proteína da superfície da membrana celular associada com a endocitose podem ser utilizadas para direccionar e/ou facilitar a captação, por exemplo, proteínas da cápside ou fragmentos das mesmas, trópicas para um tipo celular particular, anticorpos para proteínas que passam por internalização na ciclagem, e proteínas que direccionam a localização intracelular e potenciam a semivida intracelular. A técnica de endocitose mediada por recetores é descrita, por exemplo, por Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); e Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990). Para uma revisão da marcação génica atualmente conhecida e protocolos de terapêutica génica veja-se Anderson *et al.*, Science 256:808-813 (1992). Veja-se também o documento WO 93/25673 e as referências citadas no mesmo.

Para a prevenção ou tratamento de doença, a dosagem apropriada de anticorpo multivalente dependerá do tipo de doença a ser tratada, da gravidade e curso da doença, de se o anticorpo multivalente é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, da terapêutica prévia, do historial clínico do paciente e resposta ao anticorpo multivalente, e do julgamento do médico assistente. O anticorpo multivalente é adequadamente administrado ao paciente numa vez ou durante uma série de tratamentos.

Dependendo do tipo e gravidade da doença, cerca de 1

$\mu\text{g/kg}$ a 15 mg/kg (por exemplo, cerca de 0,1-20 mg/kg) de anticorpo multivalente é uma dosagem inicial candidata para administração ao paciente, seja, por exemplo, através de uma ou mais administrações separadas, ou por infusão contínua. Uma dosagem diária típica pode variar de cerca de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que ocorra uma supressão desejada dos sintomas de doença. Contudo, outros regimes de dosagem podem ser úteis. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado por técnicas e ensaios convencionais.

A composição de anticorpo multivalente será formulada, doseada e administrada de uma forma consistente com a boa prática médica. Fatores para a consideração neste contexto incluem o distúrbio particular a ser tratado, o mamífero particular a ser tratado, a condição clínica do paciente individual, a causa do distúrbio, o local de administração do agente, o método de administração, o esquema de administração, e outros fatores conhecidos para os clínicos médicos. A quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo multivalente a ser administrada será governada por tais considerações, e é a quantidade mínima necessária para impedir, melhorar ou tratar uma doença ou distúrbio. O anticorpo multivalente não tem de ser, mas é opcionalmente formulado com um ou mais agentes atualmente utilizados para prevenir ou tratar o distúrbio em questão. A quantidade eficaz dos ditos outros agentes depende da quantidade de anticorpo multivalente presente na formulação, o tipo de distúrbio ou tratamento, e outros fatores discutidos anteriormente. Estes são geralmente usados nas mesmas dosagens e vias de administração como acima utilizados ou cerca de 1 a 99 das dosagens empregues até então.

H. Artigos de fabrico

Noutra forma de realização da invenção, é

proporcionado um artigo de fabrico contendo materiais úteis para o tratamento dos distúrbios descritos acima. O artigo de fabrico compreende um recipiente e um rótulo ou folheto informativo no ou associado ao recipiente. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, etc. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição que é eficaz para o tratamento da condição patológica e pode ter um orifício de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco que tem uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos um agente ativo na composição é um anticorpo multivalente. O rótulo ou folheto informativo indica que a composição é utilizada para tratar a condição de escolha, como cancro. Além disso, o artigo de fabrico pode compreender (a) um primeiro recipiente com uma composição nele contida, em que a composição compreende um anticorpo multivalente e (b) um segundo recipiente com uma composição nele contida, em que a composição compreende um agente citotóxico adicional. O artigo de fabrico nesta forma de realização da invenção pode compreender ainda um folheto informativo indicando que a primeira e a segunda composições de anticorpo podem ser usadas para tratar cancro. De forma alternativa, ou adicionalmente, o artigo de fabrico pode compreender além disso um segundo (ou terceiro) recipiente que compreende um tampão farmacologicamente aceitável, como água bacteriostática para injeção (BWFI), solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode incluir além disso outros materiais desejáveis desde um ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

I. Depósito de materiais

As seguintes linhas celulares de hibridoma foram

depositadas com a Coleção Americana de Culturas Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EUA (ATCC):

Designação	do N.º ATCC	Data do depósito
anticorpo		
7C2 (anti-HER2)	ATCC HB-12215	17 de outubro de 1996
7F3 (anti-HER2)	ATCC HB-12216	17 de outubro de 1996
4D5 (anti-HER2)	ATCC CRL 10463	24 de maio de 1990
2C4 (anti-HER2)	ATCC HB-12697	8 de abril de 1999
3F11.39.7 (anti-DR5)	HB-12456	13 de janeiro de 1998
3H3.14.5 (anti-DR5)	HB-12534	2 de junho de 1998
3D5.1.10 (anti-DR5)	HB-12536	2 de junho de 1998
3H1.18.10 (anti-DR5)	HB-12535	2 de junho de 1998
4E7.24.3 (anti-DR4)	HB-12454	13 de janeiro de 1998
4H6.17.8 (anti-DR4)	HB-12455	13 de janeiro de 1998

A invenção será mais completamente compreendida com referência aos Exemplos seguintes. Estes não devem, contudo, ser interpretados como limitando o âmbito desta invenção.

EXEMPLO 1

Construção de anticorpos multivalentes

A construção utilizada para gerar um anticorpo anti-HER2 tetraivalente, chamado um "anticorpo Octopus" (OctHER2), está ilustrado na Fig. 5 do presente documento. A cadeia principal deste anticorpo Octopus é a variante 8 do anticorpo monoclonal, humanizado, recombinante 4D5 (rhuMAb 4D5-8) (documento de patente U.S. N.º 5.821.337, Carter et al.). A cadeia pesada de rhuMAb 4D5-8 foi subclonada no vetor pRK5 (documento EP 307.247, publicado em 15 de março de 1989). A região VH-CH1 da cadeia pesada

foi removida por mutagênese, e três sítios de restrição únicos (BamHI; NheI; BspEI) foram inseridos. Estes sítios foram incorporados em iniciadores de PCR desenhados para amplificar a região VH-CH1 a partir de diferentes anticorpos. Os fragmentos resultantes foram subclonados no vetor para criar a cadeia pesada de Octopus. A coexpressão da cadeia pesada de Octopus com a cadeia leve apropriada num vetor pRK5 em transfeções de células de mamífero resulta no anticorpo Octopus completo (Fig. 4).

As construções de Octopus contendo ligantes flexíveis inseridos entre as regiões Fd em tandem foram também manipuladas. Através de mutagênese, ADN que codifica tanto μ gly-ser μ (ligante flexível 1) ou μ gly-ser-gly-ser μ (SEQ ID NO:10) (ligante flexível 2) foi inserido entre o ADN que codifica as regiões VH-CH1 da cadeia pesada.

EXEMPLO 2

Avaliação dos anticorpos Octopus anti-HER2

OctHER2 foi expresso em células 293 transfetadas de forma transiente (Graham *et al.* J. Gen. Virol. 36:59-72 (1977)) e purificado ao longo de uma coluna de proteína A sepharose. O anticorpo completo tem aproximadamente 245 kDa, em comparação com a massa molecular de 150 kDa do anticorpo parental. A cadeia pesada de Octopus tem 75 kDa (sem hidrato de carbono), e a cadeia leve tem 30 kDa.

Ligação a antígeno

A ligação de OctHER2 ao antígeno, domínio extracelular de HER2 (ECD HER2), foi analisada utilizando um ensaio de ELISA para HER2 (Sias *et al.* J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). Placas de noventa e seis poços foram revestidas com o domínio extracelular (ECD) de HER2 (WO90/14357), e incubadas com diluições diferentes de anticorpos anti-HER2. Depois de lavagem para remover o anticorpo não ligado, um anticorpo conjugado com peroxidase secundário foi depois adicionado para detetar o anticorpo anti-HER2 ligado ao ECD. O substrato apropriado foi depois

adicionado, e os poços foram visualizados e depois quantificados num leitor de placas a 562 nm.

Os resultados de ELISA para OctHER2, anticorpo anti-HER2 bivalente humano de IgG1 rhuMab 4D5-8 expresso pelas células 293, ou anticorpo anti-HER2 bivalente HERCEPTIN® (comercialmente disponível a partir de Genentech, Inc., South San Francisco, EUA), são mostrados nas Figs. 6A-C. OctHER2 liga-se ao ECD de HER2 de forma semelhante a HERCEPTIN® quando analisado num ensaio de ELISA. O rhuMab 4D5-8 expresso por células 293 liga-se de forma idêntica ao HERCEPTIN® em frascos (produzido por células de ovário de hamster chinês (CHO)), indicando que as células 293 não alteram substancialmente a capacidade de ligação a antígeno dos anticorpos.

Análise de ultracentrifugação foi utilizada para determinar se o OctHER2 era capaz de se ligar ao alvo com todos os quatro sítios de ligação a antígeno. Quantidades diferentes do domínio extracelular (ECD) de HER2 (documento WO90/14357) foram tituladas com o anticorpo Octopus, e com base nestas razões, a massa molecular média dos complexos foi calculada assumindo que o anticorpo Octopus tinha quatro sítios de ligação completamente funcionais, ou três sítios de ligação funcionais. Estes valores teóricos (círculos, assumindo que OctHER2 tem quatro sítios de ligação funcionais; e quadrados, assumindo que OctHER2 tem três sítios de ligação funcionais) foram comparados com os valores experimentais reais obtidos (triângulos). Os valores experimentais ilustrados na Fig. 7 seguem de forma mais próxima a curva que representa os quatro sítios de ligação, contudo o desvio observado é um indicador de que todos os quatro sítios provavelmente não se ligam com a mesma afinidade.

Função biológica

Ensaio de antiproliferação: OctHER2 foi comparado com HERCEPTIN® em ensaios funcionais que medem a inibição do

crescimento de linhas de células tumorais que superexpressam HER2. O ensaio de inibição do crescimento descrito em Lewis et al. Cancer Immuno. Immunother. 37:255-263 (1993) foi utilizado. Resumidamente, diluições seriadas de OctHER2 e HERCEPTIN® foram adicionadas ao meio de células em placas às quais foi depois permitido continuar a crescer durante cinco dias. Depois deste tempo, o meio foi removido e as células foram coradas com cristal violeta e quantificadas por espectrofotometria. O cristal violeta é um corante colorimétrico que cora as células, permitindo assim a medição do crescimento celular depois do tratamento.

Nas células que superexpressam HER2 3+ (sobre as quais HERCEPTIN® é muito eficaz), OctHER2 foi semelhante a ligeiramente melhor na inibição do crescimento de células SKBR3, (Fig. 8A), contudo, não foi eficaz sobre as células BT474 (Fig. 8B). De forma interessante, OctHER2 inibiu de forma mais eficaz que HERCEPTIN® uma linha celular com superexpressão 2+, MDA 361 (Fig. 8B).

Como mostrado na Fig. 9, as construções de Octopus de ligante flexível (OctHER2flex1, OctHER2flex2) inibiram o crescimento celular de forma mais eficaz do que HERCEPTIN®.

Ensaio de internalização: De modo a avaliar a aplicação do anticorpo Octopus para a terapêutica com imunotoxinas, as suas capacidades de internalização foram avaliadas. Para a terapêutica com anticorpo armado ou imunotoxina, um agente citotóxico é conjugado, ou fusionado, com o anticorpo e a imunotoxina assim produzida liga-se especificamente ao seu alvo celular; a célula assim ligada internaliza o anticorpo, e cataboliza ou degrada o anticorpo libertando a toxina que mata a célula.

Nos ensaios de internalização realizados no presente documento, o anticorpo foi radioiodado, e incubado com as células durante tempos variáveis. Isto foi seguido por medições da quantidade de anticorpo intacto, não ligado no

sobrenadante, da quantidade ligada à superfície celular, da quantidade internalizada e finalmente, da quantidade catabolizada e degradada.

Os resultados dos ensaios de internalização realizados em relação a uma linha celular com superexpressão 3+ (SKBR3) e uma linha celular com superexpressão 2+ (MDA453) (as linhas sólidas representam superexpressores de HER2 2+, e as linhas descontínuas, superexpressores 3+) são ilustrados nas Figs. 10A-B. Estes resultados indicam que OctHER2, surpreendentemente, foi internalizado e catabolizado duas vezes mais rápido que HERCEPTIN® em ambas as linhas celulares. A rápida internalização e catabolismo exibidos pelo anticorpo Octopus são ideais para um anticorpo armado. Em comparação com HERCEPTIN® não ligado, existe muito pouco anticorpo Octopus livre numa célula com superexpressão 2+. Uma vez mais, estes resultados sugerem que o anticorpo Octopus seria um excelente candidato para conjugar agentes citotóxicos para a distribuição no tumor.

Autorradiografia de microscopia eletrônica: Para confirmar que o anticorpo Octopus estava a ser internalizado e degradado nas vesículas adequadas, e não só de forma não específica, autorradiografia de microscopia eletrônica (EM) foi utilizada. O anticorpo Octopus foi iodado e incubado com as células da mesma forma que nos resultados de internalização. Os resultados ilustrados nas Figs. 11A-C confirmam que o anticorpo Octopus estava a ser internalizado nas vesículas corretas (endossoma precoce, Fig. 11 B; e lisossoma, Fig. 11 C). Adicionalmente, a percentagem de internalização observada com OctHER2 e HERCEPTIN® nestes ensaios correspondeu com as medições nos ensaios de internalização.

EXEMPLO 3

Avaliação dos anticorpos Octopus anti-DR5

DR5 é um membro da superfamília dos recetores de TNF que se liga a Apo2L/TRAIL (Apo2L) trimérico. Depois que os

recetores Apo2L se ligam a Apo2L e se agrupam, domínios de morte na região citosólica dos recetores induzem as caspases a desencadear a apoptose celular. Foram produzidas duas versões de construções Octopus anti-DR5: uma a partir de 16E2, uma anti-DR5 clonada a partir de uma biblioteca de Fv humano de cadeia simples (veja-se o documento WO98/51793); o segundo anticorpo Octopus anti-DR5 foi feito a partir do Mab 3H3.14.5 (o anticorpo μ 3H3 μ ; ATCC HB-12534, documento WO99/64461), um MAb anti-DR5 murino que induz a apoptose quando é reticulado. Uma vez que os anticorpos monoclonais anti-recetores de morte podem necessitar de reticulação para desencadear a apoptose, eles são candidatos para a construção do anticorpo Octopus. Os anticorpos Octopus anti-DR5 foram preparados substituindo os domínios variáveis da construção OctHER2 descrita acima com os domínios VL e VH de 16E2 ou 3H3.

Os anticorpos Octopus anti-DR5 foram analisados em ensaios de apoptose utilizando coloração com cristal violeta ou alamarBlue. Resumidamente, diluições seriadas do anticorpo Octopus ou ApoL2 foram adicionadas ao meio de células em placas às quais foi depois permitido continuar a crescer durante 24 horas. Depois deste tempo, o meio foi removido e as células foram coradas com cristal violeta, ou alamarBlue foi adicionado ao meio e incubado brevemente com as células. O cristal violeta cora as células, enquanto o alamarBlue deteta atividade metabólica no meio de cultura, Embora estes corantes permitam a medição das células que sobrevivem ao tratamento. A coloração por ambos corantes colorimétricos, cristal violeta e alamarBlue, foi quantificada por espectrofotometria.

Conforme mostrado nas Figs. 12A-E, o Octopus 16E2, surpreendentemente, induz a apoptose com potência comparável a Apo2L em linhas celulares tumorais de pulmão (SK-MES-1; HOP 92) e cólon (HCT116; COLO 205), contudo, não provoca a apoptose numa linha celular de controlo normal

(HUMEC). A apoptose induzida pelo Octopus 16E2 é dependente da caspase.

O Octopus 16E2 anti-DR5 foi também eficaz *in vivo* na indução da apoptose e redução de um tumor do cólon, humano COLO205, em ratinhos nus atímicos. Conforme mostrado na Fig. 13A-D, as secções histológicas de tecidos tumorais corados com hematoxilina e eosina a partir de ratinhos tratados com o Octopus 16E2 ou Apo2L induziram níveis semelhantes de células apoptóticas.

Os ratinhos tratados com Octopus 16E2 também demonstraram uma diminuição significativa no volume tumoral, semelhante ao medido para o Apo2L e dois mAbs anti-DR5 bivalentes, 16E2 e 3H3, conforme é mostrado na Fig. 14. Os ratinhos que não receberam quaisquer anticorpos anti-DR5 ou Apo2L (veículo) mostraram um aumento dramático do seu volume tumoral devido ao crescimento descontrolado.

A atividade apoptótica do material utilizado nos estudos de ratinhos foi confirmado num ensaio apoptótico *in vitro* na Fig. 15. O Octopus 16E2 anti-DR5 e o Apo2L utilizados no estudo foram comparados com um controlo positivo padrão e um controlo negativo de MAb anti-IgE (E25) num ensaio de apoptose de alamarBlue.

A Fig. 16 demonstra que outro Octopus anti-DR5, Octopus 3H3, é capaz de induzir a apoptose de forma semelhante ao Octopus 16E2. Adicionalmente, a Fig. 16 mostra que a atividade apoptótica do anticorpo Octopus não é dependente do lote, já que vários Octopus 16E2 preparados em diferentes datas retiveram uma função semelhante.

Nas Figs. 17A e B, a atividade apoptótica de ambos os anticorpos Octopus 16E2 e 3H3 é melhor que Apo2L numa linha celular de tumor pulmonar, SK-MES-1 (Fig. 17A), e uma linha tumoral de células T, Jurkat (Fig. 17B). Os anticorpos Octopus anti-DR5 podem ser mais eficazes no agrupamento de DR5 na superfície das células tumorais do que Apo2L.

O Octopus 16E2 foi analisado num rastreio de 2 dias e

6 dias frente a um painel de linhas celulares tumorais humanas do Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*, NCI) em comparação com o Apo2L. As Figs. 18A-C ilustram as curvas de resposta à dose de 2 dias que mostram os efeitos do Octopus 16E2 e Apo2L sobre o crescimento de várias linhas celulares de leucemia, cancro pulmonar de células não pequenas, cancro do cólon, cancro do sistema nervoso central (SNC), melanoma, cancro ovárico, cancro renal, cancro de próstata e cancro de mama, enquanto as Figs. 19A-C mostram curvas de resposta à dose a partir dos rastreios de 6 dias. Resultados comparáveis foram observados para Octopus 16E2 e Apo2L contra a maioria das linhas celulares tumorais, indicando novamente que o Octopus anti-DR5 funciona de maneira semelhante a Apo2L. Uma inibição semelhante de linhas celulares de cancro pulmonar e do cólon confirmou os anteriores resultados *in vitro* e *in vivo* a partir de ensaios de apoptose comparando Octopus 16E2 e Apo2L nas linhas celulares destes cancros. A capacidade do Octopus 16E2 para matar determinadas linhas celulares tumorais foi inesperada; por exemplo, uma linha celular de cancro do SNC, SF-295 (Fig. 19B), bem como duas linhas celulares de cancro renal, ACHN e RXF393 (Fig. 19C).

Os resultados dos rastreios do painel tumoral do NCI são ilustrados quantitativamente nas Figs. 20A e B (resultados aos 2 dias) e Figs. 21A e B (resultados aos 6 dias) que resumem o efeito de Octopus 16E2 em comparação com Apo2L sobre a inibição do crescimento (GI50), estase (TGI) e toxicidade (CL50) das linhas celulares tumorais tratadas. Novamente, estes resultados sugerem que o Octopus 16E2 pode ser eficaz contra mais tipos de cancro do que anteriormente observado.

EXEMPLO 4

Avaliação do anticorpo Octopus anti-CD20

Numa tentativa de melhorar a potência do anticorpo anti-CD20 quimérico C2B8 (RITUXAN®; documento de patente

U.S. N.º 5.736.137), uma abordagem a ser investigada é a capacidade do anticorpo para desencadear a apoptose das células tumorais. Foi realizado o ensaio de apoptose em Koopman et al. Blood 84:1415-1420 (1994). Um anticorpo Octopus anti-CD20 (OctCD20) foi preparado utilizando os domínios VL e VH de C2B8 na preparação de um anticorpo Octopus anti-CD20. O anticorpo OctCD20 foi expresso em células 293 e purificado através de cromatografia de proteína A sepharose como descrito para os exemplos anteriores.

Como mostrado na Fig. 22, o RITUXAN® isoladamente não desencadeia muita apoptose de uma linha de células B de linforma não Hodgkin, Wil-2, a não ser que seja reticulado com uma IgG anti-humana (RITUXAN®-IgG). O OctCD20, contudo, é capaz de induzir a apoptose em células Wil-2 independentemente da reticulação. Contudo, o nível de apoptose observado com OctCD20 é menor do que o de RITUXAN® reticulado, sugerindo que a atividade apoptótica de OctCD20 poderia ser melhorada, talvez através da utilização dos ligantes flexíveis.

EXEMPLO 5

Construção de anticorpos multivalentes adicionais

Foram manipuladas versões dos anticorpos Octopus do Exemplo 2 (anti-HER2), Exemplo 3 (anti-DR5) e Exemplo 4 (anti-CD20) com um domínio de dimerização de região de dobradiça de anticorpo (com a designação "F(ab')₂ de Octopus" no presente documento). A construção de F(ab')₂ de Octopus anti-HER2 foi manipulada substituindo a região Fc do ADNc de cadeia pesada com uma sequência que codifica um motivo de fecho de leucina que, quando expresso como proteína, dimeriza para unir de forma eficaz os braços de Fab de Octopus (Fig. 23C). O F(ab')₂ de Octopus pode manter o motivo de fecho de leucina, ou esse motivo pode, por exemplo, ser proteoliticamente removido como desejado. Como ilustrado na Fig. 24, PCR foi utilizada para amplificar os

domínios VH/CH1 duplicados e para inserir um sítio de restrição na extremidade do ADNc de cadeia pesada de Octopus (NotI) para permitir a subclonagem em fase num vetor (VG15) contendo um motivo de fecho de leucina. A PCR foi novamente utilizada para adicionar outro sítio de restrição a jusante do codão de terminação da cadeia pesada (XhoI) para permitir a subclonagem no vetor pRK para expressão em células de mamífero. Os domínios VH/CH1 do Mab16E2 anti-DR5 e Mab anti-CD20 C2B8 foram substituídos na estrutura principal de cadeia pesada de F(ab)'₂ de Oct utilizando os sítios de restrição únicos BamHI, NheI e BspEI.

Anticorpos μ POPoctopus μ foram criados ligando em conjunto domínios Fab em repetições em tandem para formar multímeros de Fab lineares. μ POPoct-3 μ contém três domínios Fab ligados (Fig. 23D), enquanto μ POPoct-4 μ tem quatro repetições de Fab (Fig. 23E). As construções POPoct-3 anti-HER2 (rhuMab 4D5), anti-DR5 (16E2) e anti-CD20 (C2B8) foram geradas, bem como as construções POPoct-4 anti-HER2 (rhuMab 4D5) e anti-DR5 (16E2). Os anticorpos POPoct-3 foram manipulados com e sem ligantes flexíveis 1.

A Fig. 25 ilustra a construção do ADNc de cadeia pesada de POPoct-3. A PCR foi utilizada para amplificar o domínio VH/CH1 adicionado um sítio 5'-BspEI e um sítio 3'-NotI. Esta sequência foi digerida e juntamente com a cadeia pesada de Octopus digerida com BamHI/BspEI, ligada a um vetor pRK para produzir uma sequência contendo uma cadeia pesada de Octopus para três domínios VH/CH1. O sítio BspEI codifica um resíduo de serina e de glicina.

Para manipular o anticorpo POPoct-4 (Fig. 26), foi utilizada oligomutagénese sítio-dirigida para introduzir uma mutação silenciosa, resultando na eliminação do sítio de restrição NheI entre os domínios VH/CH1 duplicados no ADNc de cadeia pesada de Octopus. Oligomutagénese foi novamente empregue para adicionar um sítio de restrição

NheI imediatamente a jusante da segunda sequência de VH/CH1. Este ADNc juntamente com a construção de POPoct-3 foram digeridos com endonucleases de restrição BamHI/NheI, e ligados em conjunto com o vetor pRK para produzir um ADNc de cadeia pesada contendo a sequência para quatro domínios VH/CH1.

As cadeias pesadas de Octopus diferentes foram cotransfetadas de forma transiente com os ADNc de cadeia leve apropriados em células mamíferas 293 para expressar anticorpos contendo três domínios Fab (Fab de POPoct-3) ou quatro domínios Fab (Octopus de comprimento completo; F(ab)'₂ de Octopus; Fab de POPoct-4). Enquanto Mabs de IgG nativos e anticorpos Octopus de comprimento completo foram purificados sobre proteína A sepharose, F(ab)'₂ de Octopus e POPoct-3 e -4 foram purificados sobre colunas de proteína G sepharose.

O F(ab)'₂ de Octopus é aproximadamente 200 kDa (Fig. 23F, pista 4), inferior do que os 240 kDa do anticorpo Octopus de comprimento completo (Fig. 23F, pista 3), mas maior que o Mab de IgG nativo de 150 kDa (Fig. 23F, pistas 1 e 2). A aproximadamente 140 kDa (Fig. 23F, pista 5), POPoct-3 é ligeiramente menos que o Mab de IgG nativo, enquanto POPoct-4 é ligeiramente maior a 190 kDa. A cadeia pesada do F(ab)'₂ de Octopus (Fig. 23G, pista 4) tem aproximadamente o mesmo tamanho que a cadeia pesada do Mab de IgG nativo (Fig. 23G, pistas 1 e 2) a 55 kDa. A cadeia pesada de POPoct-3 (Fig. 23G, pista 5) é semelhante quanto ao tamanho à cadeia pesada de Octopus de comprimento completo (Fig. 23G, pista 3), enquanto a aproximadamente 97 kDa o POPoct-4 tem a cadeia pesada maior.

Exemplo 6

Avaliação de anticorpos multivalentes anti-HER2

Ensaio de antiproliferação: F(ab)'₂ OctHER, POPoct-3 HER2, OctHER2, OctHER2 flex 1, e rhuMab 4D5 (HERCEPTIN®) foram adicionados à linha celular tumoral com

superexpressão de HER2 3+, BT474, a concentrações equimolares e avaliados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento celular como medido por coloração de cristal violeta. Os resultados destes ensaios são mostrados na Fig. 27. Embora todos os anticorpos tenham induzido alguma citostase das células BT474, POPoct-3HER2 e rhuMab 4D5 mostraram a maior eficácia e inibiram o crescimento de forma equivalente, enquanto que o F(ab)'₂ de OctHER2 perdeu potência rapidamente à medida que a sua concentração diminuiu. OctHER2 flex1 demonstrou uma melhoria ligeira mas consistente em relação a OctHER2 (n=6), sugerindo que a flexibilidade melhorada pode resultar num melhor acesso do Fab ao alvo HER2.

OctHER2, OctHER2 flex-1, POPoct-3HER2, POPoct-3HER2 flex-1 e rhuMab 4D5 (HERCEPTIN®) também foram avaliados a concentrações equimolares noutra linha celular com superexpressão de HER2 3+, SKBR3, em ensaios de citostase com cristal violeta. Os resultados deste ensaio são ilustrados na Fig. 28. Nesta linha celular, todas as construções de Octopus testadas inibiram o crescimento celular de forma equivalente, e melhor que rhuMab 4D5 (n=4). Qualquer melhoria na eficácia devido ao ligante flexível entre os braços de Fab de OctHER2 ou POPoct-3 foi menos evidente nesta linha celular.

Ensaio de internalização: POPoct-3HER2 foi comparado com OctHER e HERCEPTIN® nos ensaios de internalização em duas linhas celulares tumorais com superexpressão de HER2 3+, SKBR3 e BT474, para avaliar a sua candidatura para aplicações em terapêuticas com imunotoxinas. Embora estruturalmente diferente do anticorpo OctHER2 de comprimento completo, POPoct-3HER2 foi internalizado e catabolizado de forma idêntica a OctHER2 por ambas as linhas celulares (Figs. 29A e B) e ao dobro da taxa de HERCEPTIN®.

Exemplo 7**Avaliação de anticorpos multivalentes anti-DR5**

Ensaio de apoptose: Versões multivalentes do MAb 16E2 anti-DR5 foram avaliadas neste exemplo. Oct1 DR5, OctDR5flex-1, OctDR5F(ab)'₂, POPoct-3DR5, POPoct-3DR5flex-1 e POPoct-4 DR5 foram adicionados a concentrações equimolares à linha celular de tumor do cólon COLO205 e analisados em ensaios de apoptose de cristal violeta em comparação com o MAb 16E2 (n=4). Os resultados são mostrados na Figs. 30A e B. Todos os anticorpos Octopus induziram mais apoptose do que o MAb 16E2, com a ordem de eficácia do mais potente para menos: OctDR5flex-1 > OctDR5 = POPoct-4 DR5 = POPoct-3flex-1DR5 = POPoct-3DR5 > OctDR5F(ab)'₂ > MAb 16E2. OctDR5flex-1 mostrou uma potência aumentada em comparação com OctDR5, especialmente a baixas concentrações (Fig. 30A), indicando que a flexibilidade entre os braços de Fab melhora a eficácia. POPoct-3flex-1 DR5 induziu níveis equivalentes de apoptose como OctHER (Fig. 30A) e mostrou uma eficácia semelhante a POPoct16-3 e POPoct16-4 (Fig. 30B).

Sinalização celular: Apo2L liga-se aos recetores de morte e desencadeia a apoptose celular através da via de sinalização da caspase. Conforme mostrado nas Figs. 31A e B, os anticorpos Octopus anti-DR5 foram mostrados como induzindo a apoptose através da mesma via de sinalização que Apo2L. Oct16E2 desencadeou níveis semelhantes de apoptose como Apo2L na linha celular de tumor pulmonar SK-MES-1 (Fig. 31A, linhas descontínuas), mas depois da adição de ZVAD, um inibidor de caspase 3 e 9, a apoptose celular desencadeada por ambos Apo2L e Oct16E2 foi inibida (Fig. 31B linhas sólidas). Evidências adicionais de que os anticorpos Octopus anti-DR5 sinalizaram através da mesma via que Apo2L foram obtidas por análises de DISC (Complexo de sinalização induzido por morte) (Fig. 31 B). Células BJAB, uma linha de linfoma de células B que expressa DR5,

foram incubadas a duas concentrações diferentes de dois anticorpos Octopus anti-DR5, Oct16E2 e Oct3H3, durante tempos variáveis. A purificação dos complexos de anticorpo-DR5 foi seguida por análise de *Western blot* para identificar as moléculas de sinalização que foram copurificadas com os complexos. Tal como com Apo2L, as moléculas de sinalização caspase 8 e FADD associaram-se com DR5 depois do recetor ser ligado por ambos Oct16E2 e Oct3H3 (Fig. 31 B).

Exemplo 8

Avaliação do anticorpo Octopus anti-CD20

Ensaio de apoptose: Como mostrado na Fig. 22, RITUXAN® não desencadeou a apoptose de forma eficaz *in vitro* linha celular de linfoma de células B WIL-2 a menos que fosse primeiro reticulado por um anticorpo anti-IgG. OctOD20 foi capaz de induzir a apoptose de células WIL-2 independentemente da reticulação, a níveis mais elevados que o RITUXAN® sozinho, no entanto, ligeiramente mais baixos que o RITUXAN® reticulado com anti-IgG. Quando reticulado com um anticorpo anti-IgG, OctCD20 induziu mais apoptose das células WIL-2 do que o RITUXAN® reticulado (Fig. 32). Uma vez que uma potencial explicação para a eficácia de RITUXAN® *in vivo* é que o anticorpo está a ser reticulado pelo complemento ou células que portam FcγR, esta observação sugere que OctOC20 será ainda mais eficaz *in vivo*.

F(ab)'₂ OctCD20, POPoct-3CD20 e POPoct-3CD20flex-1 foram testados a várias concentrações em ensaios de apoptose com células WIL-2, e as doses ótimas são mostradas nas curvas de resposta máxima na Fig. 33. Os anticorpos Octopus foram comparados com o anticorpo anti-CD20 1F5 (Clark et al. *supra*), que funciona de forma semelhante ao RITUXAN® no sentido em que não induz a apoptose a menos que seja reticulado com um anticorpo anti-IgG. Ambos os anticorpos Octopus testados induziram níveis semelhantes

(F(ab')₂ OctCD20) ou superiores (POPoct-3CD20, POPoct-3CD20flex-1) de apoptose do que o IF5 anti-CD20. Adicionalmente, os anticorpos Octopus foram eficazes a concentrações consideravelmente mais baixas do que o anti-CD20 reticulado.

Quando anticorpos anti-CD20 reticulados são adicionados à linha de linfoma de células B WIL-2S, uma adesão homotípica das células é observada. Esta aglomeração de células é uma indicação de que as células foram ativadas mediante CD20. Os anticorpos Octopus anti-CD20 induzem este mesmo fenómeno de adesão homotípica independentemente do reticulante, e como mostrado na Fig. 34 com POPoct-3CD20, a concentrações muito inferiores do que IF5 anti-CD20 reticulado.

A indução da apoptose pelos vários anticorpos anti-CD20 foi adicionalmente avaliada utilizando sangue de um paciente com leucemia linfocítica crónica (CLL). PBLs foram separados utilizando sedimentação com dextrano, lavados e colocados em placas em meio de linfócitos isento de soro tratado durante a noite sem amostra, 1 F5 (20 µg/ml), 1F5+reticulado de ratinho anti-IgG (100 µg/ml), F(ab')₂ OctCD20 a aprox. 0,5 ou 1,0 µg/ml e POPoct-3 CD20 a 0,5 µg/ml.

Foi realizado um ensaio de apoptose utilizando coloração de anexina e PI. A percentagem de células apoptóticas foi:

Não tratadas	38,5 %
1F5	37,1 %
1 F5 reticulado com anti-IgG	25,1 %
POPoct-3 CD20 (0,5 µg)	50,2 %
F(ab') ₂ OctCD20 (0,5 µg)	37,7 %
F(ab') ₂ OctCD20 (1,0 µg)	48,6 %

Os dados indicam que os anticorpos multivalentes anti-CD20 (especialmente POPoct-3 CD20) potenciam a apoptose de uma forma dependente da dose.

Ensaio de internalização: OctCD20 foi também avaliado como um candidato para a terapêutica com imunotoxinas em ensaios de internalização: em três linhas de linfoma de células B, DB, WIL-2 e Ramos, e comparado com RITUXAN®. Como mostrado na Fig. 35, duas vezes mais OctCD20 foi internalizado pelas células em comparação com RITUXAN®, que não foi internalizado pelas células em níveis apreciáveis. A avidéz mais elevada que seria esperada para os anticorpos multivalentes devido ao número aumentado de sítios de ligação é evidente no facto de que mais OctCD20 permanece ligado à superfície celular das células ao longo do tempo em comparação com RITUXAN®.

Lista de sequências substituta

<110> Genentech, Inc.

<120> ANTICORPOS MULTIVALENTES E UTILIZAÇÕES DOS MESMOS

<130> EAH/FP7064413

<140> EP

<141> 20-03-2001

<150> EP 01920580.6

<151> 20-03-2001

<150> PCT/US01/08928

<151> 20-03-2001

<150> US 60/195.819

<151> 11-04-2000

<160> 13

<170> Patent-In 3.5

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1          5          10          15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
          20          25          30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
          35          40          45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
          50          55          60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
          65          70          75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
          80          85          90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
          95          100          105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
          110          115          120

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
          125          130          135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
          140          145          150

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
          155          160          165

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
          170          175          180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
          185          190          195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
          200          205          210

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          215

```

<210> 2

<211> 218

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

<210> 3

<211> 217

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

<210> 4

<211> 218

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1          5          10          15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20          25          30
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35          40          45

Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50          55          60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 65          70          75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80          85          90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 95          100         105

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110         115         120

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125         130         135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140         145         150

Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr
 155         160         165

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 170         175         180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser
 185         190         195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys
 200         205         210

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215

```

<210> 5

<211> 218

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

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

<210> 6

<211> 215

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 6

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

<210> 7

<211> 218

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 7

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

Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
215

<210> 8

<211> 218

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 8

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

<210> 9

<211> 218

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 9

Pro	Pro	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	1	5	10	15
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----	----

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

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> A sequência é sintetizada

<400> 10

Gly Ser Gly Ser
1

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> A sequência é sintetizada

<400> 11

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <221> SITE
 <222> 1-4
 <223> Aminoácidos no domínio variável de cadeia pesada
 (VH) do anticorpo

<400> 12

Glu Val Gln Leu
 1

<210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <221> SITE
 <222> 1-4
 <223> Aminoácidos no domínio constante de cadeia pesada
 (CH1) do anticorpo

EP2857516B1

<400> 13

Lys Thr His Thr
1

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 4816567 A, Cabilly [0008] [0092] [0093] [0183] [0193] [0201]
- US 5821337 A, Carter [0011] [0074] [0108] [0178] [0315]
- US 5530101 A, Queen [0011]
- US 5434340 A [0016]
- US 5591699 A [0016]
- US 5569825 A [0016] [0095]
- US 5545806 A [0016] [0095]
- US 5545807 A [0016] [0095] [0199]
- WO 9902567 A [0018]
- WO 9119515 A [0019]
- WO 9509917 A [0020]
- US 5641870 A, Rinderknecht [0022] [0091] [0204]
- WO 0006605 A [0023]
- US 5591828 A [0023]
- US 5959083 A [0023]
- US 6027725 A [0023]
- WO 9858965 A [0023]
- WO 9413804 A [0023]
- WO 9937791 A [0023]
- US 5989830 A [0023]
- WO 9415642 A [0023]
- EP 628078 B1 [0023]
- WO 9714719 A [0023]
- EP 0517024 A [0024]
- US 4968603 A [0027]
- WO 9422478 A [0028]

- US 5824311 A [0028]
- US 5677171 A [0029] [0125]
- WO 9400136 A [0031]
- US 5783186 A [0031]
- WO 9877797 A [0031] [0074]
- US 5183884 A [0031] [0075]
- US 5480968 A [0031] [0075]
- EP 599274 A [0031] [0076]
- US 5641869 A [0032] [0071]
- WO 9701633 A [0034] [0083]
- WO 9725428 A [0034] [0067] [0083]
- WO 9828426 A [0034]
- WO 9846751 A [0034]
- WO 9818921 A [0034]
- EP 417563 A [0037]
- WO 9839361 A [0040]
- WO 9832856 A [0043]
- WO 9851793 A [0044] [0084] [0128] [0130] [0328]
- WO 9841629 A [0044]
- WO 9835986 A [0044]
- EP 870827 A [0044]
- WO 9846643 A [0044]
- WO 9902653 A [0044]
- WO 9909165 A [0044]
- WO 9911791 A [0044]
- WO 9904001 A [0047]
- WO 9907738 A [0047]
- WO 9933980 A [0047]
- US 5595721 A, Kaminski [0055] [0078]
- US 5736137 A, Anderson [0056] [0078] [0338]
- US 5708156 A [0069]
- US 4943533 A, Mendelsohn [0073]
- WO 9640210 A [0073]
- US 5772997 A [0074]
- US 5840525 A [0074]

- WO 9321319 A [0074]
- WO 9700271 A [0074]
- US 5968511 A [0075]
- WO 9919488 A [0076]
- US 5677180 A [0078]
- US 5674492 A [0081]
- US 5677165 A, deBoer [0081]
- US 5182368 A, Ledbetter [0081]
- EP 988371 A1 [0082]
- US 5763223 A [0083]
- WO 9937684 A [0084] [0130]
- WO 9914330 A [0085]
- EP 404097 A [0091]
- WO 9311161 A [0091]
- US 5625126 A [0095]
- US 5633425 A [0095]
- US 5661016 A [0095]
- US 5750373 A [0095]
- US 5821333 A [0103] [0117]
- US 5500362 A [0108]
- US 5091178 A [0167]
- WO 9616673 A [0178]
- US 5837234 A [0178]
- WO 9802463 A [0178]
- US 5567610 A, Borrebaeck [0195]
- US 5229275 A, Goroff [0195]
- US 5591669 A [0199]
- US 5589369 A [0199]
- WO 9805344 A [0200]
- WO 9815833 A [0200]
- WO 9747314 A [0200]
- WO 9744491 A [0200]
- WO 9735196 A [0200]
- WO 9534648 A [0200]
- US 5712089 A [0200]

- US 5702892 A [0200]
- US 5427908 A [0200]
- US 5403484 A [0200]
- US 5432018 A [0200]
- US 5270170 A [0200]
- WO 9206176 A [0200]
- WO 9906587 A [0200]
- US 5514548 A [0200]
- WO 9708320 A [0200]
- WO 9316185 A [0204]
- US 5571894 A [0204]
- US 5587458 A [0204]
- WO 9951642 A [0227]
- US 5648260 A [0227]
- US 5624821 A [0227]
- WO 9429351 A [0227]
- US 5739277 A [0228]
- US 5208020 A [0231]
- US 5714586 A [0233]
- US 5712374 A [0233]
- US 5264586 A [0233]
- US 5773001 A [0233]
- WO 9321232 A [0234]
- WO 9411026 A [0237] [0266]
- WO 8101145 A [0240]
- WO 8807378 A [0240]
- US 4975278 A [0240]
- US 4485045 A [0245]
- US 4544545 A [0245]
- WO 9738731 A [0245]
- US 5013556 A [0245]
- WO 9013646 A [0249]
- US 4965199 A [0256]
- EP 73657 A [0262]
- US 4419446 A [0264]

- US 4601978 A [0264]
- DD 266710 [0267]
- EP 402226 A [0268]
- EP 183070 A [0268]
- EP 244234 A [0268]
- US 5807715 A [0271]
- US 4767704 A [0273]
- US 4657866 A [0273]
- US 4927762 A [0273]
- US 4560655 A [0273]
- US 5122469 A [0273]
- WO 9003430 A [0273]
- WO 8700195 A [0273]
- US RE30985 E [0273]
- US 3773919 A [0280]
- US 4275149 A [0283] [0285]
- US 4737456 A [0283]
- US 4318980 A [0285]
- WO 9607321 A [0307]
- US 4892538 A [0308]
- US 5283187 A [0308]
- WO 9325673 A [0308]
- EP 307247 A [0315]
- WO 9014357 A [0318] [0320]
- WO 9964461 A [0328]
- EP 01920580 A [0358]
- US 0108928 W [0358]
- US 60195819 B [0358]

Documentos de não patente citados na descrição

- **CHOTHIA et al.** *J. Mol. Biol.*, 1985, vol. 186, 651-663 [0002]
- **NOVOTNY; HABER.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 4592-4596 [0002]
- **KABAT et al.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. National Institutes of Health, 1991 [0003]

- MILLER et al. *Blood*, 1983, vol. 62, 988-995 [0007]
- SCHROFF, R. W. et al. *Cancer Res.*, 1985, vol. 45, 879-885 [0007]
- MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0008] [0093]
- BOULIANNE et al. *Nature*, 1984, vol. 312, 643-646 [0008]
- NEUBERGER et al. *Nature*, 1985, vol. 314, 268-270 [0008]
- BRUGGEMANN et al. *J. Exp. Med.*, 1987, vol. 166, 1351-1361 [0008]
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0008] [0009] [0010] [0011] [0201]
- LOVE et al. *Methods in Enzymology*, 1989, vol. 178, 515-527 [0008]
- BINDON et al. *J. Exp. Med.*, 1988, vol. 168, 127-142 [0008]
- JAFFERS et al. *Transplantation*, 1986, vol. 41, 572-578 [0008]
- JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0009] [0011] [0094] [0201]
- VERHOEYEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0009] [0011] [0201]
- HALE et al. *Lancet*, 1988, vol. i, 1394-1399 [0010]
- QUEEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 10029-10033 [0011]
- CO et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 2869-2873 [0011]
- GORMAN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 4181-4185 [0011]
- DAUGHERTY et al. *Nucleic Acids Research*, 1991, vol. 19 (9), 2471-2476 [0011]
- BROWN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 2663-2667 [0011]
- JUNGHANS et al. *Cancer Research*, 1990, vol. 50, 1495-1502 [0011]
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597

[0013] [0092] [0192] [0200]

- GRIFFITHS et al. *EMBO J*, 1993, vol. 12, 725-734 [0013]
- HOOGENBOOM. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 227, 381-388 [0014]
- WINTER et al. *Ann. Rev. Immuno.*, 1994, vol. 12, 433-55 [0014]
- GARRARD; HENNER. *Gene*, 1993, vol. 128, 103-109 [0014]
- MARKS et al. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0015] [0095] [0112] [0192]
- GRAM et al. *PNAS (USA)*, 1992, vol. 89, 3576-3580 [0015]
- DUCHOSAL et al. *Nature*, 1992, vol. 355, 258-262 [0016] [0199]
- BORREBAECK et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 3995-4000 [0017]
- BOERNER et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 86-95 [0017]
- GHETIE et al. *PNAS (USA)*, 1997, vol. 94, 7509-7514 [0018]
- WOLFF et al. *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0018]
- SHOPES, B. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (9), 2918-2922 [0019]
- GREENWOOD et al. *Ther. Immunol.*, 1994, vol. 1, 247-255 [0019]
- CARON et al. *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0019]
- COLOMA ; MORRISON. *Nature Biotech.*, 1997, vol. 15, 159-163 [0020]
- SMITH ; MORRISON. *Bio/Technology*, 1994, vol. 12, 683-688 [0020]
- SHUFORD et al. *Science*, 1991, vol. 252, 724-727 [0021]
- ALT et al. *FEBS Letters*, 1990, vol. 454, 90-94 [0022]
- TUTT et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60-69 [0023]
- STEVENSON et al. *Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0023]
- PLUCKTHUN et al. *Immunotechnology*, 1997, vol. 3 (2), 83-105 [0024]
- BASELGA ; MENDELSON. *Pharmac. Ther.*, 1994, vol. 64, 127-

154 [0026]

- MASUI. *Cancer Research*, 1984, vol. 44, 1002-1007 [0026]
- WU et al. *J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95, 1897-1905 [0026]
- SLAMON et al. *Science*, 1987, vol. 235, 177-182 [0027]
- SLAMON et al. *Science*, 1989, vol. 244, 707-712 [0027]
- DREBIN et al. *Cell*, 1985, vol. 41, 695-706 [0028]
- MYERS et al. *Meth. Enzym.*, 1991, vol. 198, 277-290 [0028]
- DREBIN et al. *Oncogene*, 1988, vol. 2, 273-277 [0028]
- HUDZIAK et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9 (3), 1165-1172 [0029]
- FENDLY et al. *Cancer Research*, 1990, vol. 50, 1550-1558 [0029]
- KOTTS et al. *In Vitro*, 1990, vol. 26 (3), 59A [0029]
- SARUP et al. *Growth Regulation*, 1991, vol. 1, 72-82 [0029]
- SHEPARD et al. *J. Clin. Immunol.*, 1991, vol. 11 (3), 117-127 [0029]
- KUMAR et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11 (2), 979-986 [0029]
- LEWIS et al. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1993, vol. 37, 255-263 [0029]
- PIETRAS et al. *Oncogene*, 1994, vol. 9, 1829-1838 [0029]
- VITETTA et al. *Cancer Research*, 1994, vol. 54, 5301-5309 [0029]
- SLIWKOWSKI et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (20), 14661-14665 [0029] [0072]
- SCOTT et al. *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 14300-5 [0029]
- D'SOUZA et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, vol. 91, 7202-7206 [0029]
- LEWIS et al. *Cancer Research*, 1996, vol. 56, 1457-1465 [0029]
- SCHAEFER et al. *Oncogene*, 1997, vol. 15, 1385-1394 [0029] [0032]

- BASELGA et al. *J. Clin. Oncol.*, 1996, vol. 14, 737-744 [0030]
- TAGLIABUE et al. *Int. J. Cancer*, 1991, vol. 47, 933-937 [0031]
- MCKENZIE et al. *Oncogene*, 1989, vol. 4, 543-548 [0031]
- MAIER et al. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 5361-5369 [0031]
- BACUS et al. *Molecular Carcinogenesis*, 1990, vol. 3, 350-362 [0031]
- STANCOVSKI et al. *PNAS (USA)*, 1991, vol. 88, 8691-8695 [0031]
- BACUS et al. *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 2580-2589 [0031]
- XU et al. *Int. J. Cancer*, 1993, vol. 53, 401-408 [0031]
- KASPRZYK et al. *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 2771-2776 [0031]
- HANCOCK et al. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 4575-4580 [0031]
- SHAWVER et al. *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 1367-1373 [0031]
- ARTEAGA et al. *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 3758-3765 [0031]
- HARWERTH et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 15160-15167 [0031]
- KLAPPER et al. *Oncogene*, 1997, vol. 14, 2099-2109 [0031] [0122]
- KRAUS et al. *PNAS (USA)*, 1989, vol. 86, 9193-9197 [0031] [0075]
- PLOWMAN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 1746-1750 [0031] [0076]
- PLOWMAN et al. *Nature*, 1993, vol. 366, 473-475 [0031] [0076]
- EARP et al. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1995, vol. 35, 115-132 [0032]
- GROENEN et al. *Growth Factors*, 1994, vol. 11, 235-257 [0032]

- HOLMES et al. *Science*, 1992, vol. 256, 1205-1210 [0032]
[0071]
- LEMKE, G. *Molec. & Cell. Neurosci.*, 1996, vol. 7, 247-262
[0032]
- LEE et al. *Pharm. Rev.*, 1995, vol. 47, 51-85 [0032]
- CHANG et al. *Nature*, 1997, vol. 387, 509-512 [0032]
- CARRAWAY et al. *Nature*, 1997, vol. 387, 512-516 [0032]
[0070]
- ZHANG et al. *PNAS (USA)*, 1997, vol. 94 (18), 9562-7
[0032]
- SLIWKOWSKI. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (20), 14661-
14665 [0033]
- LEVI et al. *Journal of Neuroscience*, 1995, vol. 15, 1329-
1340 [0033]
- MORRISSEY et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol.
92, 1431-1435 [0033]
- LEWIS et al. *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 1457-1465 [0033]
- CARRAWAY; CANTLEY. *Cell*, 1994, vol. 78, 5-8 [0033]
- GRUSS ; DOWER. *Blood*, 1995, vol. 85, 3378-3404 [0034]
- PITTI et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 12687-12690
[0034]
- WILEY et al. *Immunity*, 1995, vol. 3, 673-682 [0034]
- BROWNING et al. *Cell*, 1993, vol. 72, 847-856 [0034]
- ARMITAGE et al. *Nature*, 1992, vol. 357, 80-82 [0034]
- MARSTERS et al. *Curr. Biol.*, 1998, vol. 8, 525-528 [0034]
- SIMONET et al. *Cell*, 1997, vol. 89, 309-319 [0034] [0084]
- CHICHEPORTICHE et al. *Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 32401-
32410 [0034]
- HAHNE et al. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, 1185-1190
[0034]
- MOORE et al. *Science*, 1999, vol. 285, 260-263 [0034]
- SHU et al. *J. Leukocyte Biol.*, 1999, vol. 65, 680 [0034]
- SCHNEIDER et al. *J. Exp. Med.*, 1999, vol. 189, 1747-1756
[0034]
- MUKHOPADHYAY et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274,

15978-15981 [0034]

- SCHMID et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986, vol. 83, 1881 [0034]
- DEALTRY et al. *Eur. J. Immunol.*, 1987, vol. 17, 689 [0034]
- GRUSS et al. *Blood*, 1995, vol. 85, 3378 [0035]
- ZHENG et al. *Nature*, 1995, vol. 377, 348-351 [0035]
- AMAKAWA et al. Symposium on Programmed Cell Death. Cold Spring Harbor Laboratory, 1995 [0035]
- RENSHAW et al. *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 180, 1889 [0035]
- MACKAY et al. *J. Exp. Med.*, 1999, vol. 190, 1697 [0035]
- KRAMMER et al. *Curr. Op. Immunol.*, 1994, vol. 6, 279-289 [0036]
- NAGATA et al. *Science*, 1995, vol. 267, 1449-1456 [0036]
- YONEHARA et al. *J. Exp. Med.*, 1989, vol. 169, 1747-1756 [0036]
- HOHMAN et al. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 14927-14934 [0037]
- BROCKHAUS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, vol. 87, 3127-3131 [0037]
- LOETSCHER et al. *Cell*, 1990, vol. 61, 351 [0037]
- SCHALL et al. *Cell*, 1990, vol. 61, 361 [0037]
- SMITH et al. *Science*, 1990, vol. 248, 1019-1023 [0037]
- LEWIS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, vol. 88, 2830-2834 [0037]
- GOODWIN et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11, 3020-3026 [0037]
- NOPHAR et al. *EMBO J*, 1990, vol. 9, 3269 [0037]
- KOHNO et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, vol. 87, 8331 [0037]
- HALE et al. *J. Cell. Biochem.*, 1991, 113 [0037]
- BANNER et al. *Cell*, 1993, vol. 73, 431-435 [0038]
- JOHNSON et al. *Cell*, 1986, vol. 47, 545 [0038]
- RADEKE et al. *Nature*, 1987, vol. 325, 593 [0038]
- STAMENKOVIC et al. *EMBO J*, 1989, vol. 8, 1403 [0038]

- MALLET et al. *EMBO J.*, 1990, vol. 9, 1063 [0038]
- ITOH et al. *Cell*, 1991, vol. 66, 233-243 [0038]
- UPTON et al. *Virology*, 1987, vol. 160, 20-29 [0038]
- SMITH et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 176, 335 [0038]
- UPTON et al. *Virology*, 1991, vol. 184, 370 [0038]
- BULOW et al. *Science*, 1997, vol. 278, 138-141 [0040]
- LAABI et al. *EMBO J.*, 1992, vol. 11, 3897-3904 [0041]
- LAABI et al. *Nucleic Acids Res.*, 1994, vol. 22, 1147-1154 [0041]
- GRAS et al. *Int. Immunology*, 1995, vol. 7, 1093-1106 [0041]
- MADRY et al. *Int. Immunology*, 1998, vol. 10, 1693-1702 [0041]
- MARSTERS et al. *Curr. Biol.*, 1996, vol. 6, 750 [0042]
- MARSTERS et al. *Curr. Biol.*, 1996, vol. 6, 1669 [0042]
- CHINNAIYAN et al. *Science*, 1996, vol. 274, 990 [0042]
- KITSON et al. *Nature*, 1996, vol. 384, 372 [0042]
- BODMER et al. *Immunity*, 1997, vol. 6, 79 [0042]
- SCREATON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, vol. 94, 4615-4619 [0042]
- PAN et al. *Science*, 1997, vol. 276, 111-113 [0043] [0046] [0084]
- SHERIDAN et al. *Science*, 1997, vol. 277, 818-821 [0044] [0046] [0084]
- PAN et al. *Science*, 1997, vol. 277, 815-818 [0044]
- SCREATON et al. *Curr. Biol*, 1997, vol. 7, 693-696 [0044]
- WALCZAK et al. *EMBO J*, 1997, vol. 16, 5386-5387 [0044]
- WU et al. *Nature Genetics*, 1997, vol. 17, 141-143 [0044]
- HYMOWITZ. *Molecular Cell*, 1999, vol. 4, 563-571 [0044]
- PAN et al. *FEBS Letters*, 1998, vol. 431, 351-356 [0045]
- MCFARLANE et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 25417-25420 [0046]
- SCHNEIDER et al. *FEBS Letters*, 1997, vol. 416, 329-334 [0046]

- DEGLI-ESPOSTI et al. *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 186, 1165-1170 [0046]
- MONGKOLSAPAYA et al. *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 3-6 [0046]
- MARSTERS et al. *Curr. Biol.*, 1997, vol. 7, 1003-1006 [0046] [0084]
- PAN et al. *FEBS Letters*, 1998, vol. 424, 41-45 [0046]
- DEGLI-ESPOSTI et al. *Immunity*, 1997, vol. 7, 813-820 [0046]
- PITTI et al. *Nature*, 1998, vol. 396, 699-703 [0046]
- BROJATSCH et al. *Cell*, 1996, vol. 87, 845-855 [0047]
- MONTGOMERY et al. *Cell*, 1996, vol. 87, 427-436 [0047]
- MARSTERS et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 14029-14032 [0047]
- NOCENTINI et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 6216-6221 [0047]
- EMERY et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 14363-14367 [0047]
- TEWARI et al. *Curr. Op. Genet. Develop.*, 1996, vol. 6, 39-44 [0048]
- VERMA et al. *Genes Develop.*, 1996, vol. 9, 2723-2735 [0048]
- BALDWIN. *Ann. Rev. Immunol.*, 1996, vol. 14, 649-681 [0048]
- LOTZ et al. *J. Leukocyte Biol.*, 1996, vol. 60, 1-7 [0048]
- ASHKENAZI; DIXIT. *Science*, 1998, vol. 281, 1305-1308 [0049]
- GOLSTEIN. *Curr. Biol.*, 1997, vol. 7, 750-753 [0049]
- NAGATA. *Cell*, 1997, vol. 88, 355-365 [0049]
- VALENTINE et al. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264 (19), 11282-11287 [0052]
- EINFELD et al. *EMBO J*, 1988, vol. 7 (3), 711-717 [0052]
- ANDERSON et al. *Blood*, 1984, vol. 63 (6), 1424-1433 [0052]
- TEDDER et al. *J. Immunol.*, 1985, vol. 135 (2), 973-979

[0052]

- TEDDER et al. *J. Cell. Biochem.*, 1990, vol. 14D, 195 [0052]
- NADLER, L. et al. *Lymphocyte Typing II*. Springer Verlag, 1986, vol. 2, 3-37 [0054]
- KIESEL et al. *Leukemia Research II*, 1987, vol. 12, 1119 [0054] [0079]
- NADLER et al. *J. Immunol.*, 1983, vol. 131, 244 [0054]
- NADLER et al. *Progress in Hematology*. Grune & Stratton, Inc, 1981, vol. XII, 187-206 [0054]
- REFF et al. *Blood*, 1994, vol. 83 (2), 435-445 [0056]
- MALONEY et al. *Blood*, 1996, vol. 88 (10), 637a [0056]
- DEMIDEM et al. *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals*, 1997, vol. 12 (3), 177-186 [0056]
- CLARK et al. *PNAS (USA)*, 1985, vol. 82, 1766-1770 [0067]
- KABAT et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. Public Health Service, National Institutes of Health, 1991 [0068] [0097]
- SAVAGE et al. *J. Biol. Chem.*, 1972, vol. 247, 7612-7621 [0070]
- MARQUARDT et al. *Science*, 1984, vol. 223, 1079-1082 [0070]
- SHOYAB et al. *Science*, 1989, vol. 243, 1074-1076 [0070]
- KIMURA et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 257-260 [0070]
- COOK et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11, 2547-2557 [0070]
- SHING et al. *Science*, 1993, vol. 259, 1604-1607 [0070]
- SASADA et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 190, 1173 [0070]
- HIGASHIYAMA et al. *Science*, 1991, vol. 251, 936-939 [0070]
- TOYODA et al. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 7495-7500 [0070]
- KOMURASAKI et al. *Oncogene*, 1997, vol. 15, 2841-2848 [0070]

- ZHANG et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, vol. 94, 9562-9567 [0070]
- KANNAN et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272 (6), 3330-3335 [0070]
- MARCHIONNI et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 312-318 [0071]
- PELES et al. *Cell*, 1992, vol. 69, 205-216 [0071]
- FALLS et al. *Cell*, 1993, vol. 72, 801-815 [0071]
- HO et al. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 14523-14532 [0071]
- SCHAEFER. *Oncogene*, 1997, vol. 15, 1385-1394 [0071]
- CARPENTER et al. *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, vol. 56, 881-914 [0073]
- HUMPHREY et al. *PNAS (USA)*, 1990, vol. 87, 4207-4211 [0073]
- SEMBA et al. *PNAS (USA)*, 1985, vol. 82, 6497-6501 [0074]
- YAMAMOTO et al. *Nature*, 1986, vol. 319, 230-234 [0074]
- CLARK et al. *PNAS (USA)*, 1985, vol. 82, 1766 [0078]
- PRESS et al. *Blood*, 1987, vol. 69 (2), 584-591 [0078]
- VALENTINE et al. *Leukocyte Typing III*. Oxford University Press, 1987, 440 [0078]
- HEKMAN et al. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1991, vol. 32, 364-372 [0079]
- VLASVELD et al. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1995, vol. 40, 37-47 [0079]
- JUWEID et al. *Cancer Research*, 1995, vol. 55, 5899-5907 [0080]
- EMERY et al. *J. Interferon and Cytokine Research*, 1998, vol. 18 (5), A47 [0084]
- WARD et al. *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0091]
- BIRD et al. *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0091]
- HUSTON et al. *PNAS (USA)*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0091]
- HOLLINGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0091]
- ZAPATA et al. *Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0091]

- KOHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0092] [0183]
- CLACKSON et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0092] [0192]
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0094]
- PRESTA. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0094]
- VAUGHAN et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 309-314 [0095] [0200]
- SHEETS et al. *PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 6157-6162 [0095]
- HOOGENBOOM ; WINTER. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0095]
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0095]
- LONBERG et al. *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0095]
- MORRISON. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0095]
- FISHWILD et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0095]
- NEUBERGER. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0095]
- LONBERG ; HUSZAR. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0095]
- COLE et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, 1985, 77 [0095]
- BOERNER et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0095]
- KABAT et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. Health Service, National Institutes of Health, 1991 [0096]
- CHOTHIA ; LESK. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0097]
- BURTON. *Molec. Immunol.*, 1985, vol. 22, 161-206 [0102] [0104]
- RAVETCH ; KINET. *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-92 [0108] [0110]
- CLYNES et al. *PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 652-656 [0108]
- DAERON. *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234

[0110]

- CAPEL et al. *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0110]
- DE HAAS et al. *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-41 [0110]
- GUYER et al. *J. Immunol.*, 1976, vol. 117, 587 [0110]
- KIM et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 249 [0110]
- GAZZANO-SANTORO et al. *J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 202, 163 [0111]
- BARBAS et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA*, 1994, vol. 91, 3809-3813 [0112]
- SCHIER et al. *Gene*, 1995, vol. 169, 147-155 [0112]
- YELTON et al. *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 1994-2004 [0112]
- JACKSON et al. *J. Immunol.*, 1995, vol. 154 (7), 3310-9 [0112]
- HAWKINS et al. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0112]
- KOSTELNEY et al. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 1547-1553 [0117]
- ARAKAWA et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (45), 27833-27839 [0117]
- RADZIEJEWSKI et al. *Biochem.*, 1993, vol. 32 (48), 1350 [0117]
- ELLMAN et al. *Meth. Enzym.*, 1991, vol. 202, 301-336 [0118]
- NOREN et al. *Science*, 1989, vol. 244, 182 [0118]
- Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. MURAKAMI et al. *The Molecular Basis of Cancer*. WB Saunders, 1995, 13 [0124]
- MOORE et al. *Cytotechnology*, 1995, vol. 17, 1-11 [0126]
- Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0129]
- AGNEW. *Chem Intl. Ed. Engl.*, 1994, vol. 33, 183-186 [0144]
- WILMAN. *Prodrugs in Cancer Chemotherapy. Biochemical*

Society Transactions, 1986, vol. 14, 375-382 [0146]

- Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery. STELLA et al. Directed Drug Delivery. Humana Press, 1985, 247-267 [0146]

- FANGER. *Crit. Rev. Immunol.*, 1992, vol. 12, 101-124 [0173]

- NOLAN et al. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1990, vol. 1040, 1-11 [0173]

- HAMMERLING et al. *J. Exp. Med.*, 1968, vol. 128, 1461-1473 [0173]

- SONGSIVILAI et al. *Clin. Exp. Immunol.*, 1990, vol. 79, 315 [0174]

- LE DOUSSAL et al. *Int. J. Cancer Suppl.*, 1992, vol. 7, 58-62 [0174]

- LE DOUSSAL et al. *J. Nucl. Med.*, 1993, vol. 34, 1662-1671 [0174]

- STICKNEY et al. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 6650-6655 [0174]

- SEGAL et al. *Chem. Immunol.*, 1989, vol. 47, 179 [0175]

- SEGAL et al. *Biologic Therapy of Cancer*. J.B. Lip-pincott, 1992, vol. 2, 1 [0175]

- HSEIH-MA et al. *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 6832-6839 [0175]

- WEINER et al. *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 94-100 [0175]

- SHALABY et al. *J. Exp. Med*, 1992, vol. 175 (1), 217 [0175]

- DELEIJ et al. *Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity*. Lienhart, 1991, 249 [0175]

- CLARK et al. *Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity*. Lienhart, 1991, 243 [0175]

- KROESEN et al. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1993, vol. 37, 400-407 [0175]

- KROESEN et al. *Br. J. Cancer*, 1994, vol. 70, 652-661 [0175]

- WEINER et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 2385 [0175]
- GODING. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, 1986, 59-103 [0184] [0189] [0197] [0198]
- KOZBOR. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0186] [0197]
- BRODEUR et al. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0186] [0197]
- MUNSON et al. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0188]
- SKERRA et al. *Curr. Opinion in Immunol.*, 1993, vol. 5, 256-262 [0191]
- PLUCKTHUN. *Immunol. Revs.*, 1992, vol. 130, 151-188 [0191]
- MCCAFFERTY et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0192]
- WATERHOUSE et al. *Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0192]
- MORRISON et al. *Proc. Nat/ Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0193]
- SHOENFELD et al. *J. Clin. Invest.*, 1982, vol. 70, 205 [0195]
- NUGENT et al. *Blood*, 1987, vol. 70 (1), 16-22 [0195]
- JAKOBOVITS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0199]
- JAKOBOVITS et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0199]
- BRUGGERMANN et al. *Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0199]
- HUSE et al. *Science*, 1989, vol. 246, 1275 [0200]
- BARBAS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1991, vol. 88, 7978-7982 [0200]
- HOOGENBOOM ; WINTER. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 227, 381-388 [0200]
- BARBAS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1992, vol. 89, 4457-4461 [0200]
- GRIFFITHS et al. *EMBO Journal*, 1994, vol. 13, 3245-3260 [0200]
- DE KRUIF et al. *J. Mol. Biol.*, 1995, vol. 248, 97-105 [0200]

- SIMS et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0202]
- CHOTHIA et al. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0202]
- CARTER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0202]
- PRESTA et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0202]
- MORIMOTO et al. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0204]
- BRENNAN et al. *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0204]
- CARTER et al. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0204] [0274]
- CUNNINGHAM ; WELLS. *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0206]
- DUNCAN ; WINTER. *Nature*, 1988, vol. 322, 738-40 [0227]
- CHARI et al. *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 127-131 [0232] [0237]
- HINMAN et al. *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 3336-3342 [0233]
- LODE et al. *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 2925-2928 [0233]
- MASSEY. *Nature*, 1987, vol. 328, 457-458 [0242]
- NEUBERGER. *Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0243]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980 [0244] [0276] [0278]
- EPSTEIN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0245]
- HWANG et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0245]
- MARTIN et al. *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0246]
- GABIZON et al. *J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0246]
- STINCHCOMB et al. *Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0257]
- JONES. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0257]
- K. LACTIS ; VAN DEN BERG. *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0258]

- FLEER et al. *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0258]
- REYES et al. *Nature*, 1982, vol. 297, 598-601 [0264]
- YANIV. *Nature*, 1982, vol. 297, 17-18 [0265]
- GRAHAM et al. *J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0271]
- URLAUB et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0271]
- MATHER. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0271]
- MATHER et al. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1982, vol. 383, 44-68 [0271]
- HAM. *Meth. Enz.*, 1979, vol. 58, 44 [0273]
- BARNES et al. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102, 255 [0273]
- LINDMARK et al. *J. Immunol. Meth.*, 1983, vol. 62, 1-13 [0275]
- GUSS et al. *EMBO J*, 1986, vol. 5, 1567-1575 [0275]
- Current Protocols in Immunology. Wiley-Inter- science, 1991, vol. 1 and 2 [0283]
- Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay. O'SULLIVAN et al. *Methods in Enzym.* Academic press, 1981, vol. 73, 147-166 [0283]
- ZOLA. *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*. CRC Press, Inc, 1987, 147-158 [0288]
- SCHER et al. *Clin. Cancer Research*, 1995, vol. 1, 545-550 [0297]
- WU et al. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0308]
- WAGNER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 3410-3414 [0308]
- ANDERSON et al. *Science*, 1992, vol. 256, 808-813 [0308]
- GRAHAM et al. *J. Gen. Virol.*, 1977, vol. 36, 59-72 [0317]
- SIAS et al. *J. Immunol. Methods*, 1990, vol. 132, 73-80 [0318]
- LEWIS et al. *Cancer Immuno. Immunother.*, 1993, vol. 37, 255-263 [0321]
- KOOPMAN et al. *Blood*, 1994, vol. 84, 1415-1420 [0338]

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo isolado que compreende um primeiro e segundo polipéptido de cadeia pesada, pelo menos dois polipéptidos de cadeia leve e quatro sítios de ligação a antigénio, em que os ditos primeiro e segundo polipéptidos de cadeia pesada compreendem

$$VD1-(X)_n-VD2-(X2)_n-Fc,$$

em que VD1 é um primeiro domínio variável de cadeia pesada (VH), VD2 é um segundo domínio VH, Fc é uma região Fc, X1 e X2 representam um aminoácido ou polipéptido e n é 0 ou 1, em que cada dos pelo menos dois polipéptidos de cadeia leve compreende um domínio variável de cadeia leve (VL), em que cada dos ditos quatro sítios de ligação a antigénio é formado por um domínio VH do primeiro ou segundo polipéptido de cadeia pesada e um domínio VL dos pelo menos dois polipéptidos de cadeia leve.

2. O anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo compreende dois polipéptidos de cadeia leve.

3. O anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que os dois domínios variáveis de cadeia pesada estão fusionados em conjunto.

4. O anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que X2 do primeiro polipéptido de cadeia pesada e do segundo polipéptido de cadeia pesada compreende um domínio CH1, em que CH1 é um domínio constante de cadeia pesada.

5. O anticorpo de acordo com a reivindicação 3 ou 4, em que $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ do primeiro polipéptido de cadeia pesada e do segundo polipéptido de cadeia pesada compreende VH-VH-CH1-Fc.

6. O anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 4, em que X1 compreende um ligante flexível em posição C-terminal em relação a VD1.

7. O anticorpo de acordo com a reivindicação 6, em que VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc do primeiro polipéptido de cadeia pesada e do segundo polipéptido de cadeia pesada compreende VH-ligante flexível-CH1-Fc.

8. O anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que os pelo menos dois polipéptidos de cadeia leve compreendem adicionalmente um domínio constante de cadeia leve (domínio CL).

9. O anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo compreende pelo menos quatro ou mais domínios VL e em que cada domínio VL está opcionalmente fusionado a um domínio CL.

10. O anticorpo de acordo com a reivindicação 9, em que os pelo menos dois polipéptidos de cadeia leve compreendem cada um VL-VL-CL.

11. O anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 6-10, em que o ligante flexível compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em gly-ser, gly-ser-gly-ser (SEQ ID NO:10), ala-ser e gly-gly-gly-ser (SEQ ID NO:11).

12. O anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o dito anticorpo não compreende uma sequência nativa de um anticorpo IgM ou IgA.

13. O anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o dito anticorpo é

internalizado mais rapidamente do que um anticorpo bivalente por uma célula que expressa um antígeno ao qual os anticorpos se ligam.

14. O anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que os quatro sítios de ligação a antígeno se ligam todos ao mesmo antígeno.

15. O anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, em que os quatro sítios de ligação a antígeno se ligam a dois ou mais antígenos diferentes.

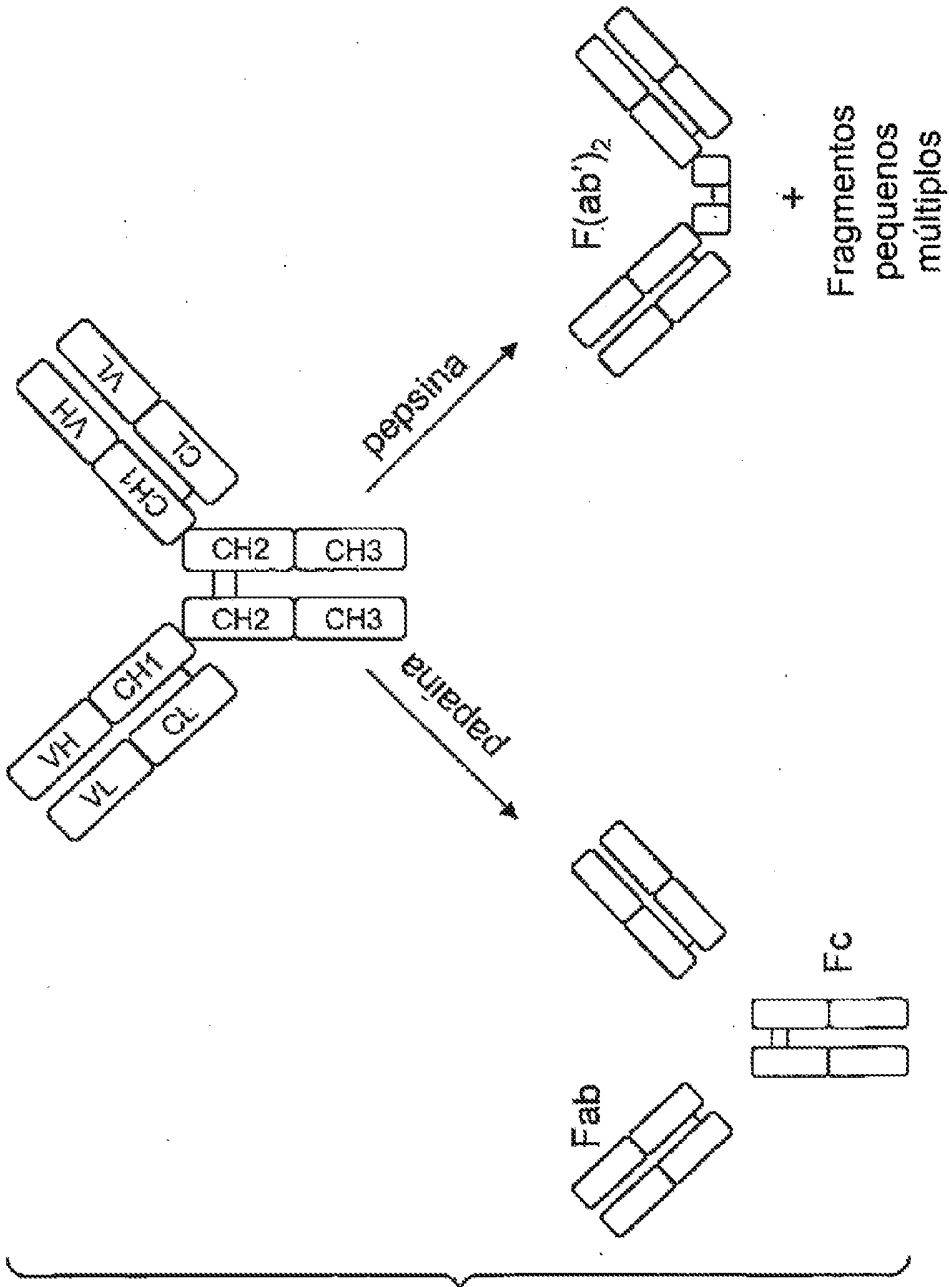


FIG. 1

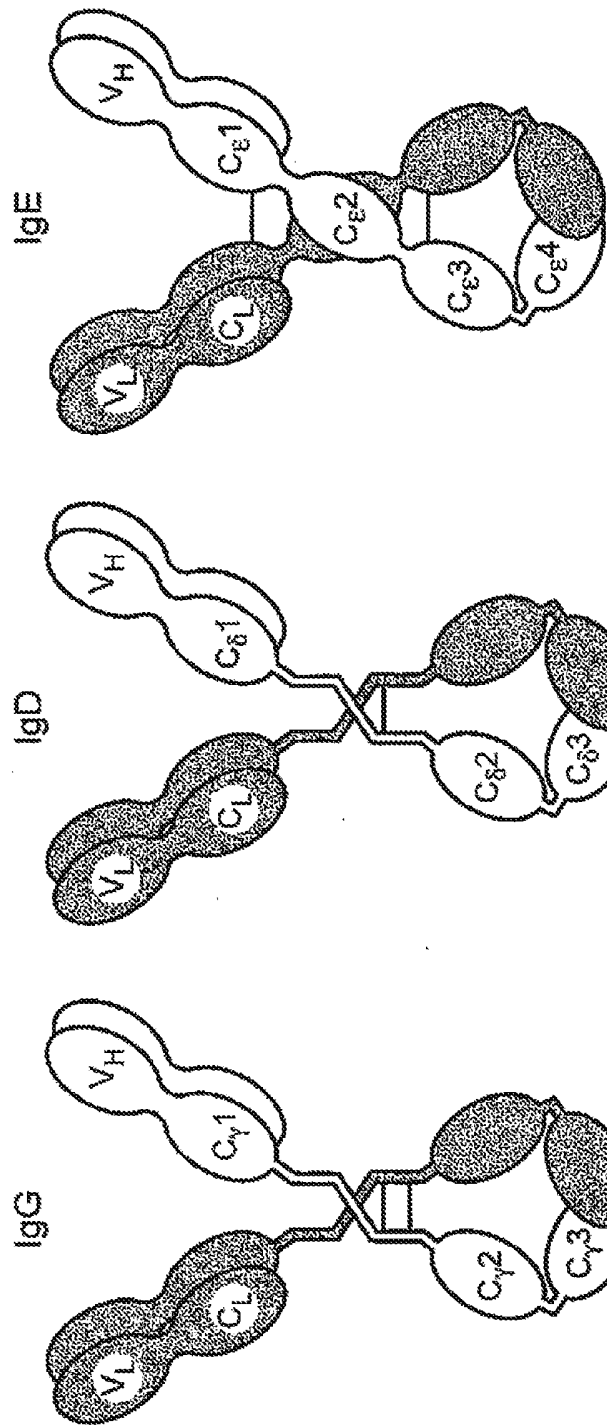
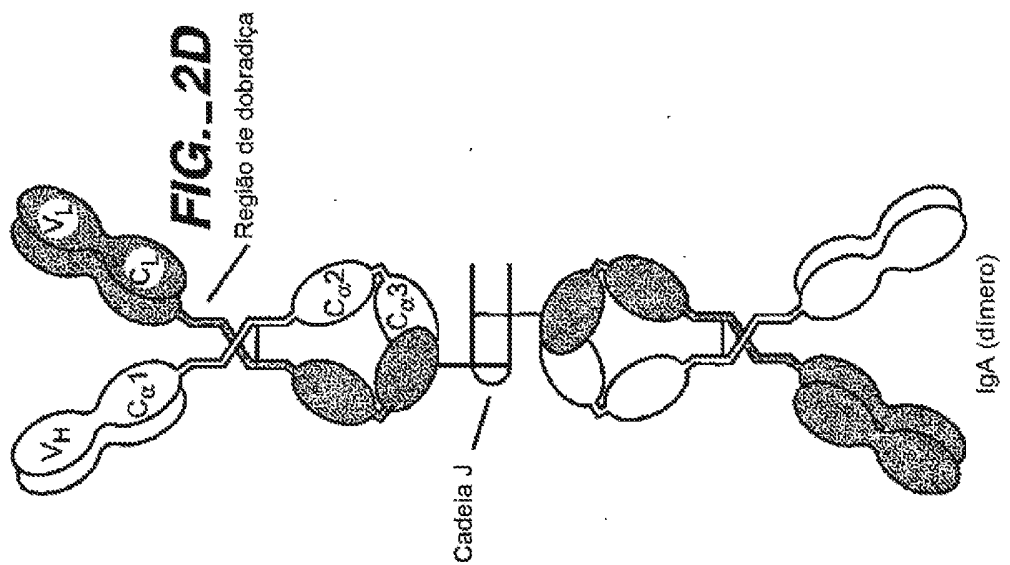
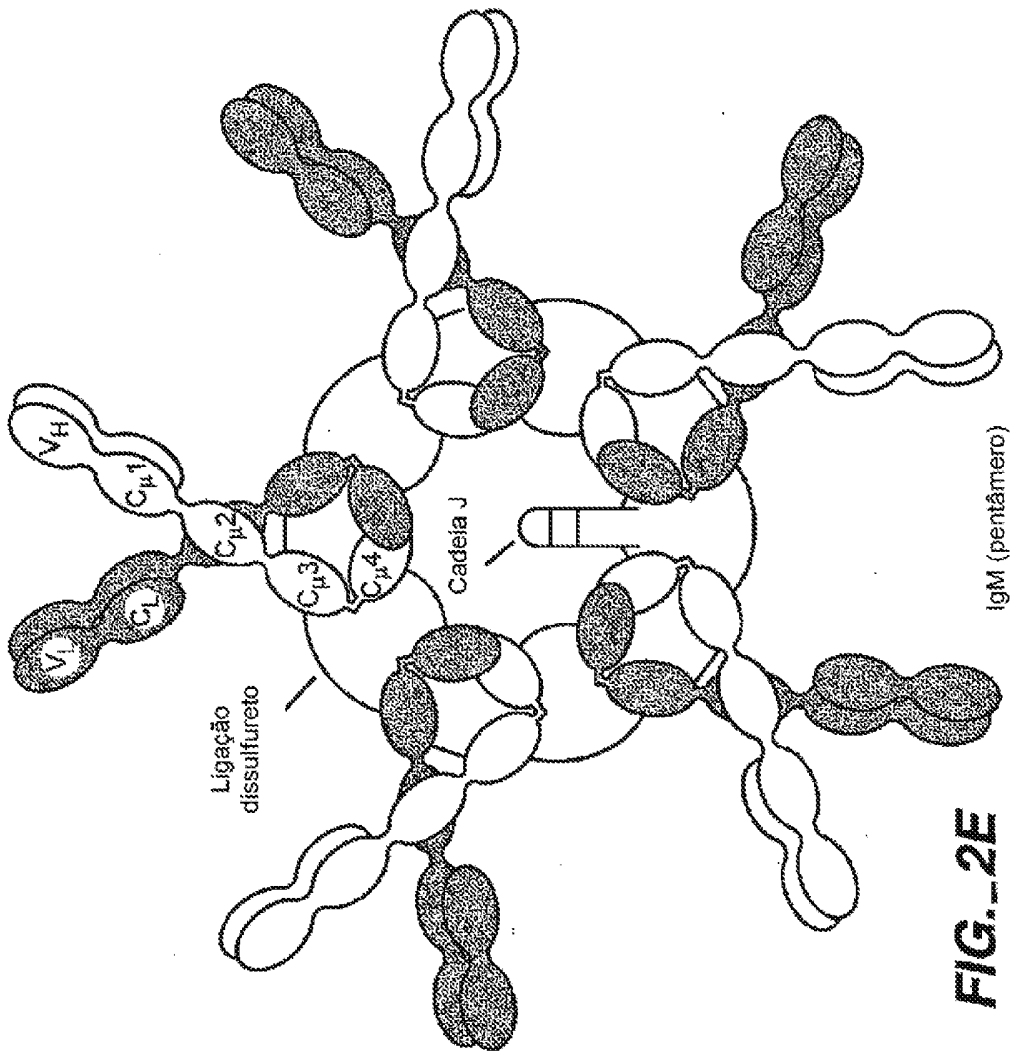


FIG._2C

FIG._2B

FIG._2A



	230	240	250	260	270
IgG1 hum	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
IgG2 hum	PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
IgG3 hum	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
IgG4 hum	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
IgG1 mur	---TVPEVSSVFIFFPKPKDVLTTITLTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFNWYV				
IgG2A mur	FAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWYV				
IgG2B mur	FAPNLEGGPSVFIFFPNIKDVLMISSLTPKVTCTVVVDVSEDDPDVQISWYV				
IgG3 mur	PPGNILGGPSVFIFFPKPKDALMISLTPKVTCTVVVDVSEDDPDVHVSWYV				
	280	290	300	310	320
IgG1 hum	DGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHODMNLGKEYKCKVSNKALP				
IgG2 hum	DGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHODMNLGKEYKCKVSNKALP				
IgG3 hum	DGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHODMNLGKEYKCKVSNKALP				
IgG4 hum	DGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHODMNLGKEYKCKVSNKALP				
IgG1 mur	DDVEVHTAQTQPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHODMNLGKEYKCKVSNKALP				
IgG2A mur	NNVEVHTAQTQTHREDYNSTYRVVSVLTVTLHODMNLGKEYKCKVSNKALP				
IgG2B mur	NNVEVHTAQTQTHREDYNSTYRVVSVLTVTLHODMNLGKEYKCKVSNKALP				
IgG3 mur	DNKEVHTAQTQPREAQYNSTYRVVSVLTVTLHODMNLGKEYKCKVSNKALP				
	330	340	350	360	370
IgG1 hum	APIEKTISKARGQPRKQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
IgG2 hum	APIEKTISKARGQPRKQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
IgG3 hum	APIEKTISKARGQPRKQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
IgG4 hum	APIEKTISKARGQPRKQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
IgG1 mur	APIEKTISKARGQPRKQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
IgG2A mur	APIERTISKPRGSRAPQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
IgG2B mur	APIERTISKPRGSRAPQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
IgG3 mur	APIERTISKPRGSRAPQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
	380	390	400	410	420
IgG1 hum	EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
IgG2 hum	EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
IgG3 hum	EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
IgG4 hum	EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
IgG1 mur	EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
IgG2A mur	EWTNNGKTELNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
IgG2B mur	EWTNNGKTELNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
IgG3 mur	EWTNNGKTELNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
	430	440			
IgG1 hum	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
IgG2 hum	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
IgG3 hum	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
IgG4 hum	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
IgG1 mur	EGLHNHHTKSLSHSPGK				
IgG2A mur	EGLHNHHTKSLSHSPGK				
IgG2B mur	EGLHNHHTKSLSHSPGK				
IgG3 mur	EGLHNHHTKSLSHSPGK				

FIG. 3

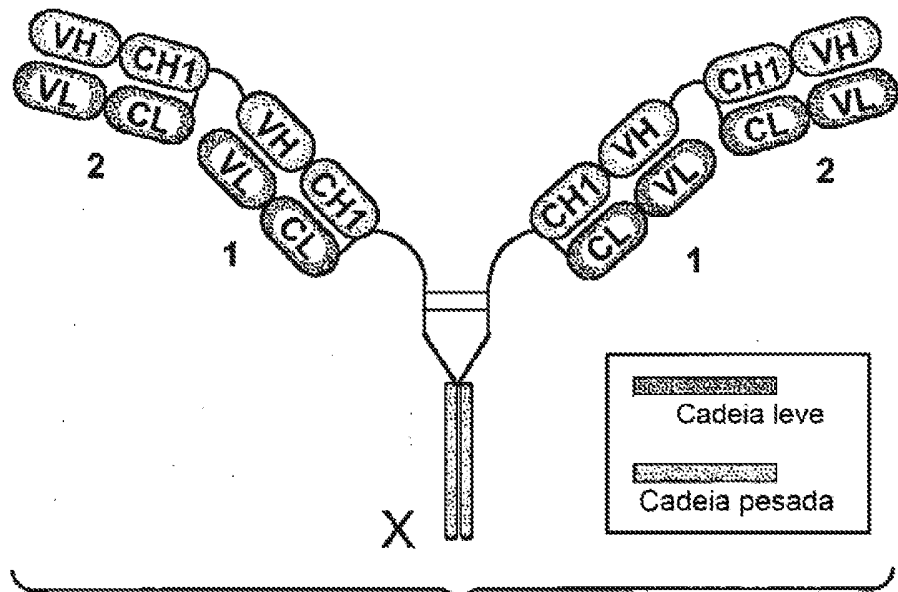


FIG._4A

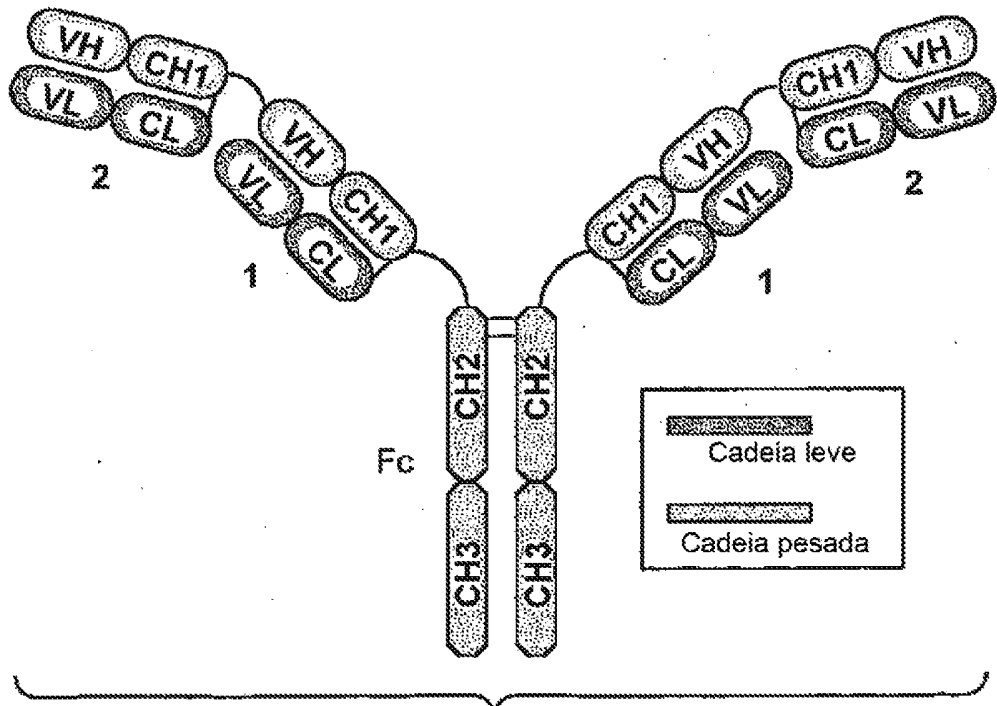


FIG._4B

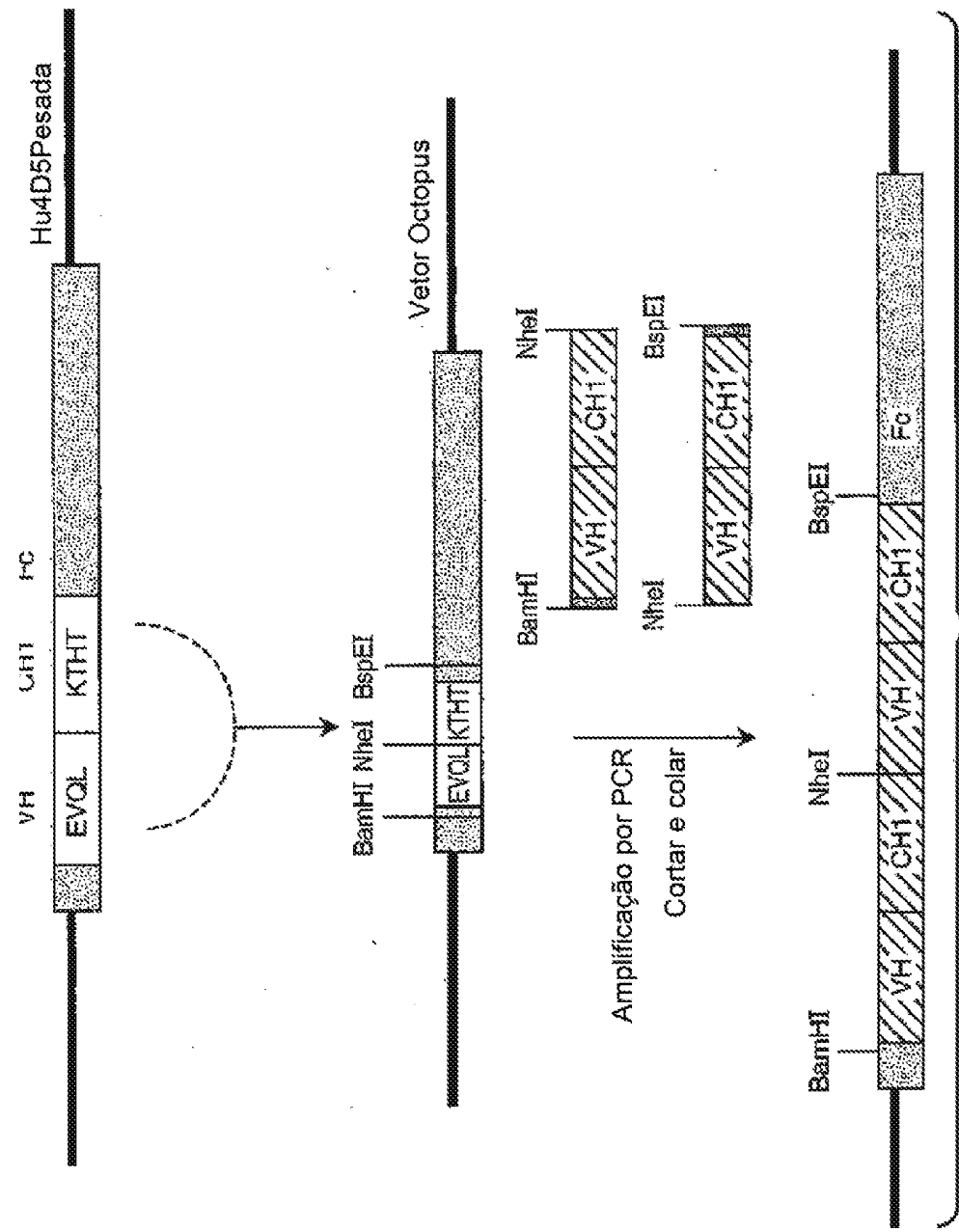
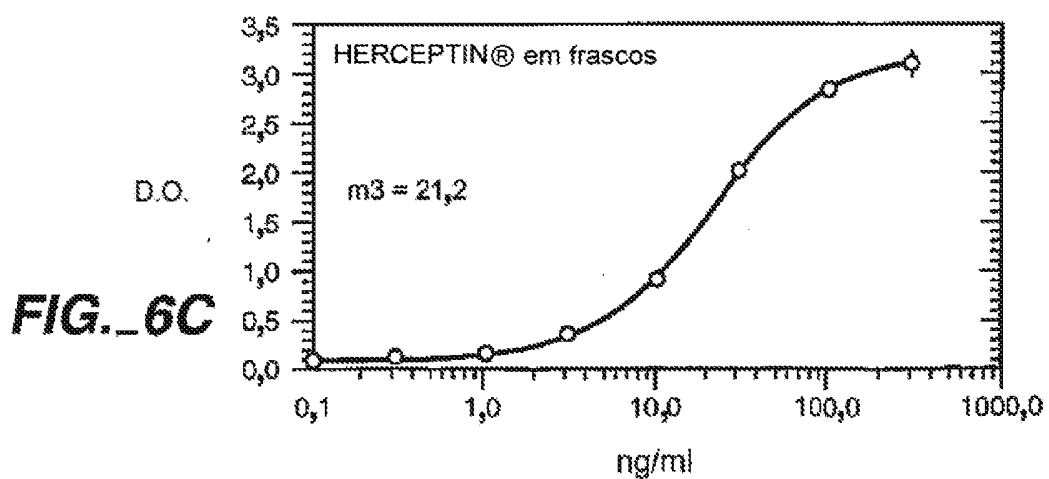
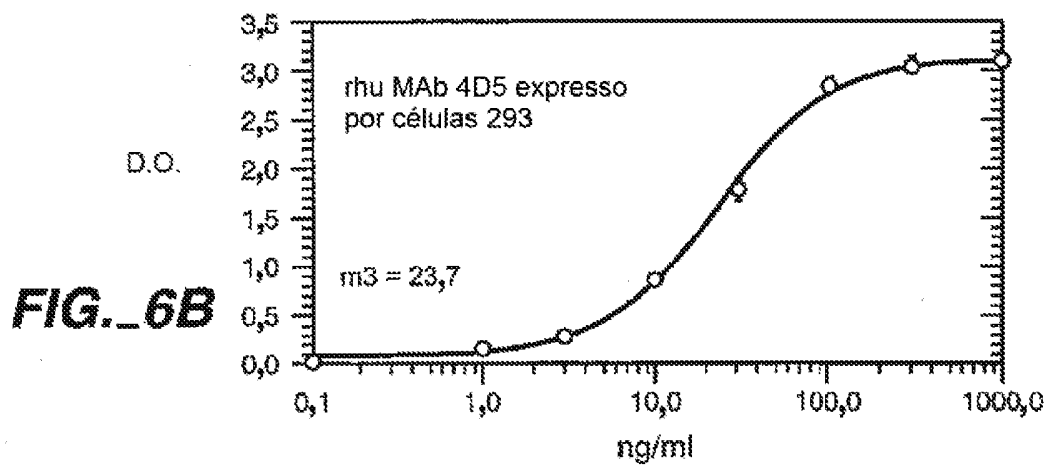
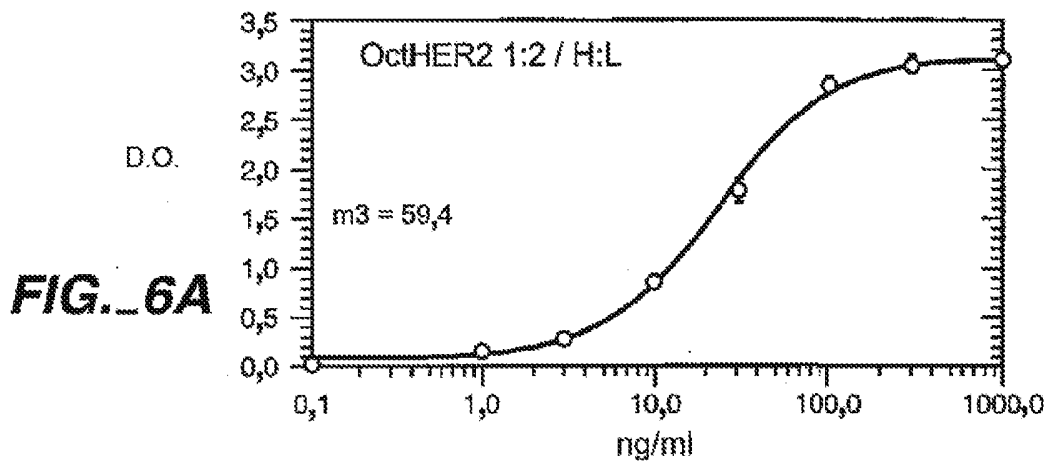
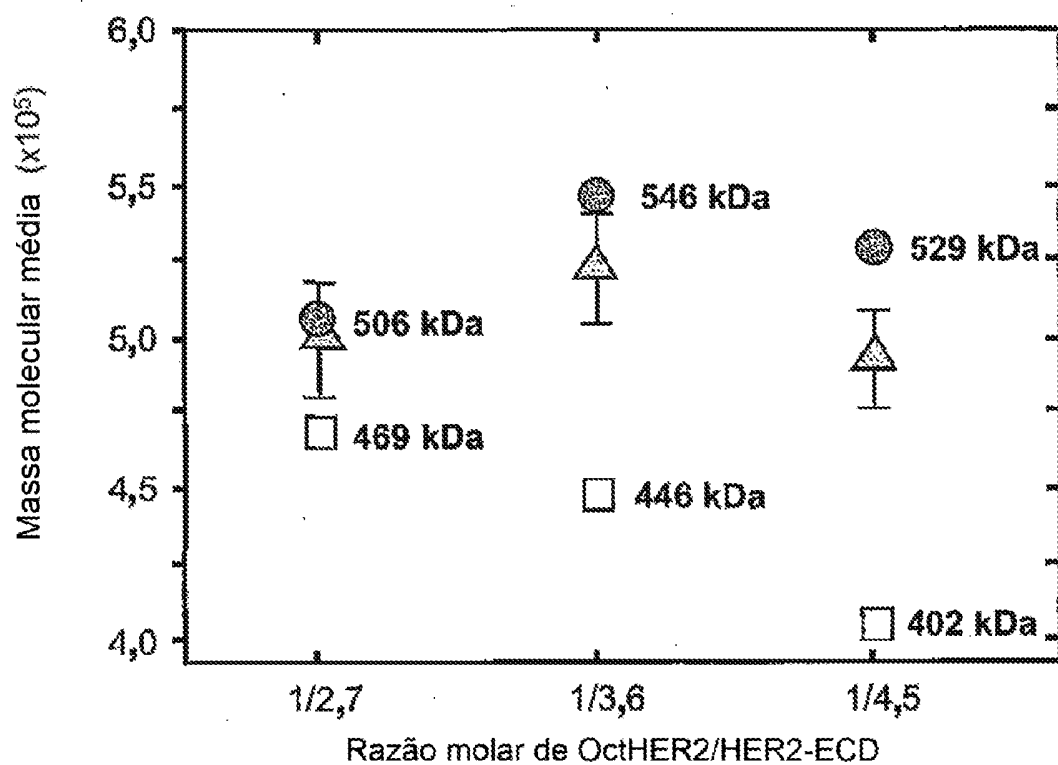


FIG._5



**FIG. 7**

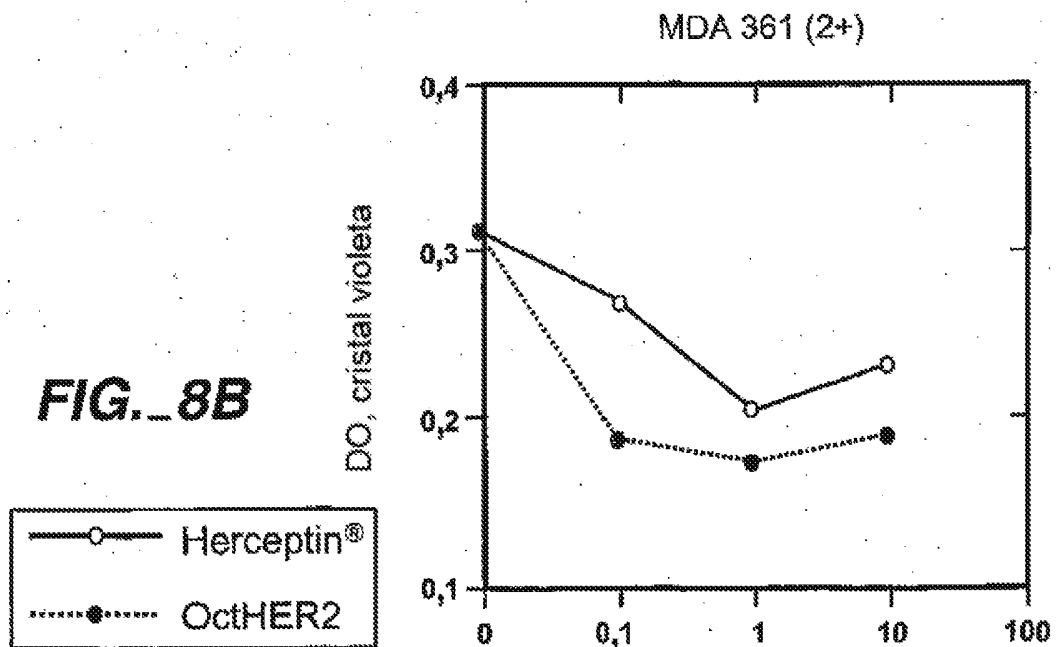
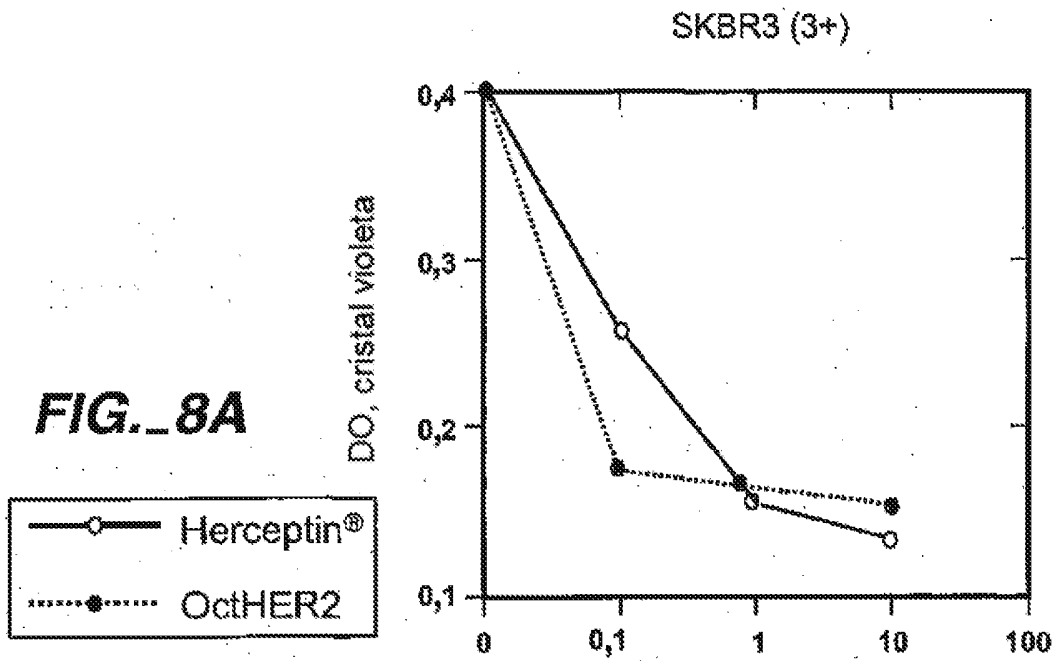


FIG. 8C

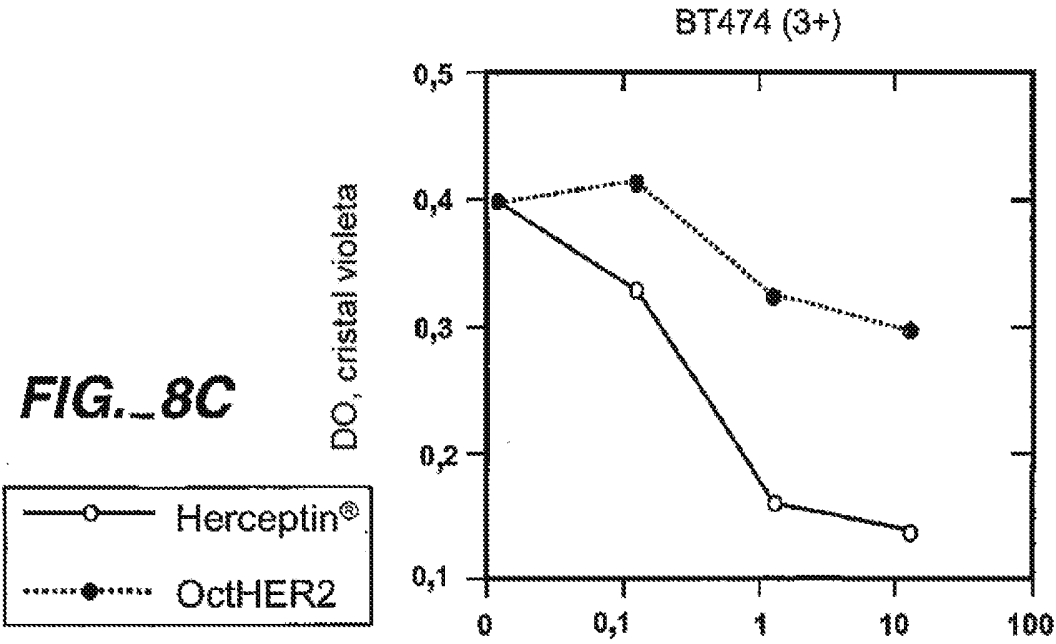
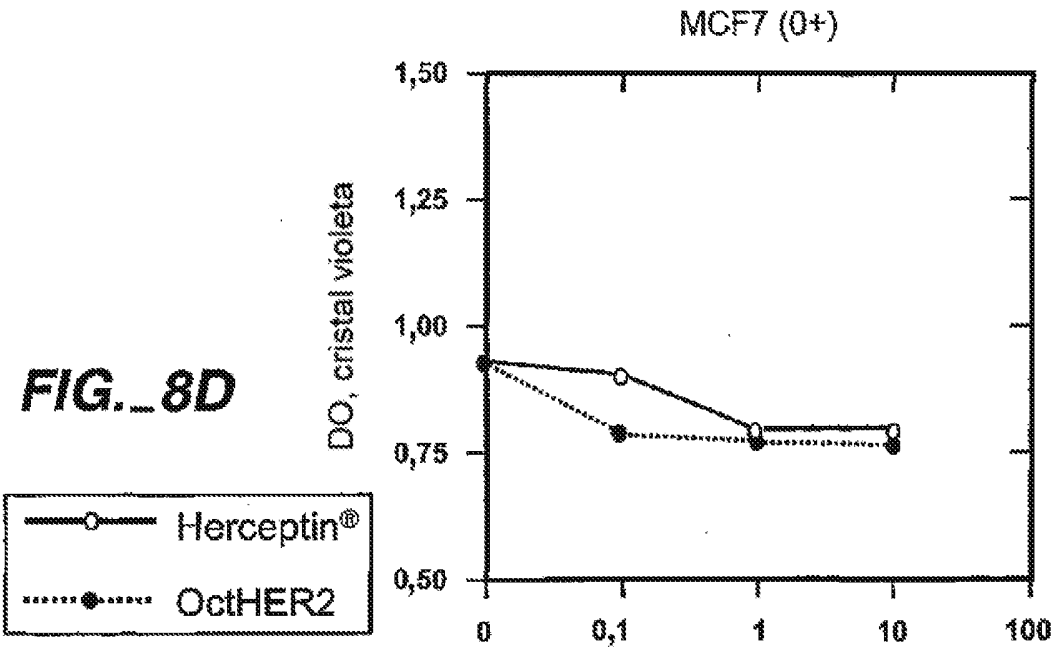
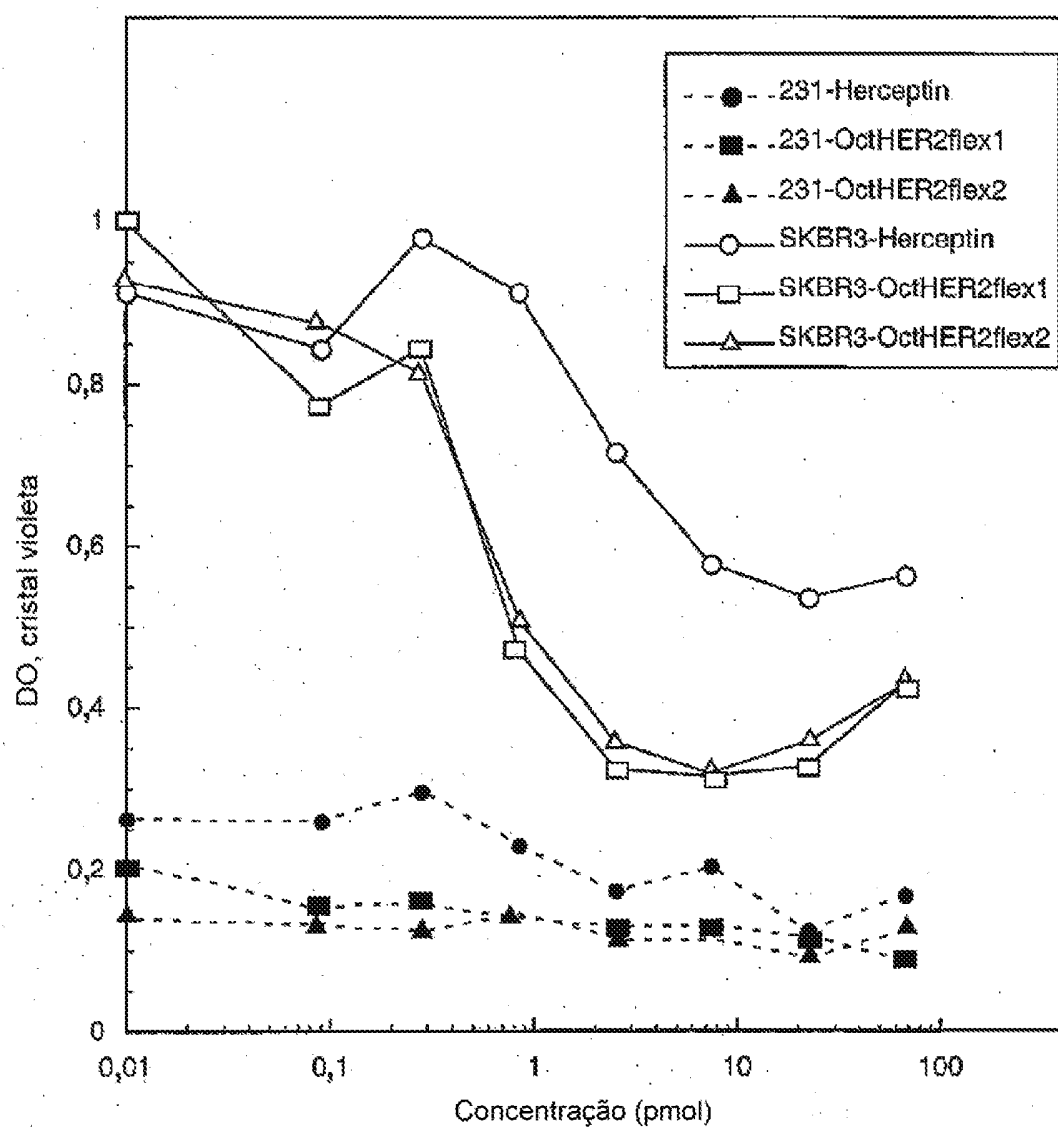
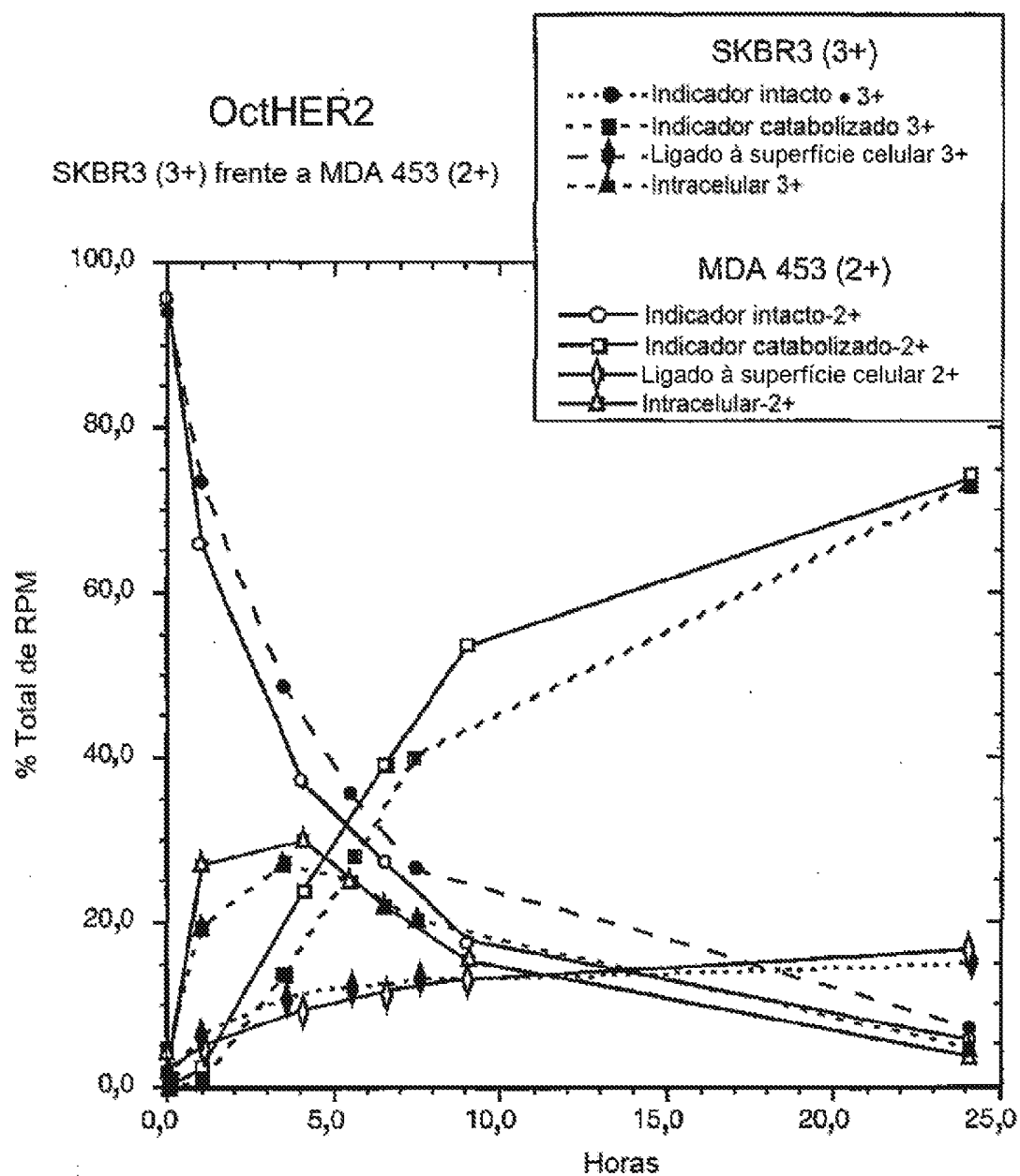
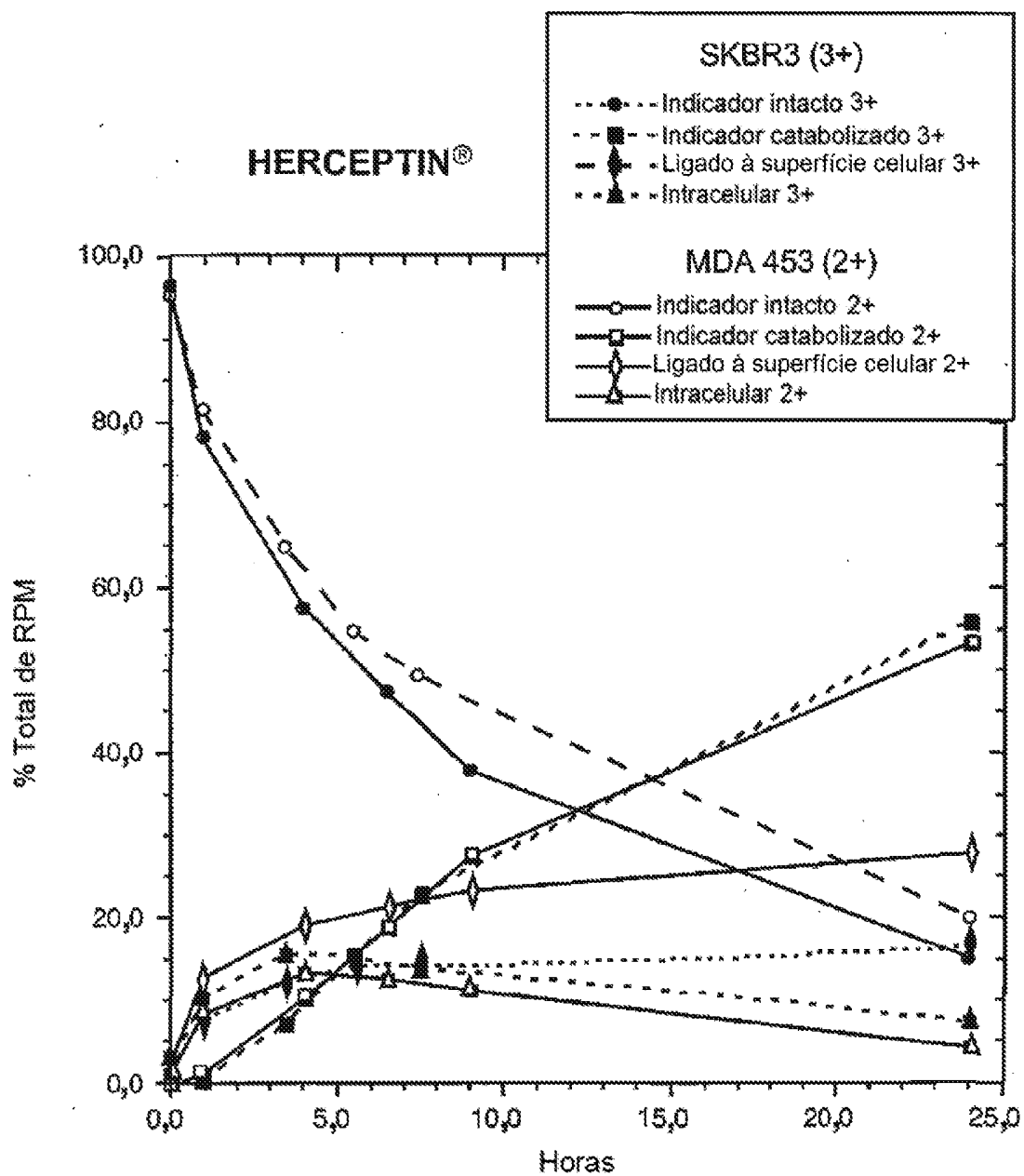


FIG. 8D



**FIG. 9**

**FIG. 10A**

**FIG. 10B**

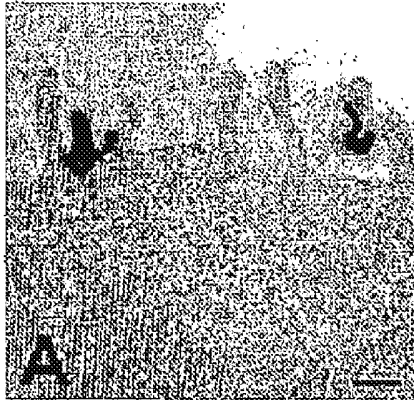


FIG. 11A

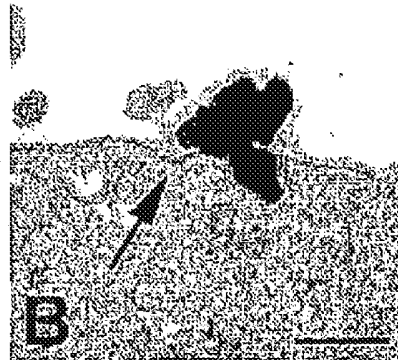


FIG. 11B

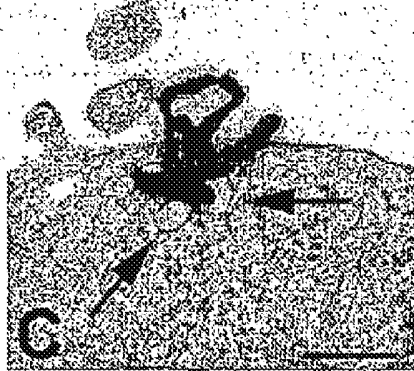


FIG. 11C

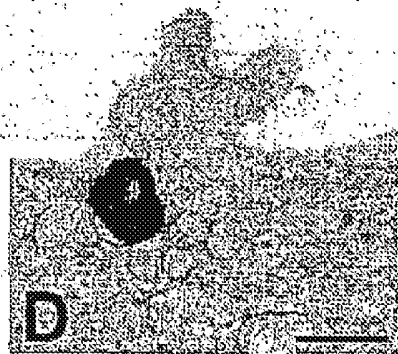


FIG. 11D

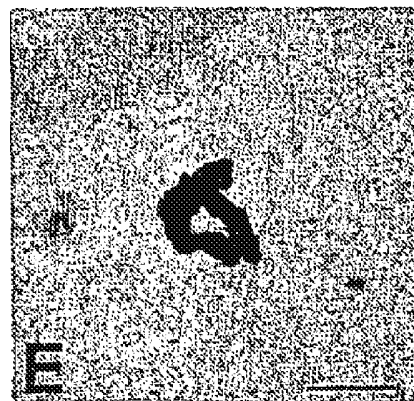


FIG. 11E

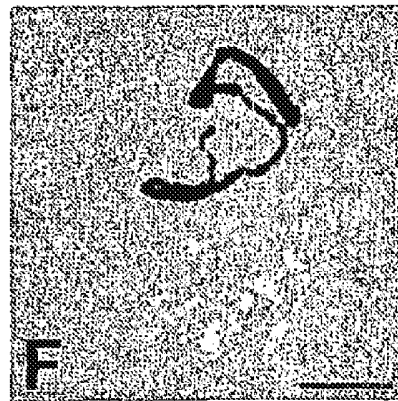
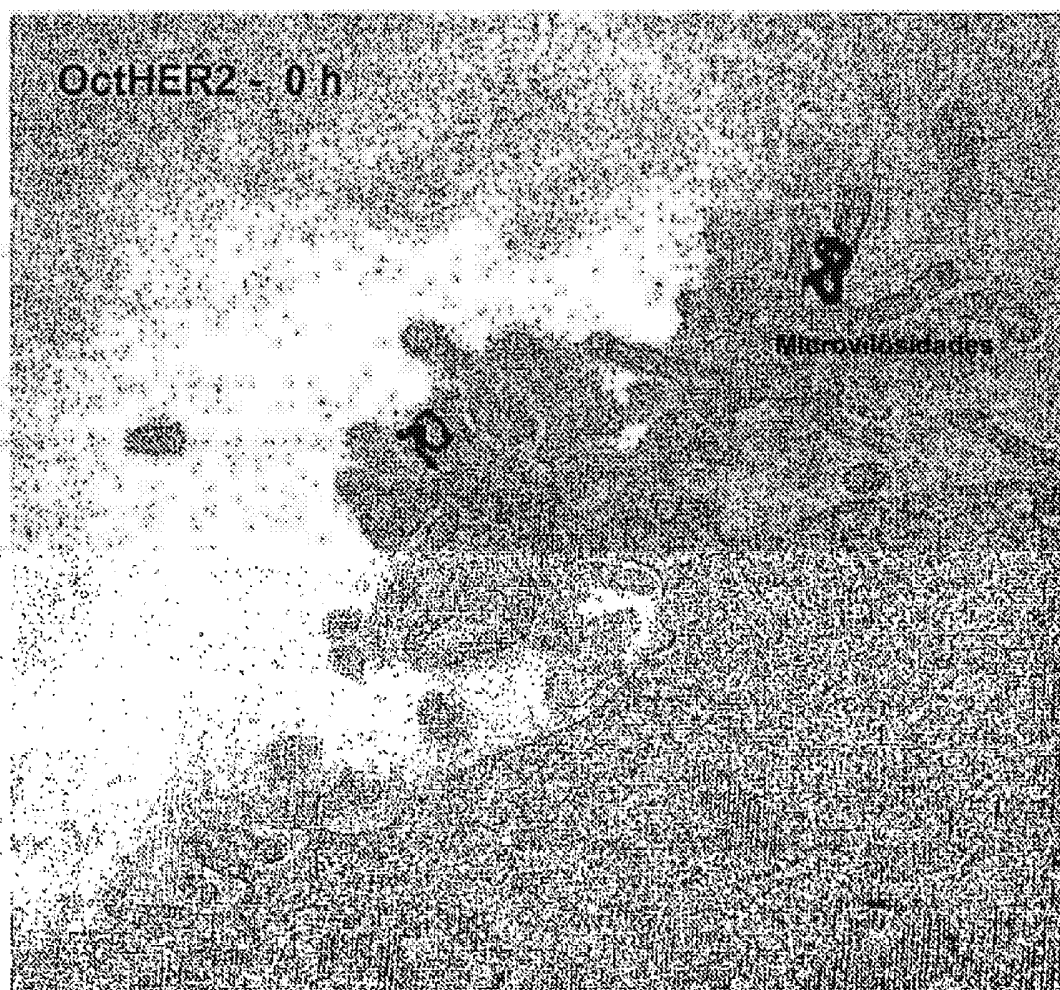


FIG. 11F

**FIG. 11G**

OctHER2 - 5 h

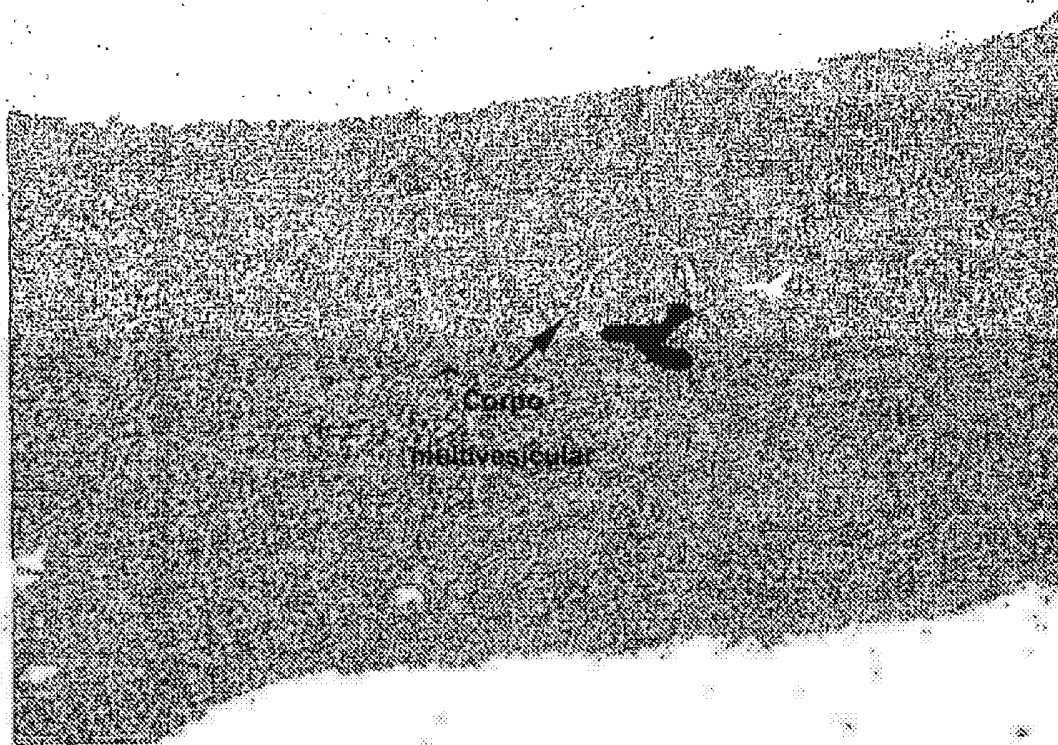
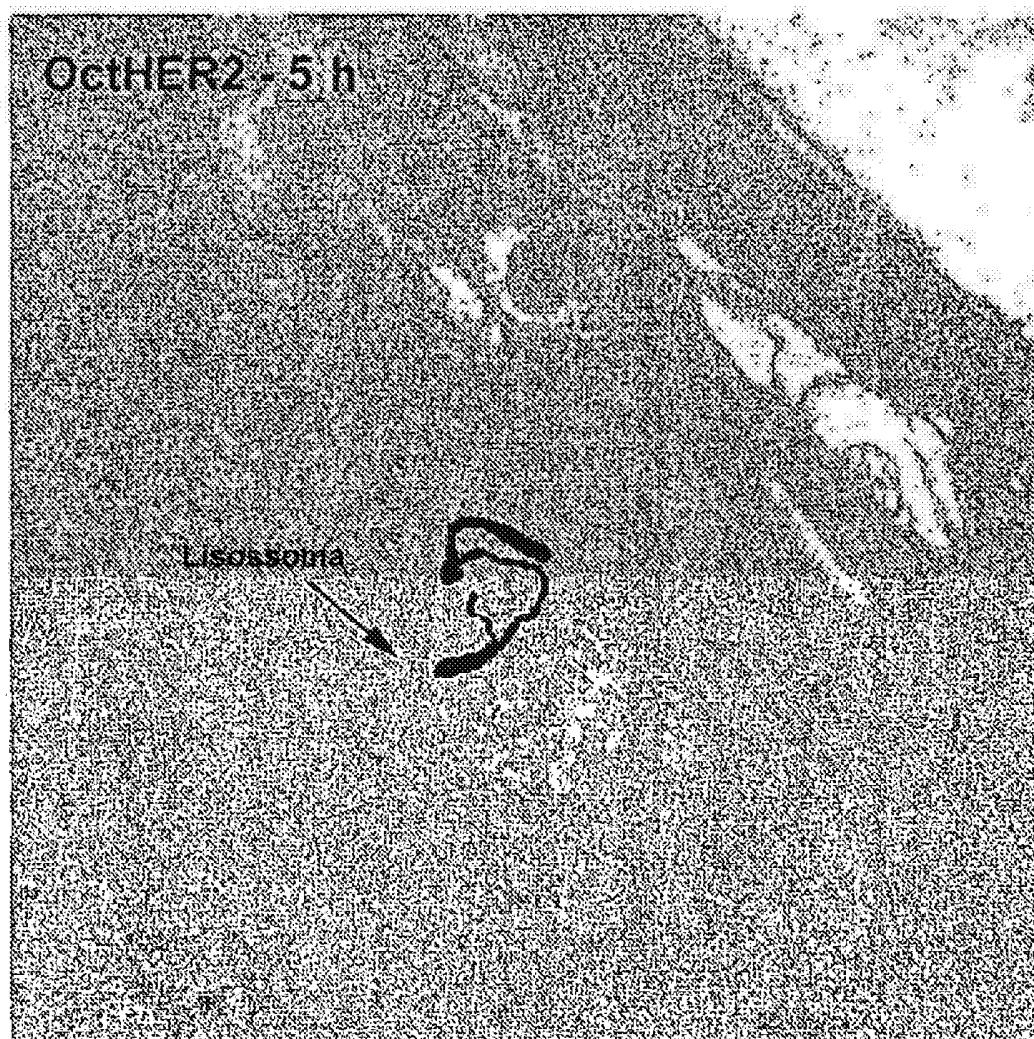
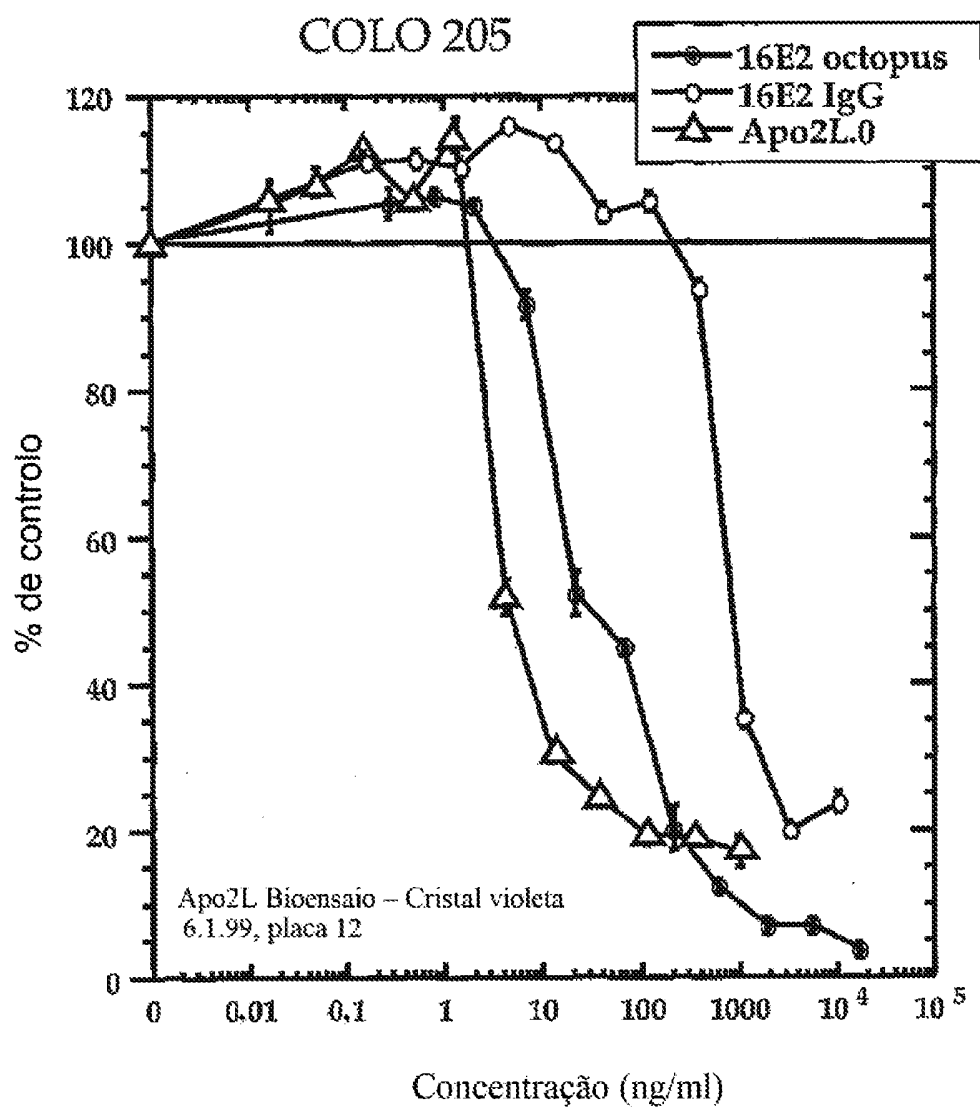
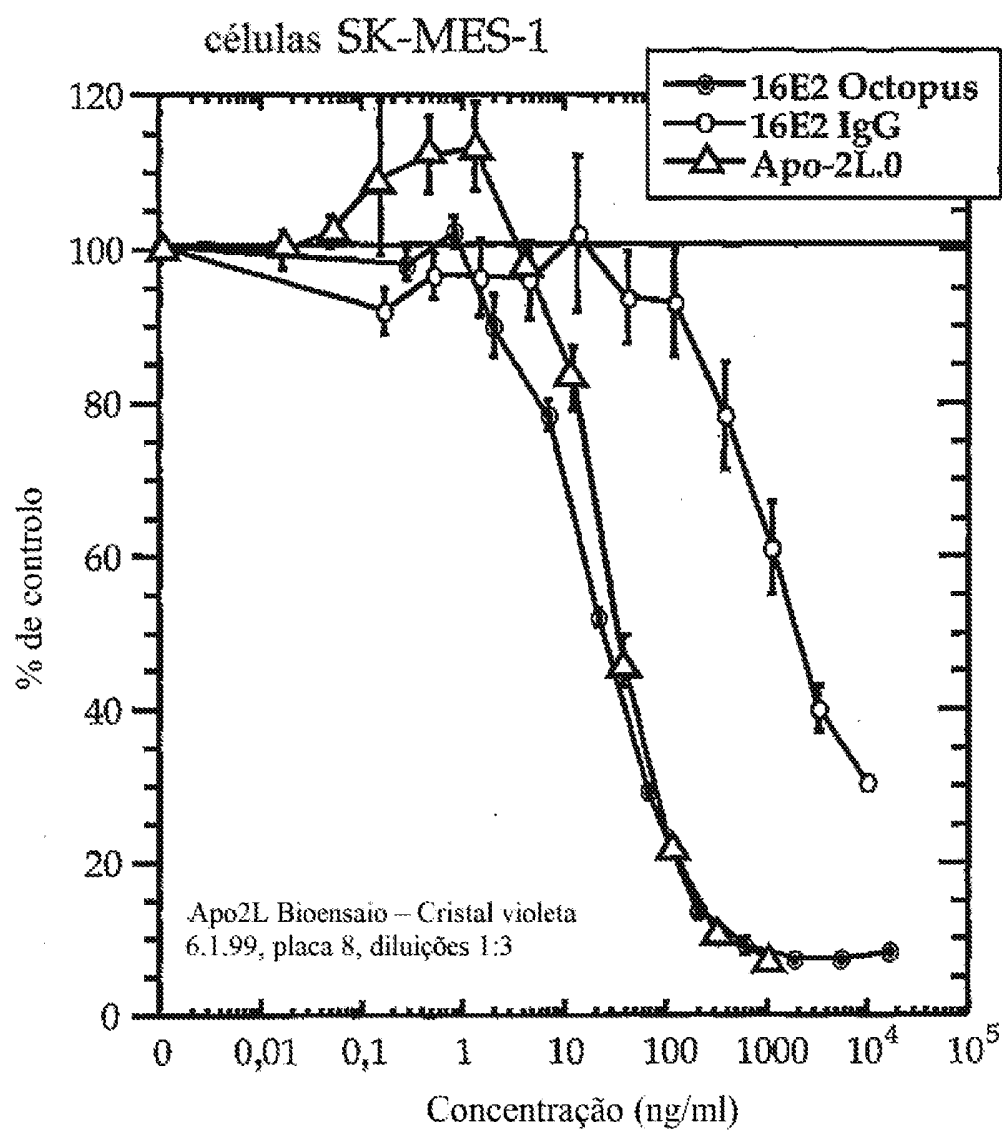
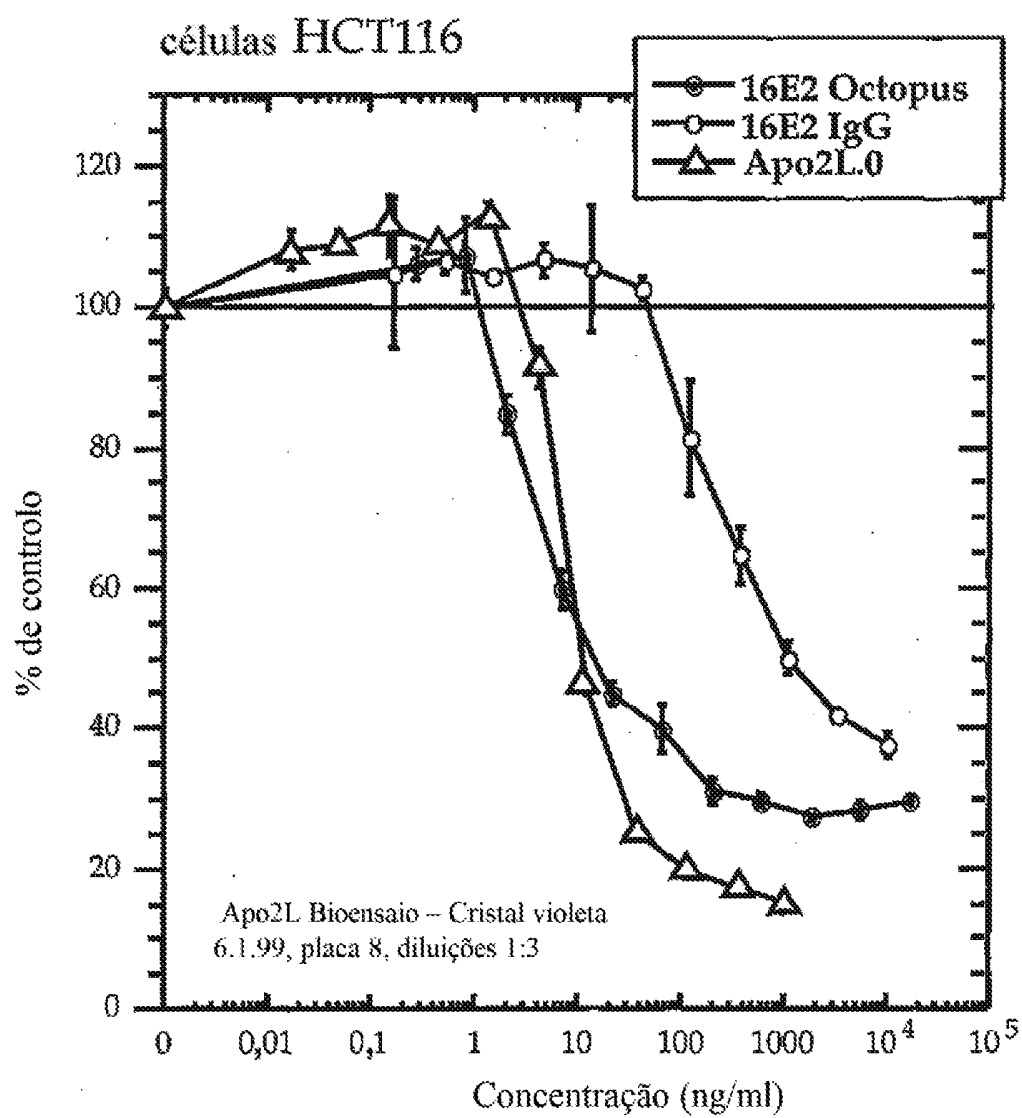


FIG. 11H

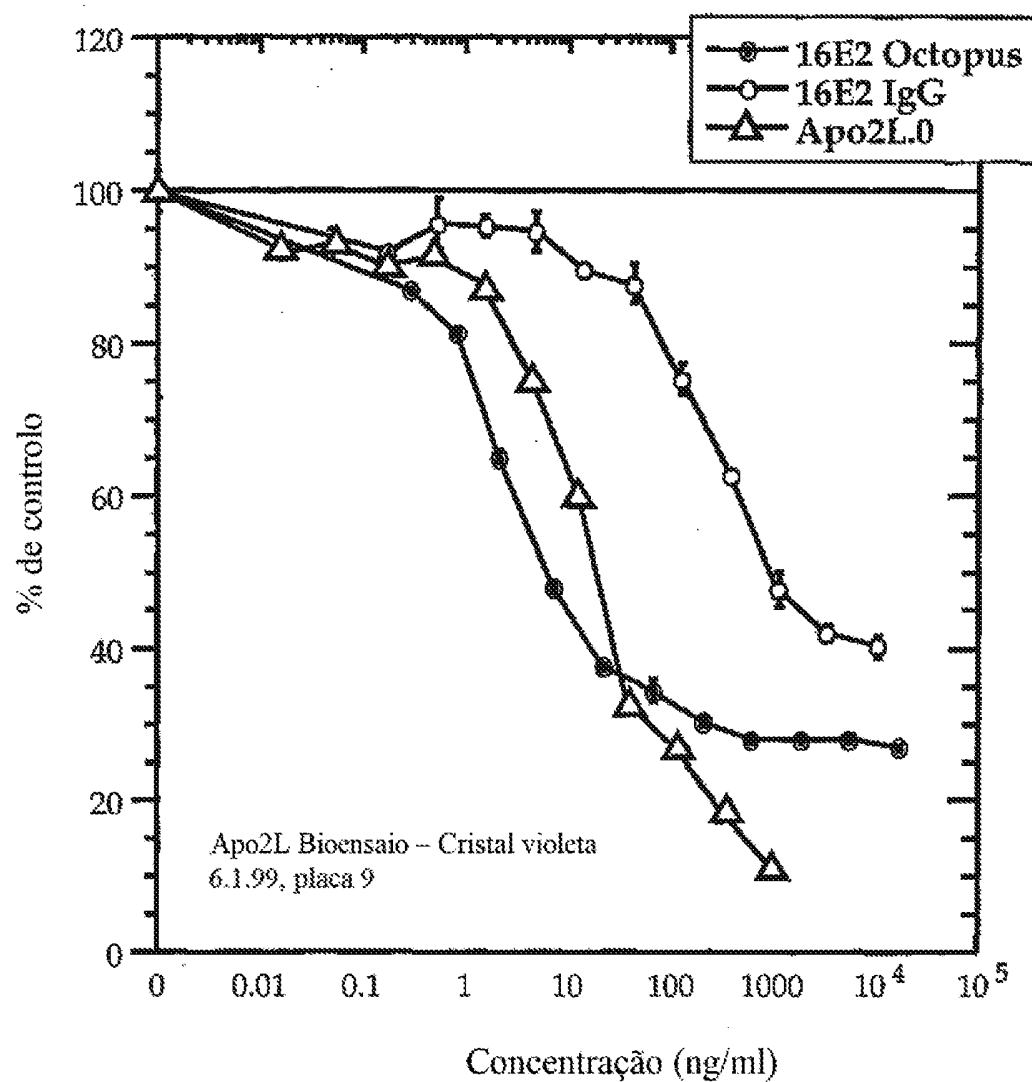
**FIG._11I**

**FIG. 12A**

**FIG. 12B**

**FIG. 12C**

HOP 92

**FIG. 12D**

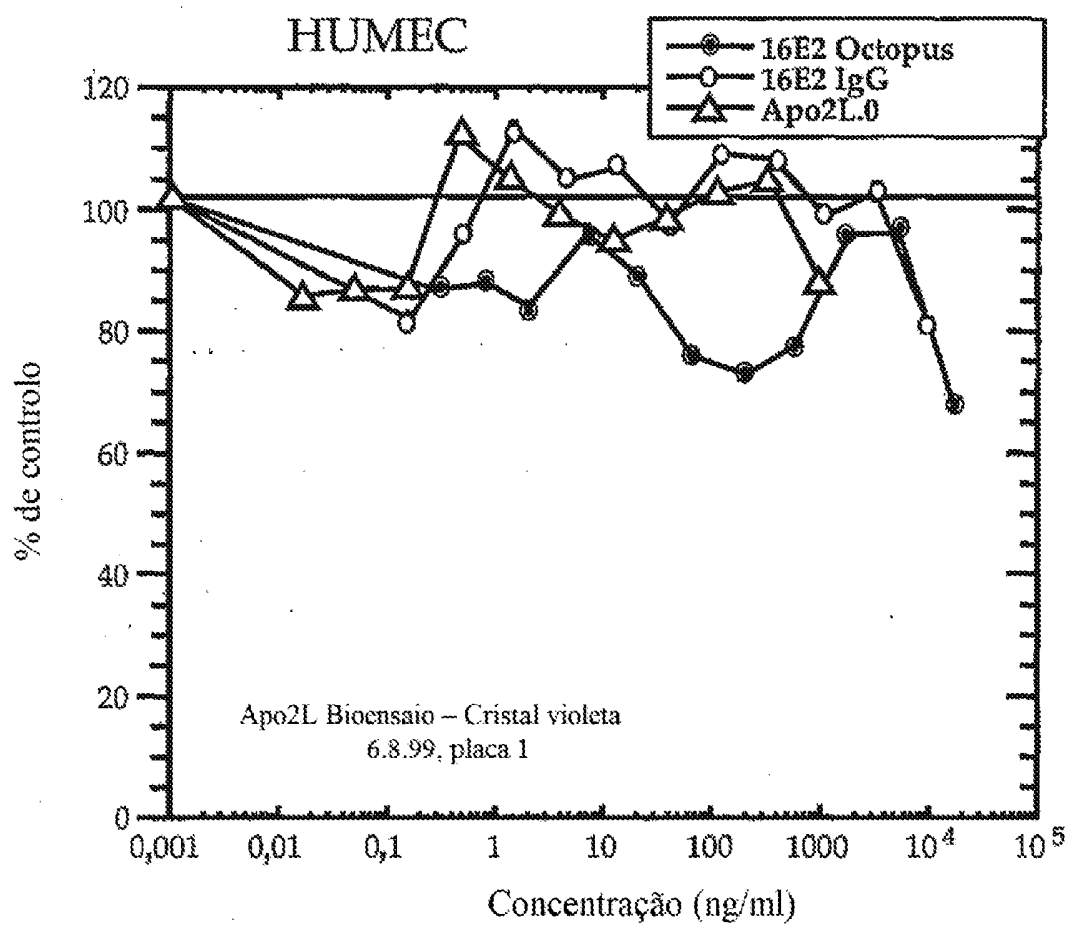
**FIG. 12E**

FIG. 13A

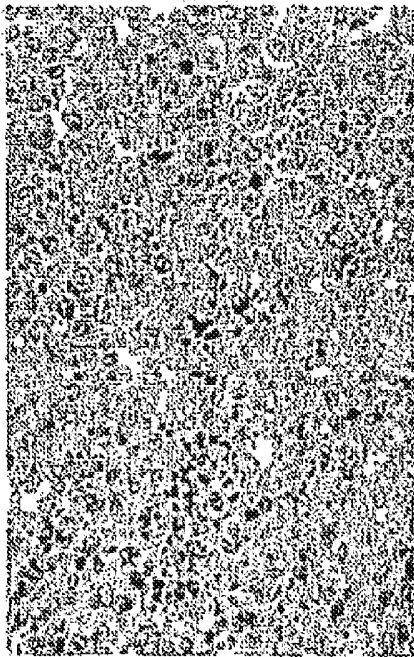


FIG. 13B

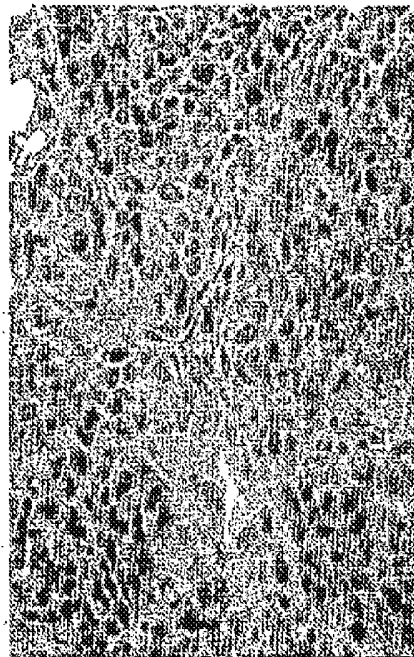


FIG. 13C

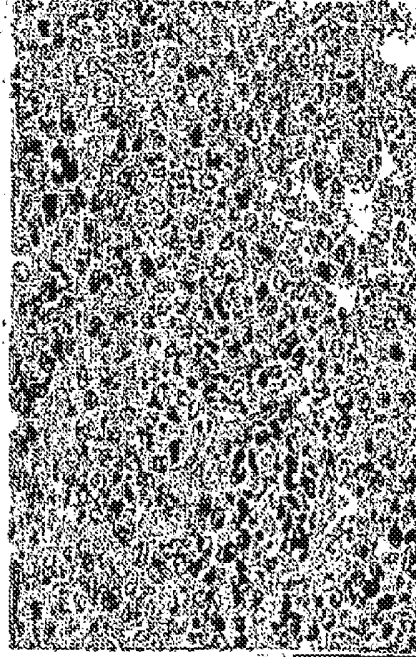
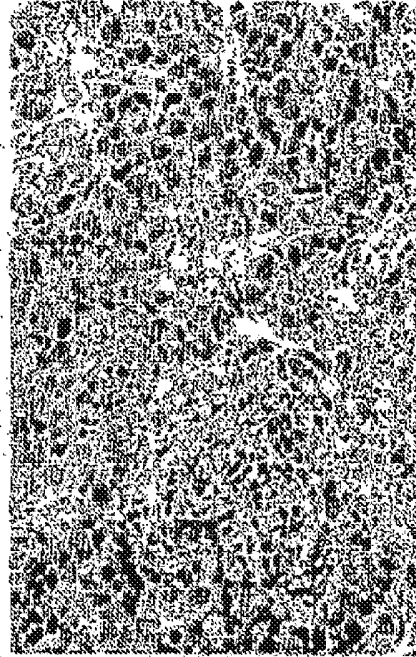
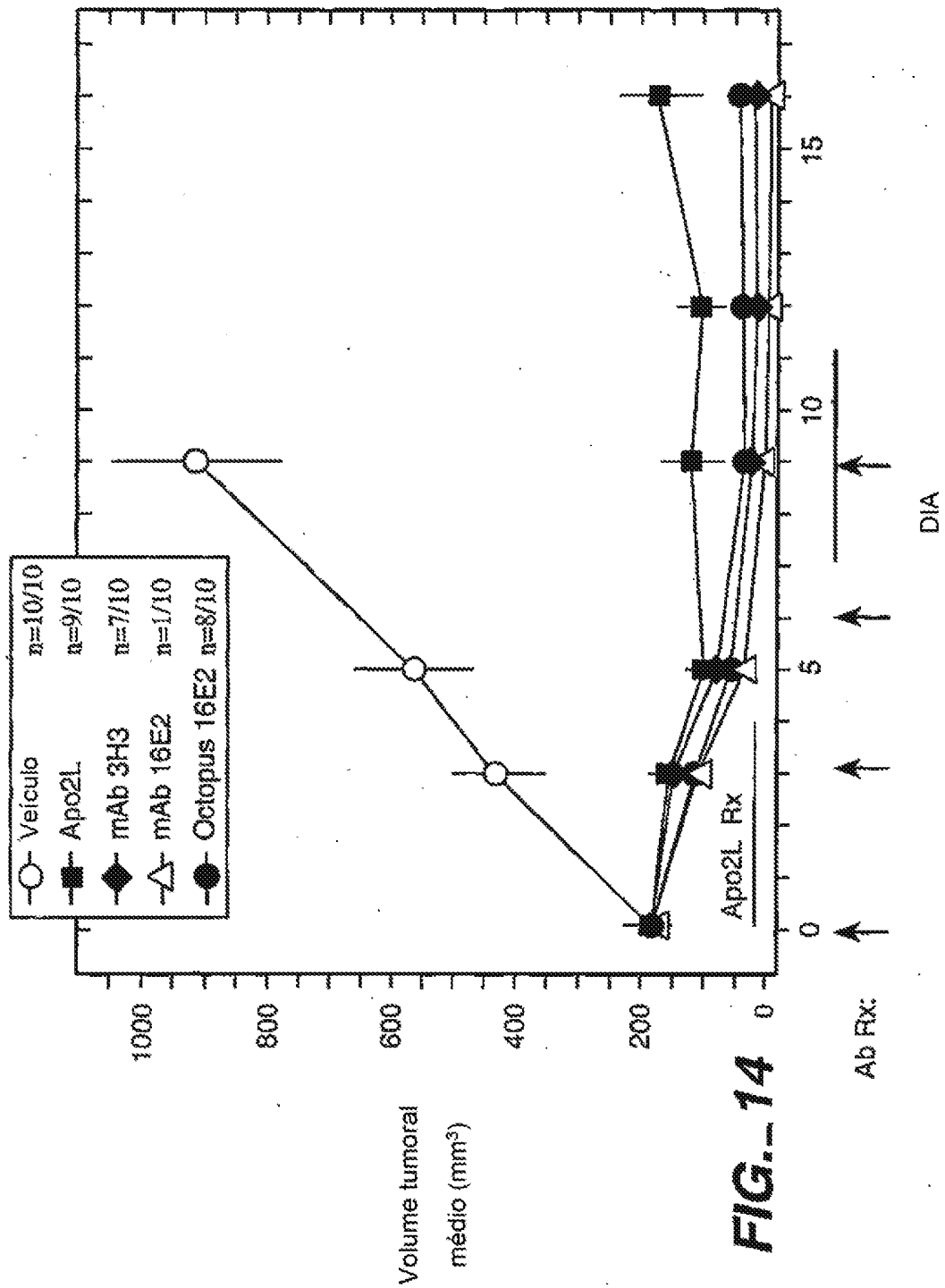
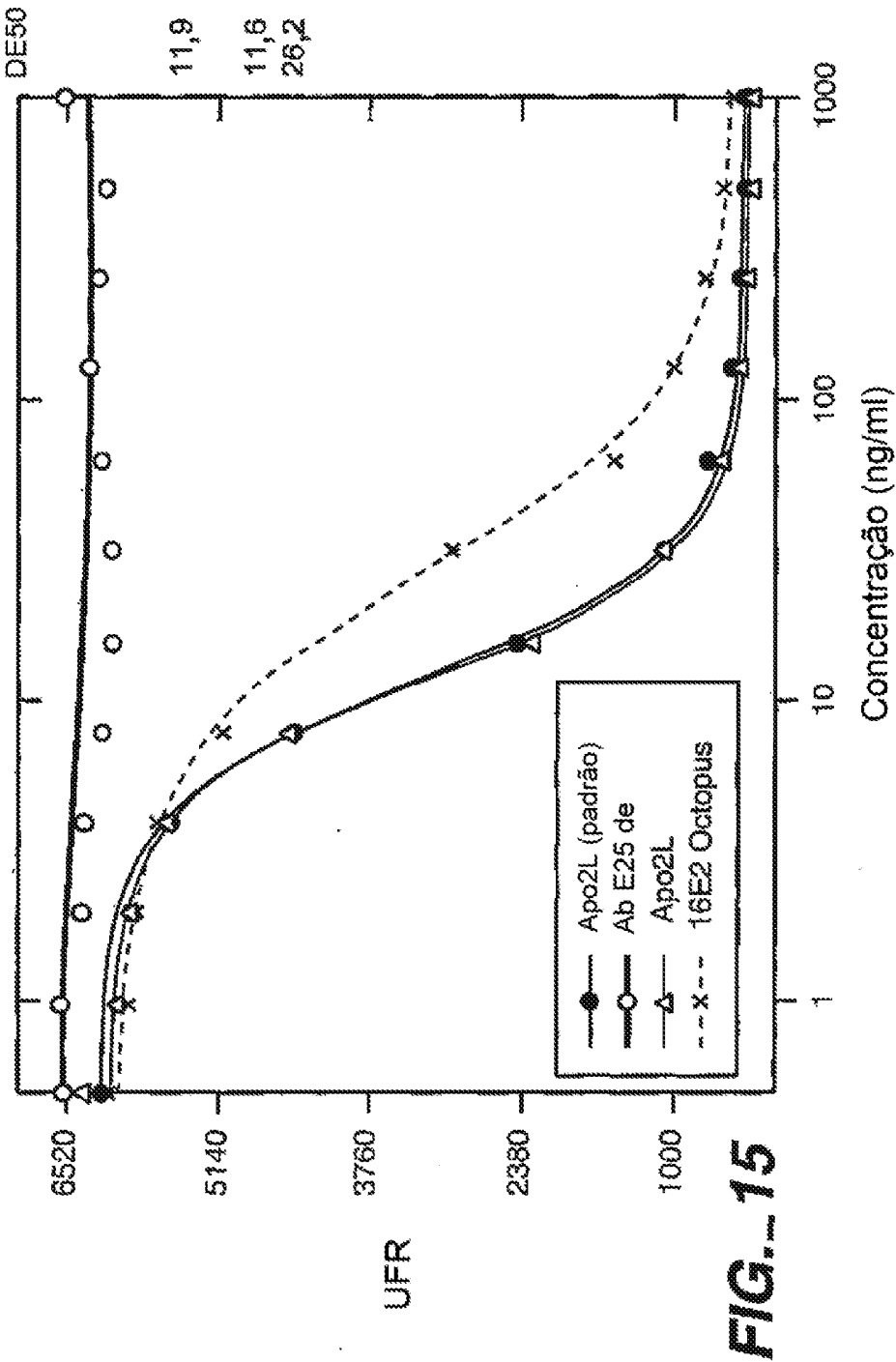


FIG. 13D







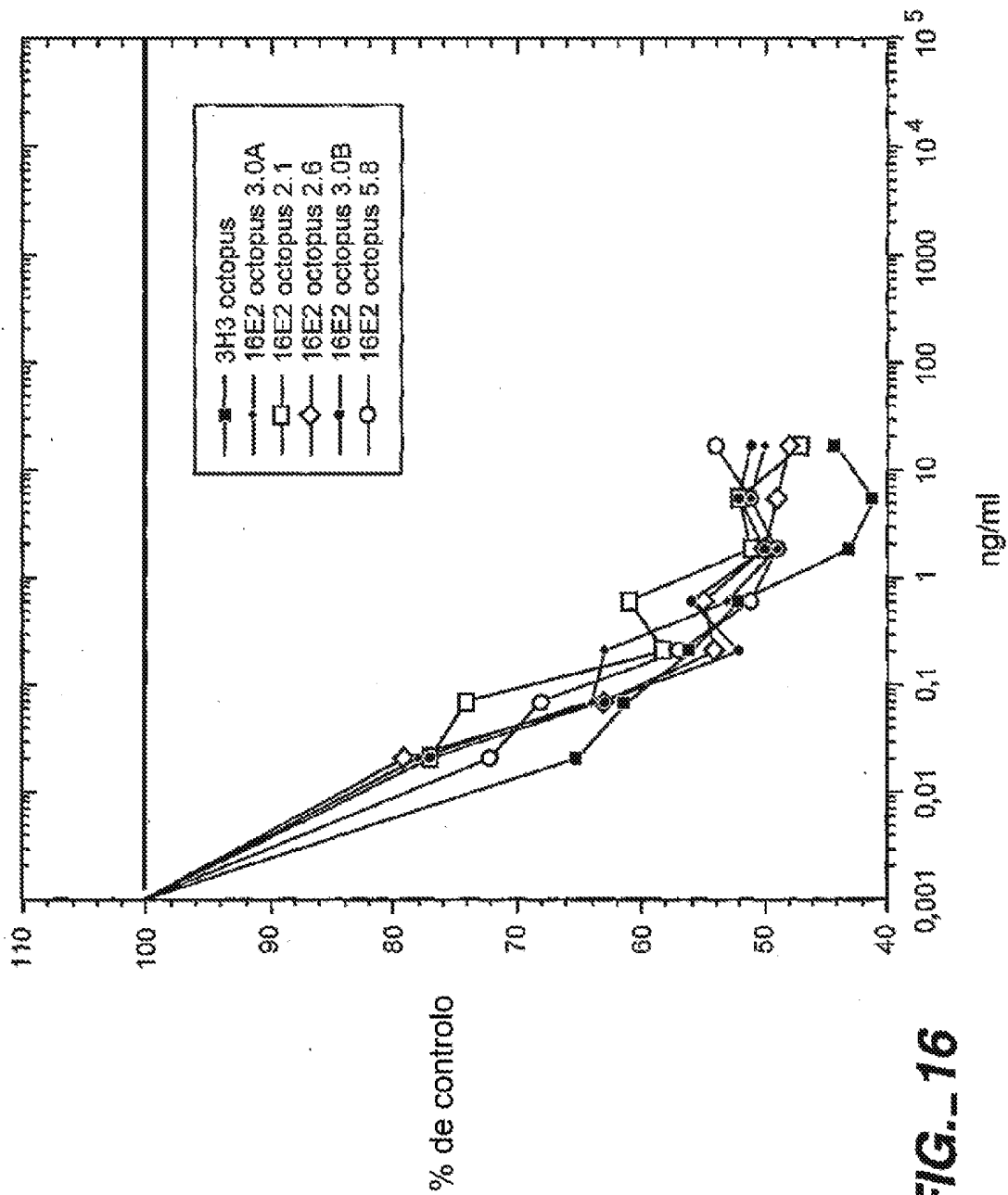


FIG._16

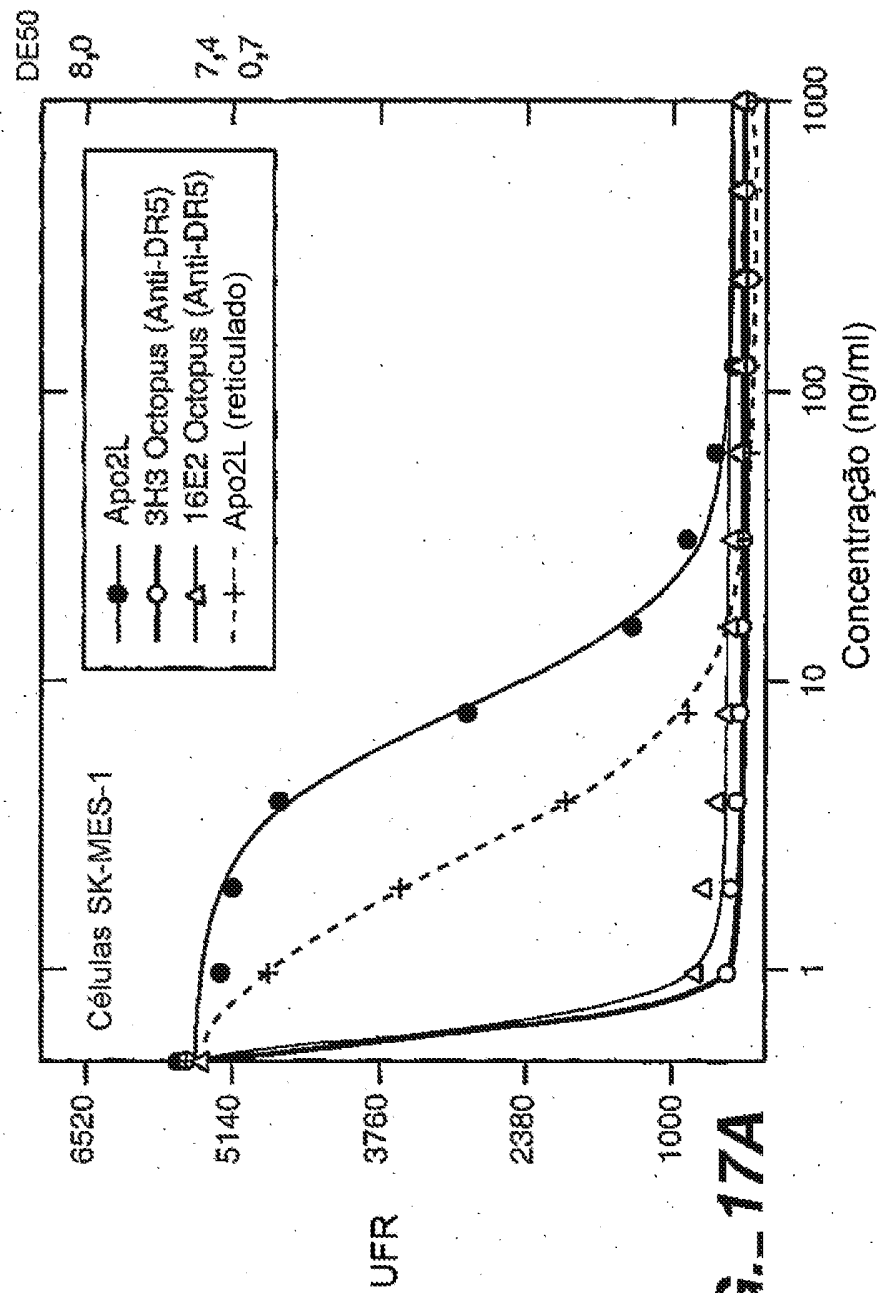


FIG. 17A

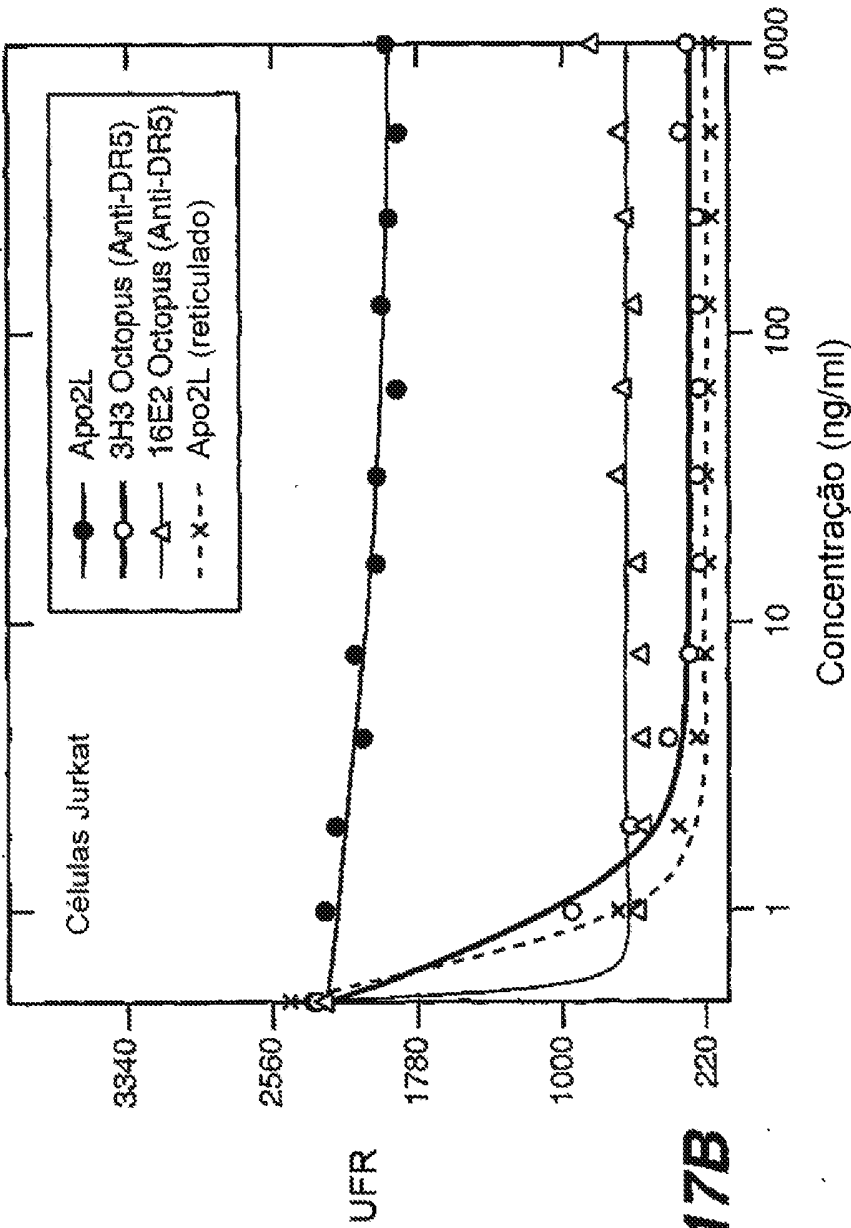
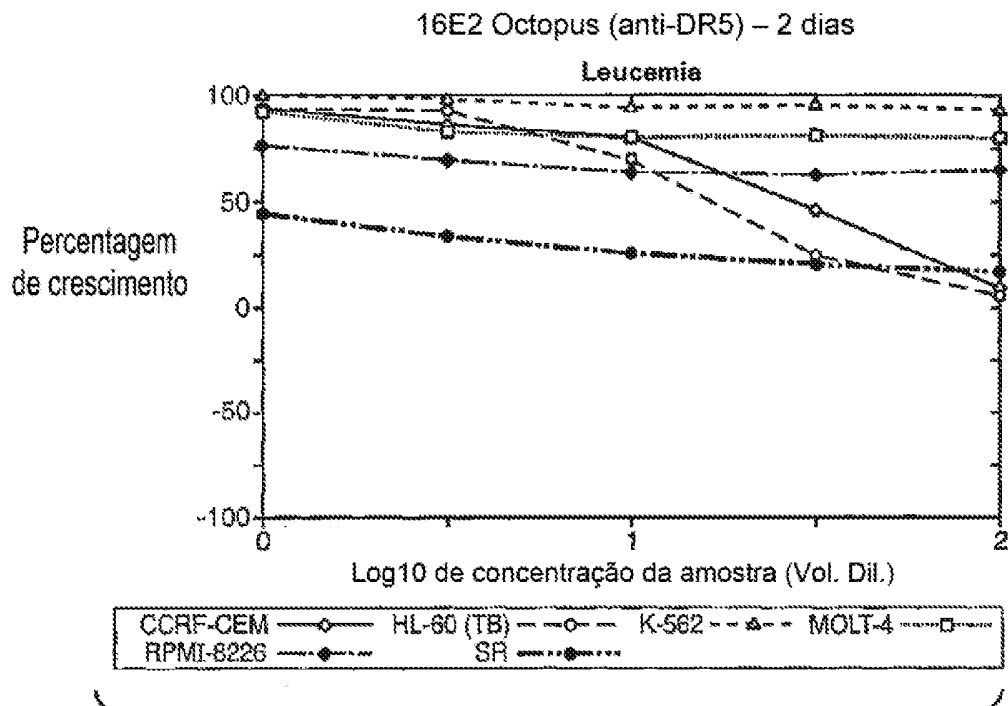
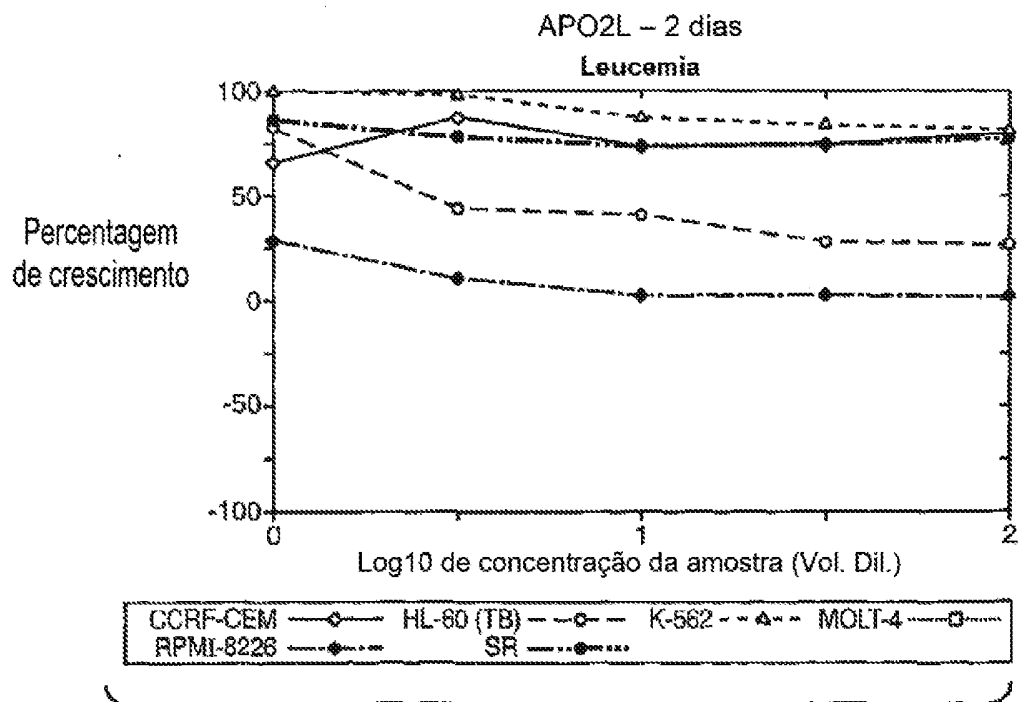
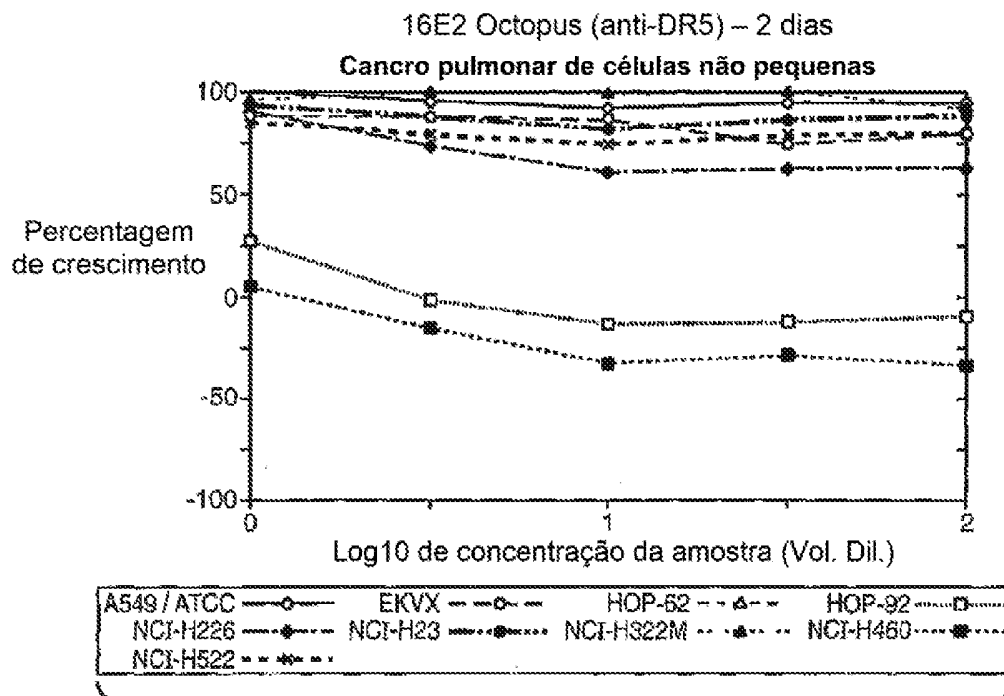
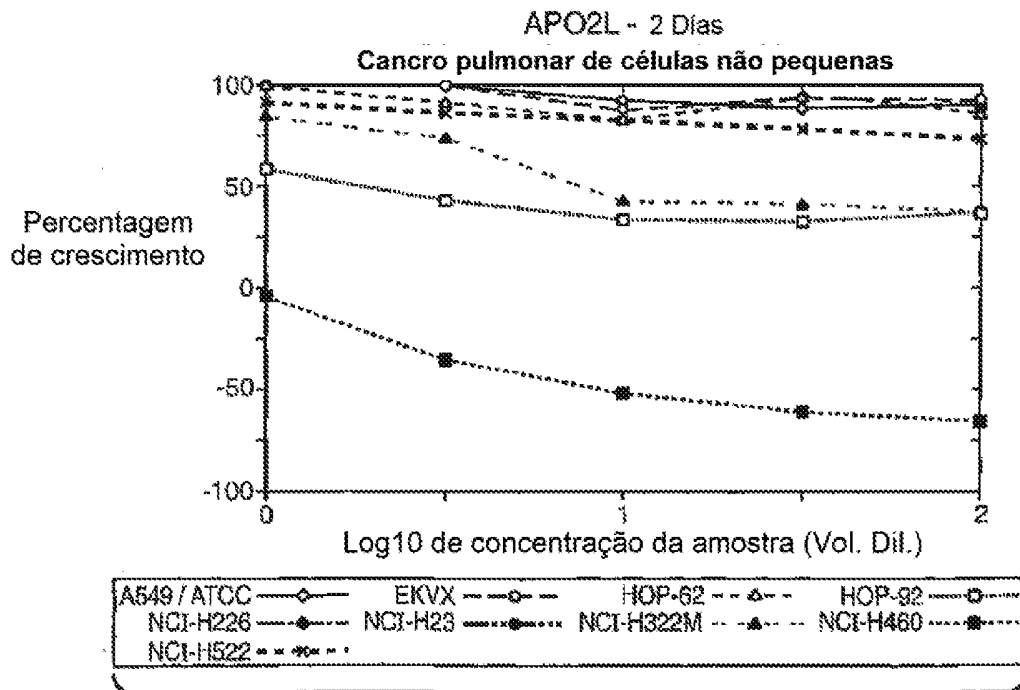
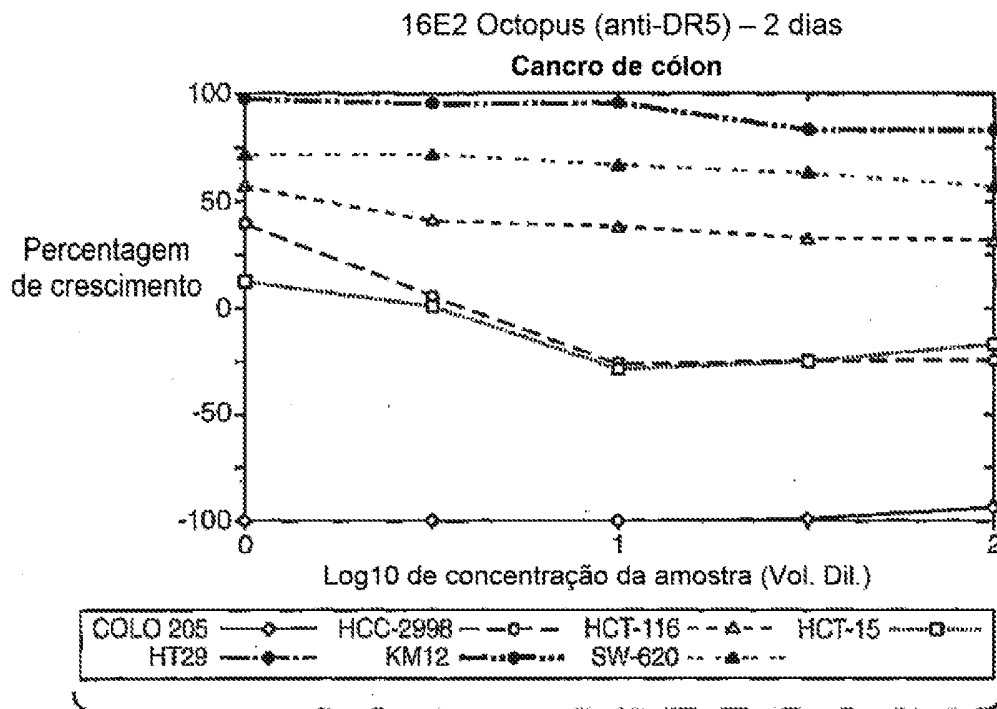
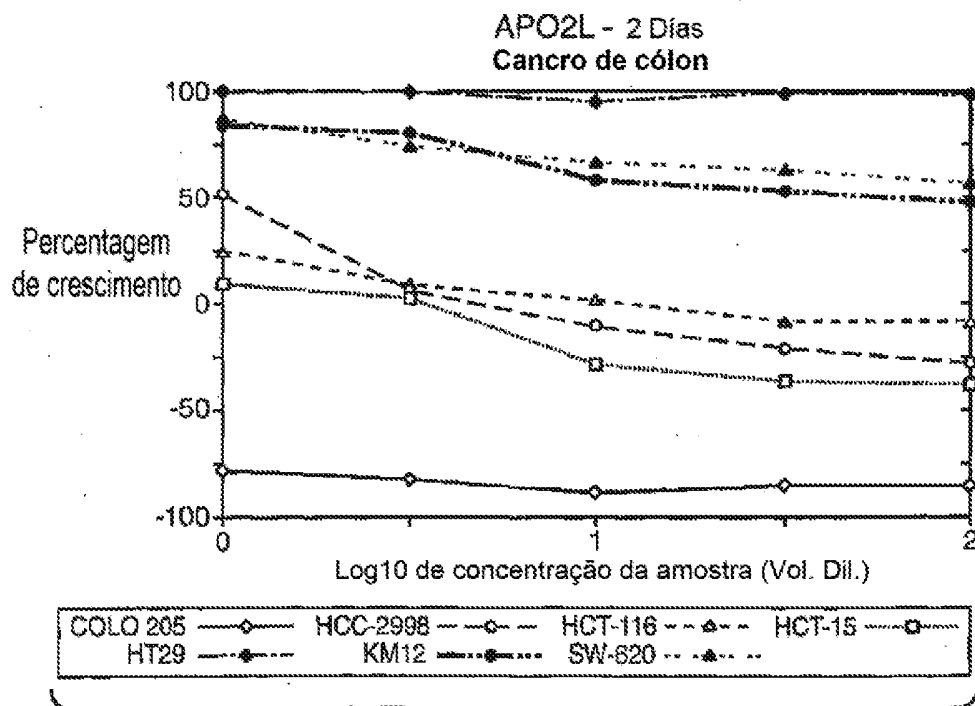
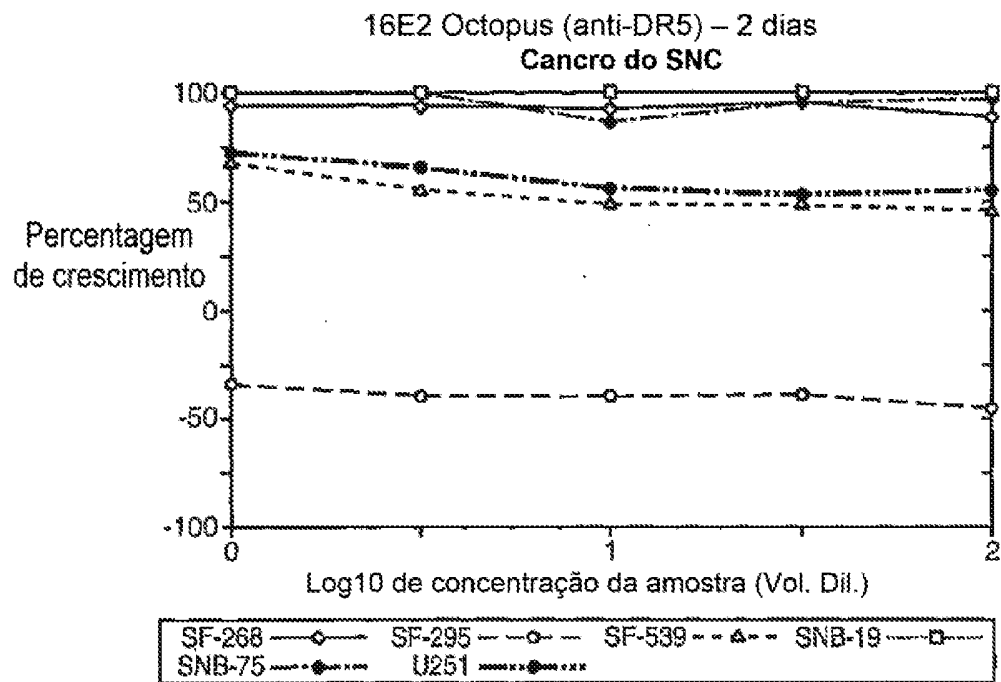
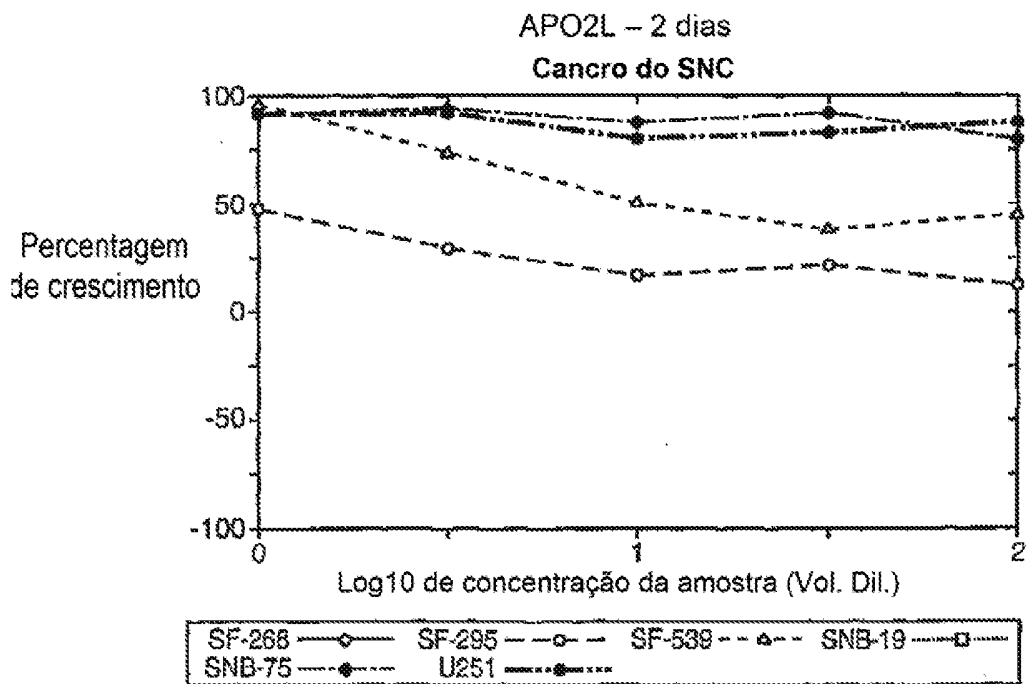


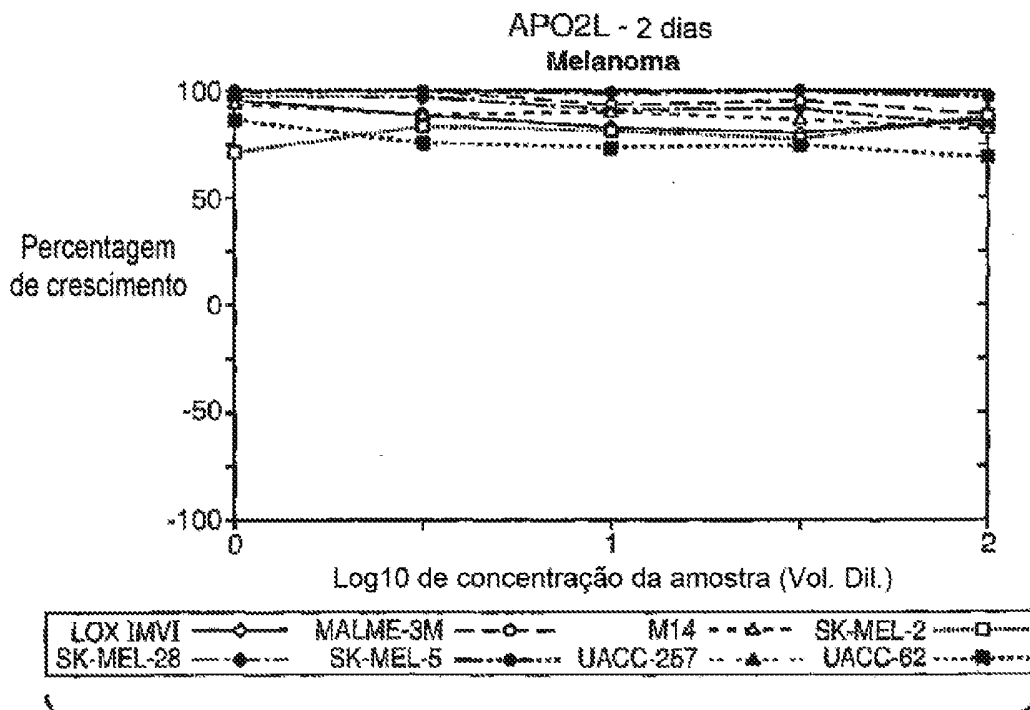
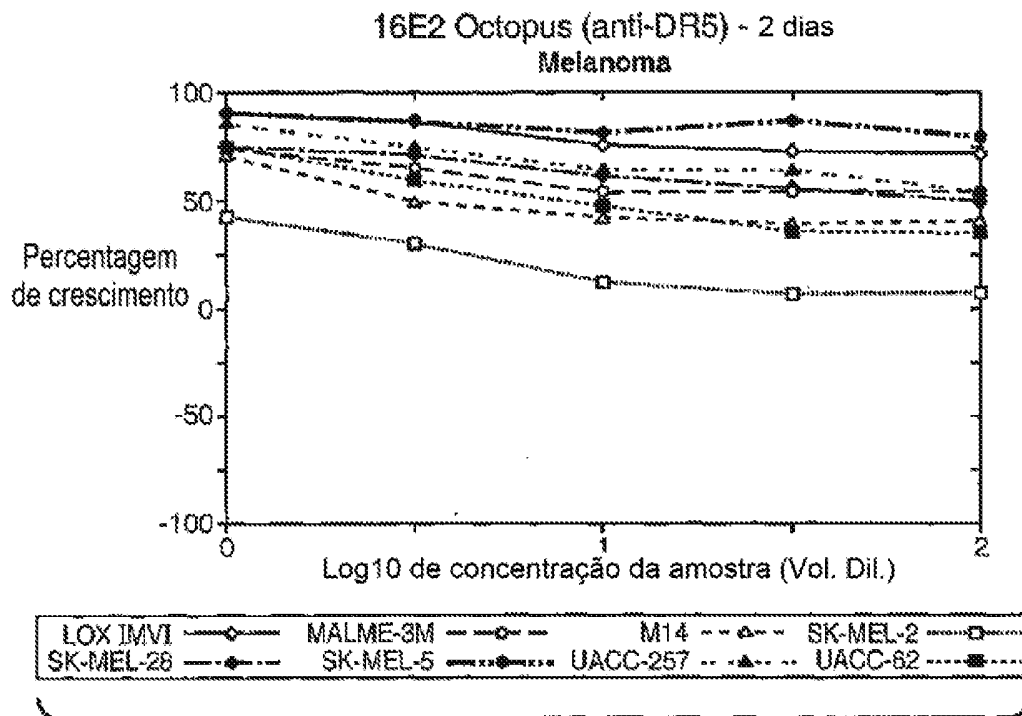
FIG. 17B

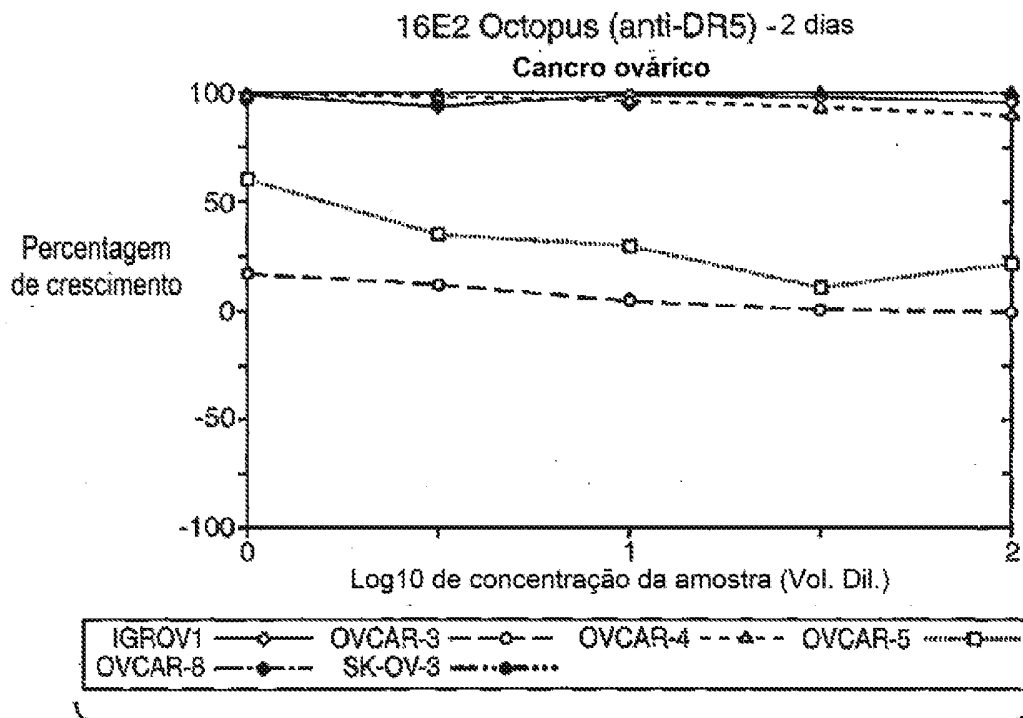
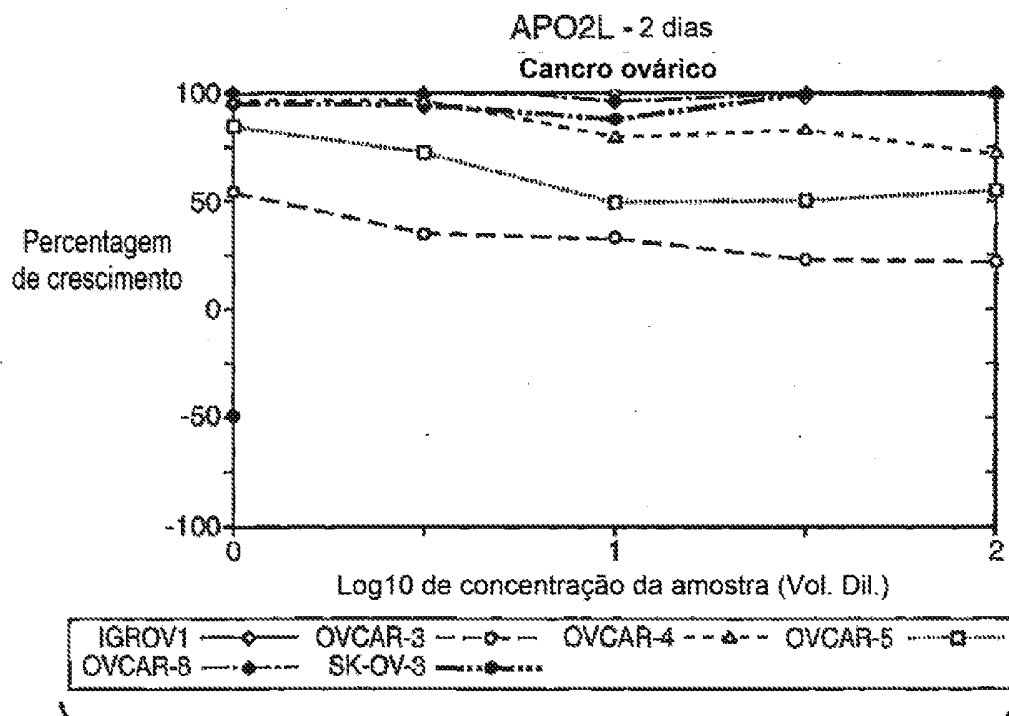
**FIG. 18A-1****FIG. 18A-2**

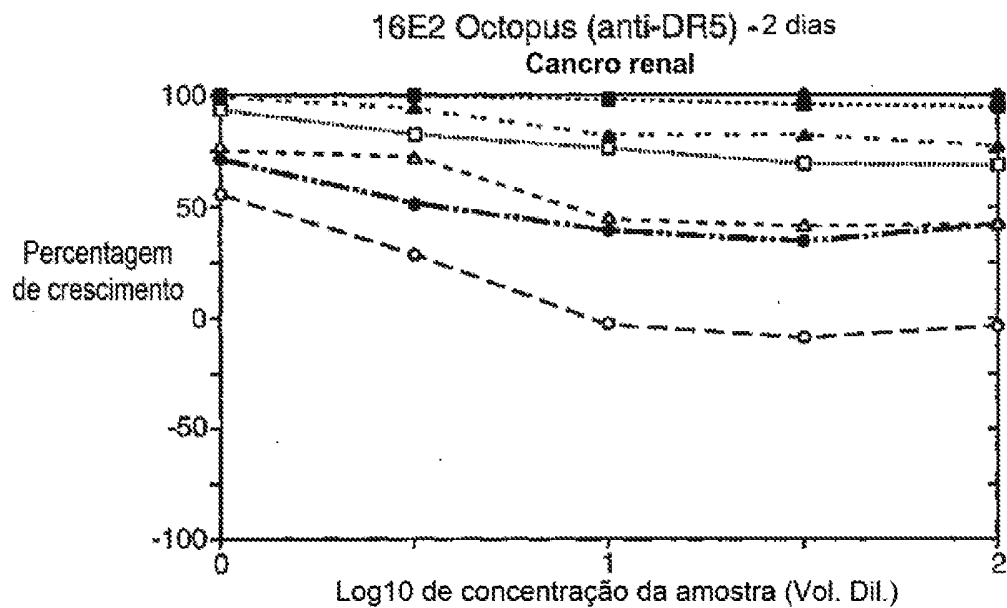
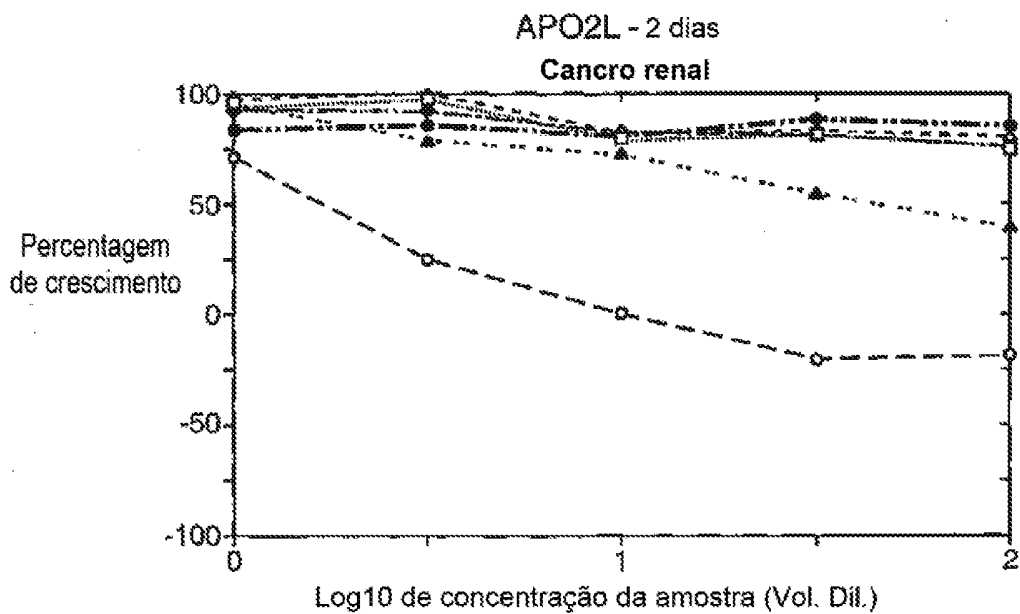
**FIG. 18A-3****FIG. 18A-4**

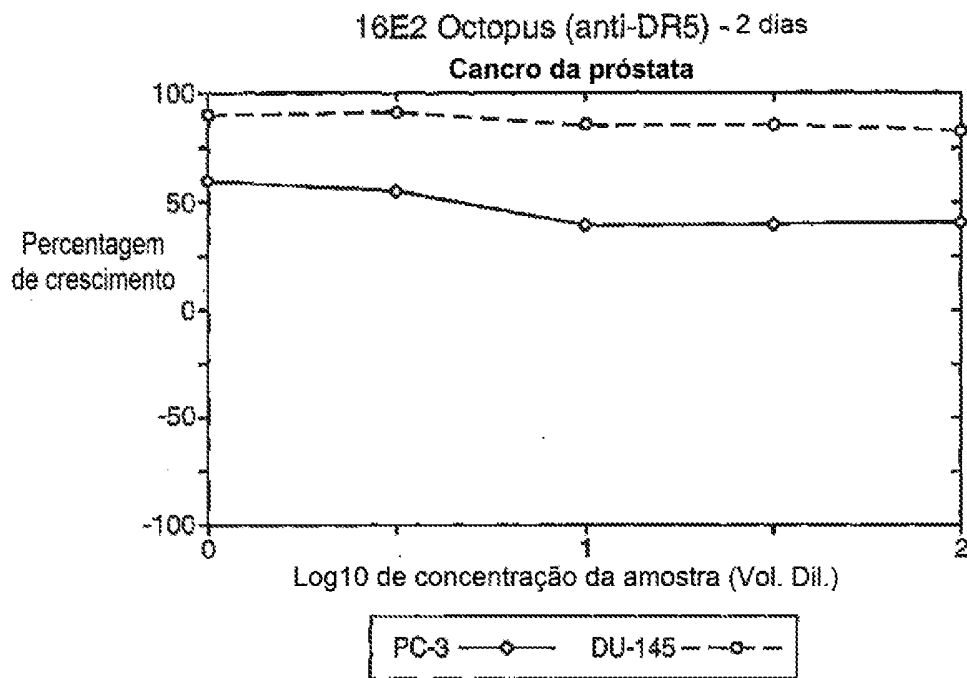
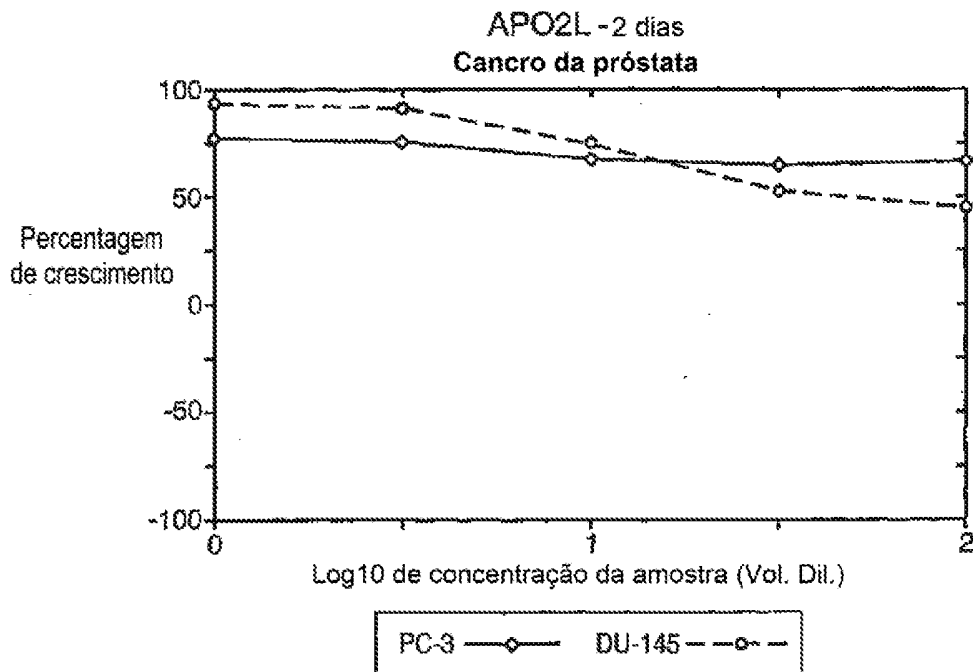
**FIG. 18A-5****FIG. 18A-6**

**FIG. 18B-1****FIG. 18B-2**



**FIG. 18B-5****FIG. 18B-6**

**FIG. 18C-1****FIG. 18C-2**

**FIG. 18C-3****FIG. 18C-4**

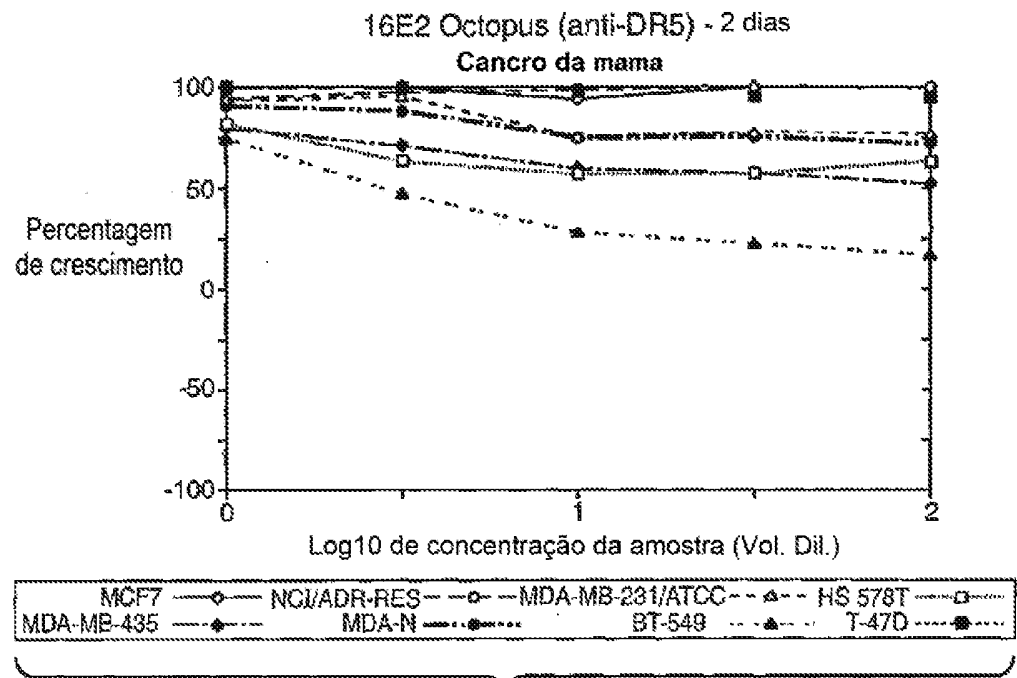


FIG. 18C-5

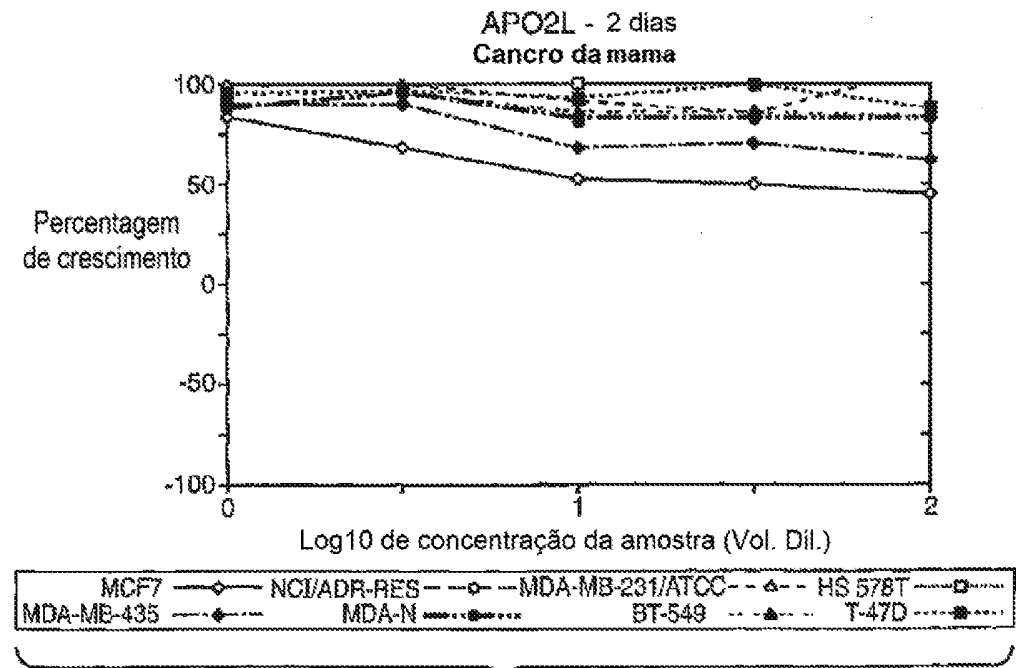
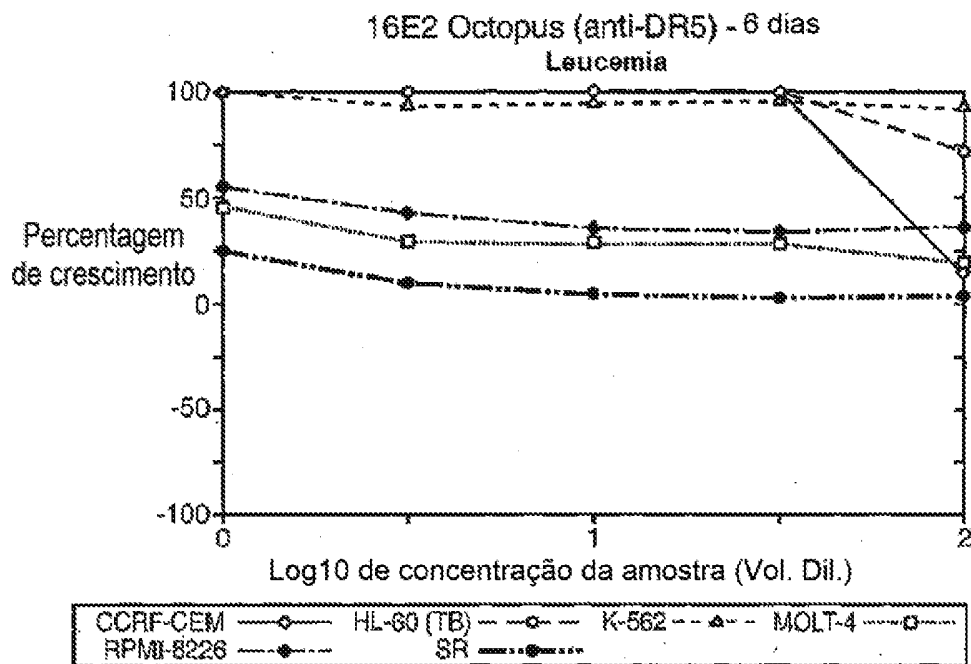
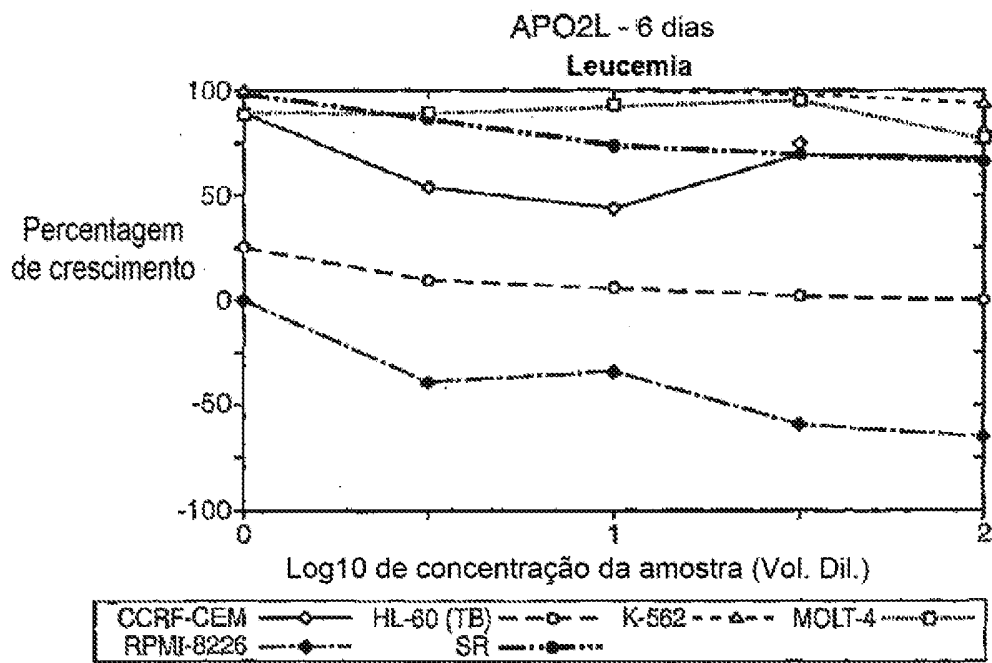
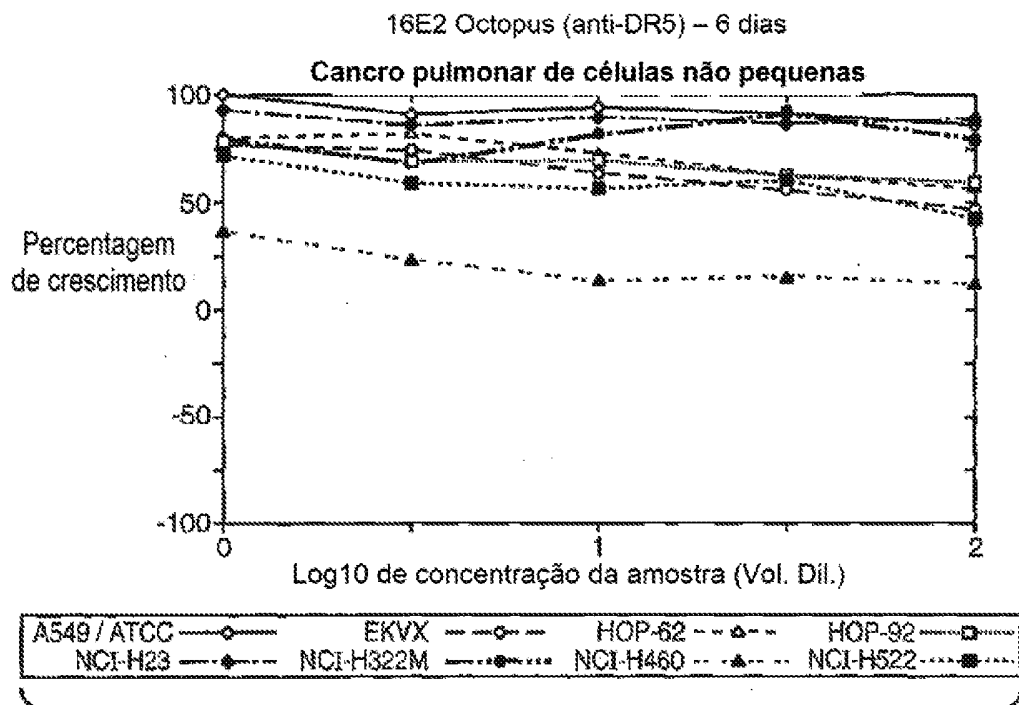
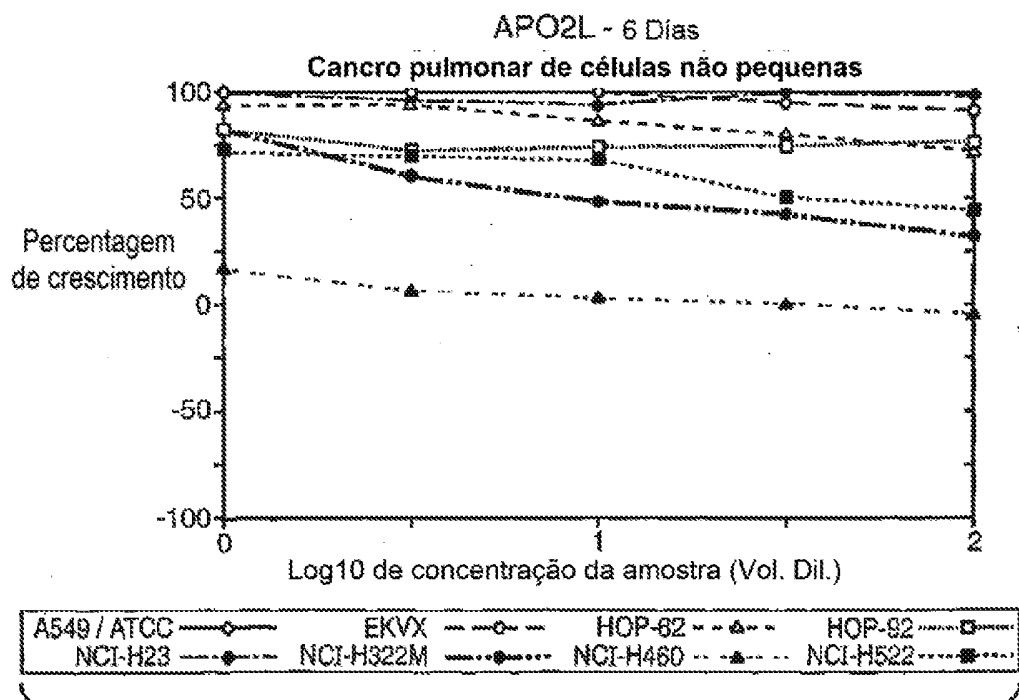
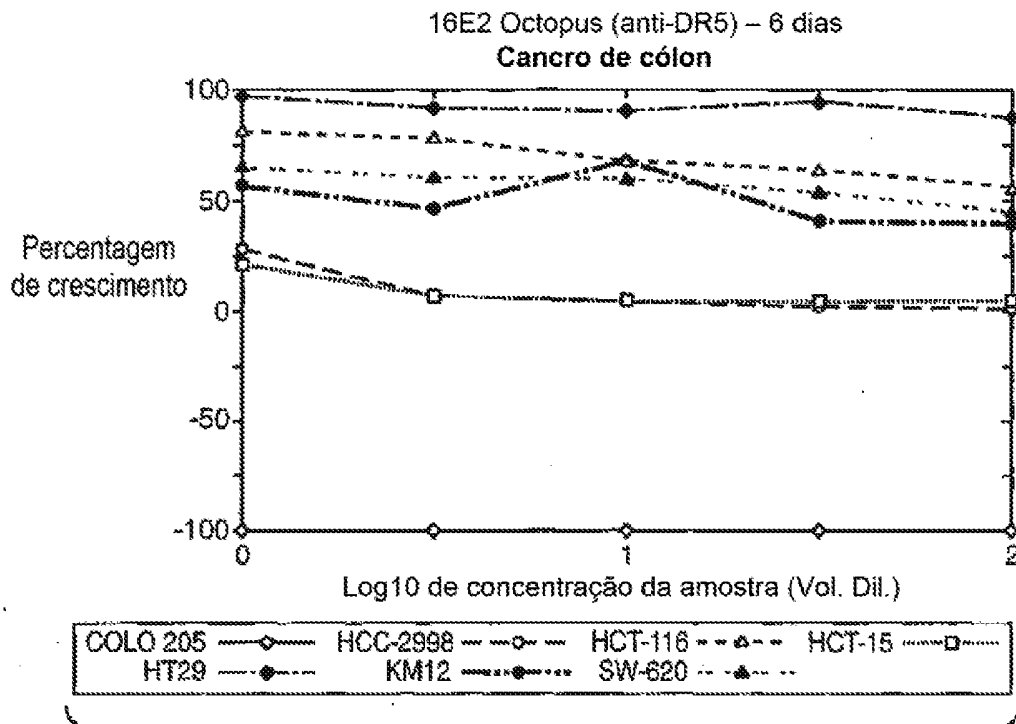
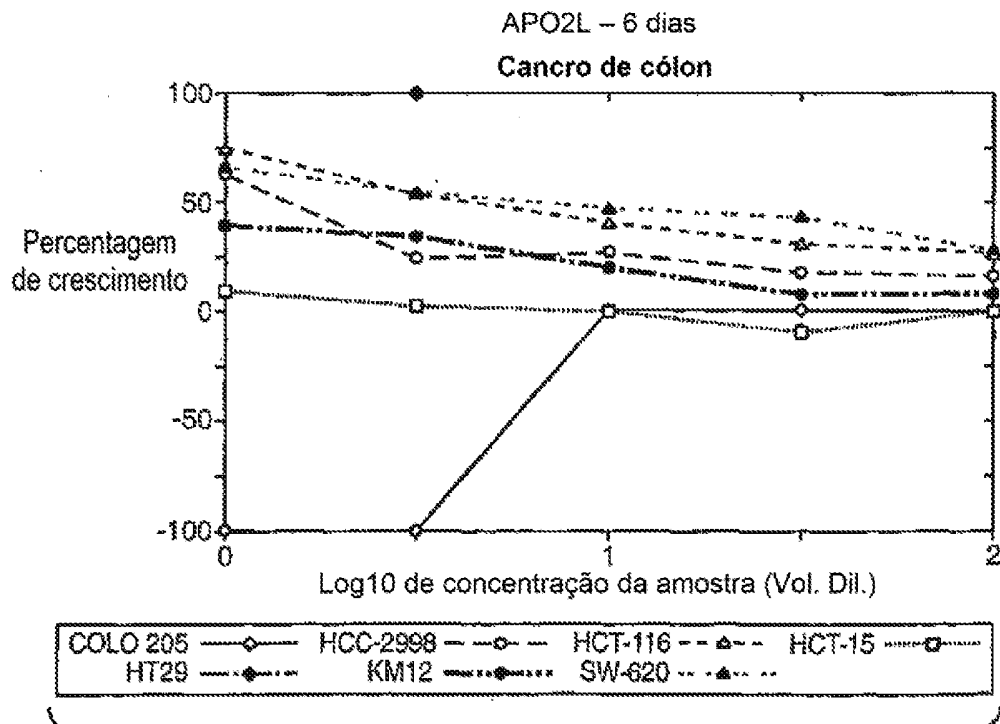
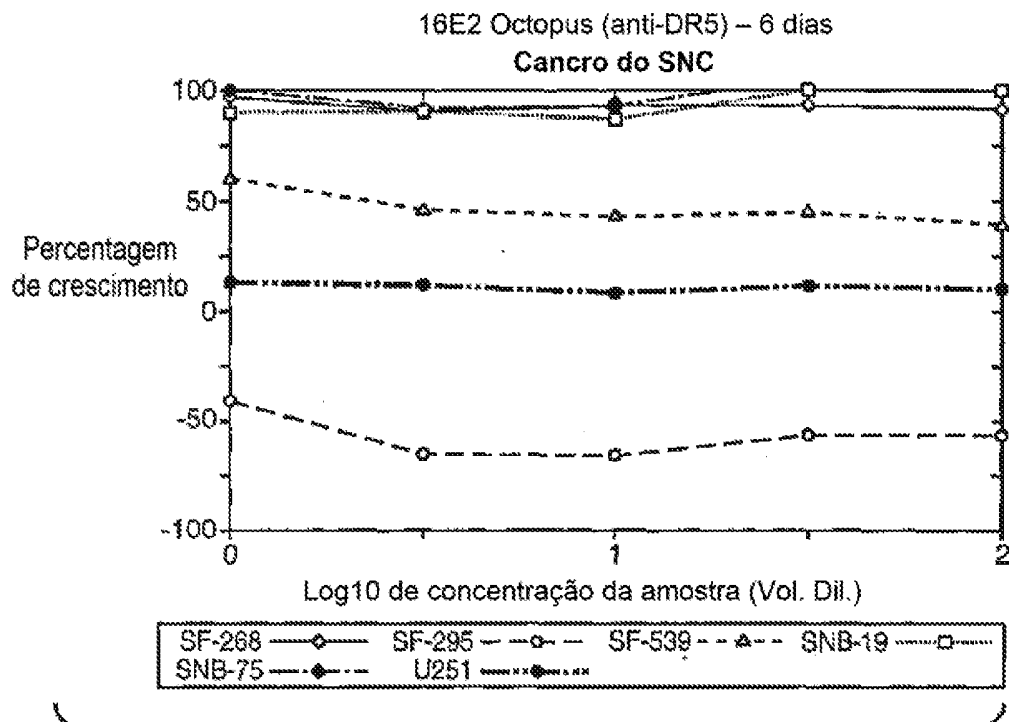
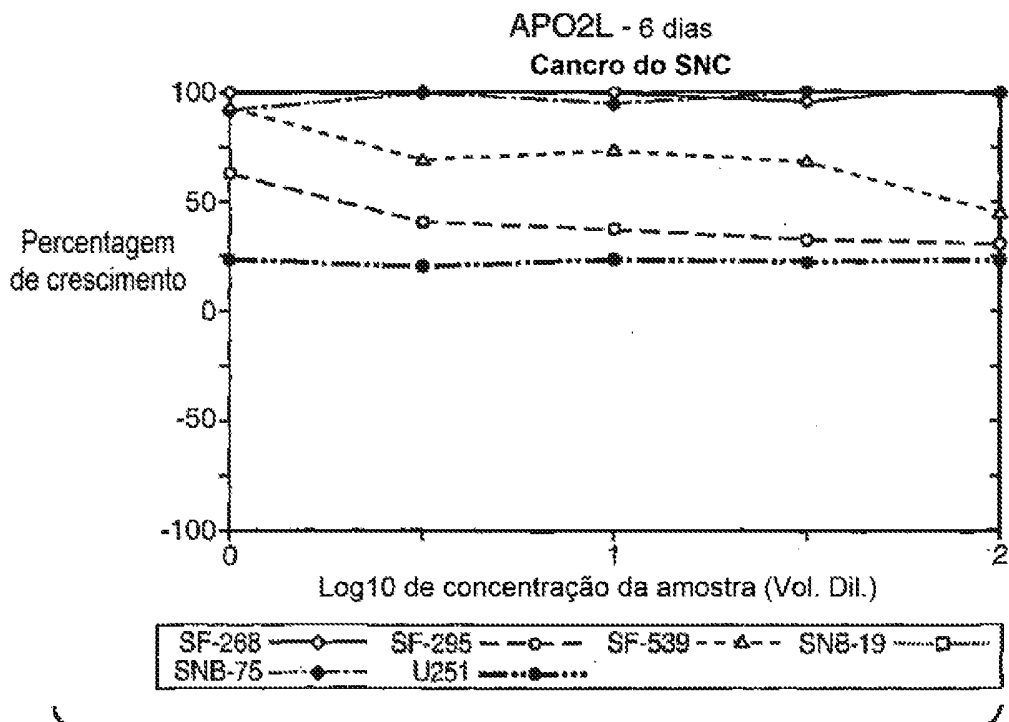


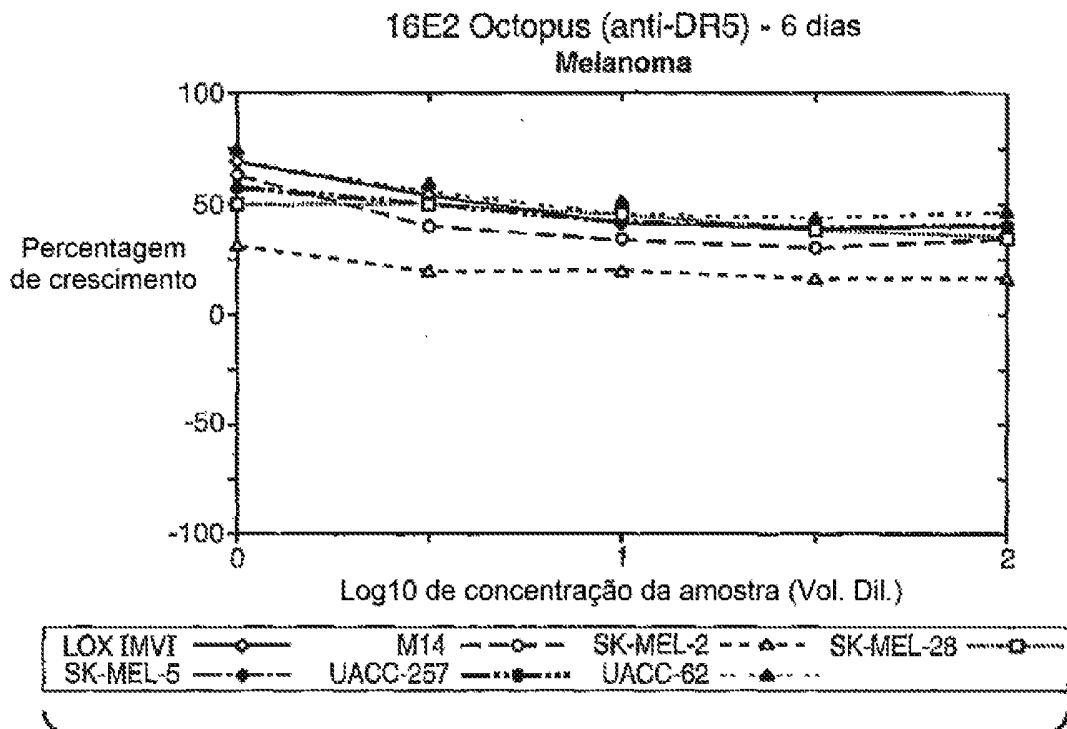
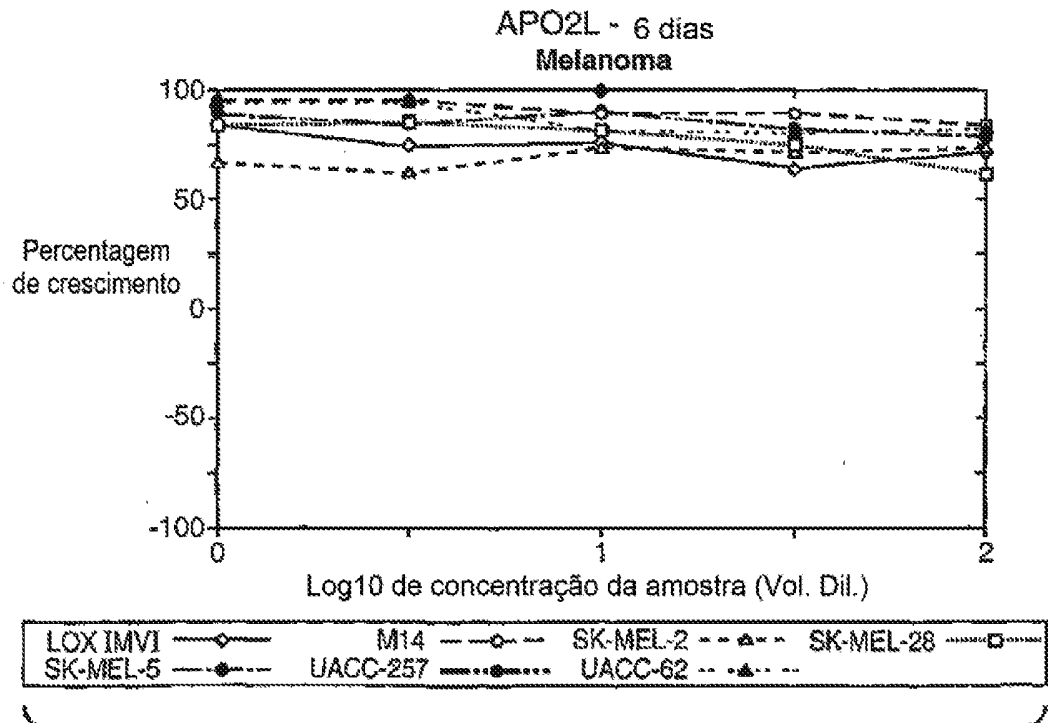
FIG. 18C-6

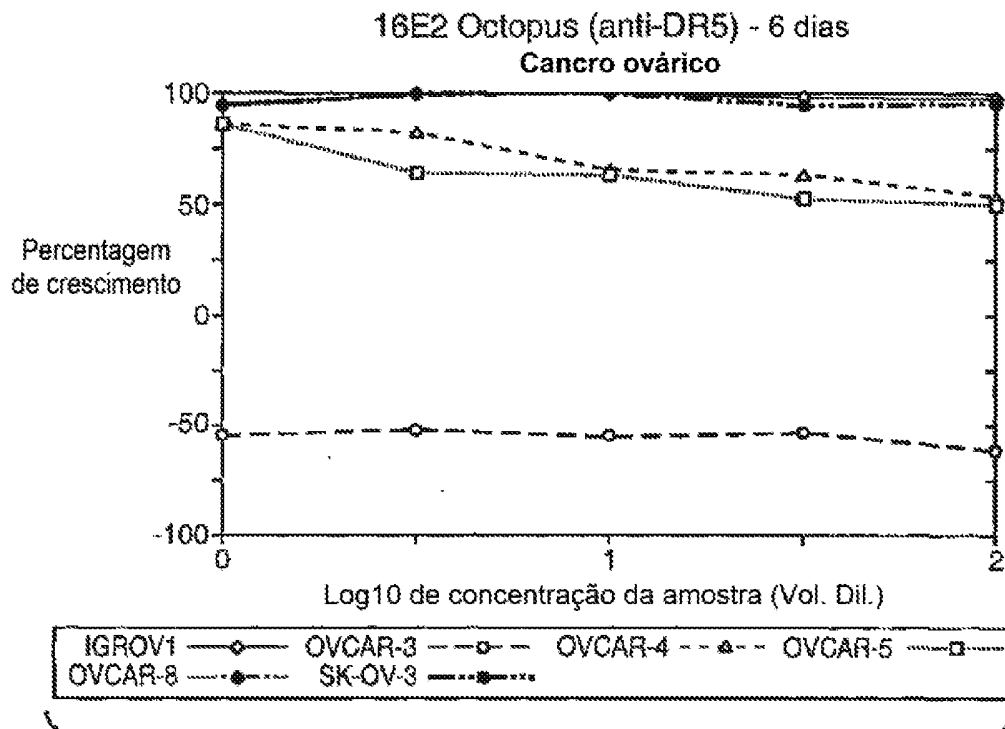
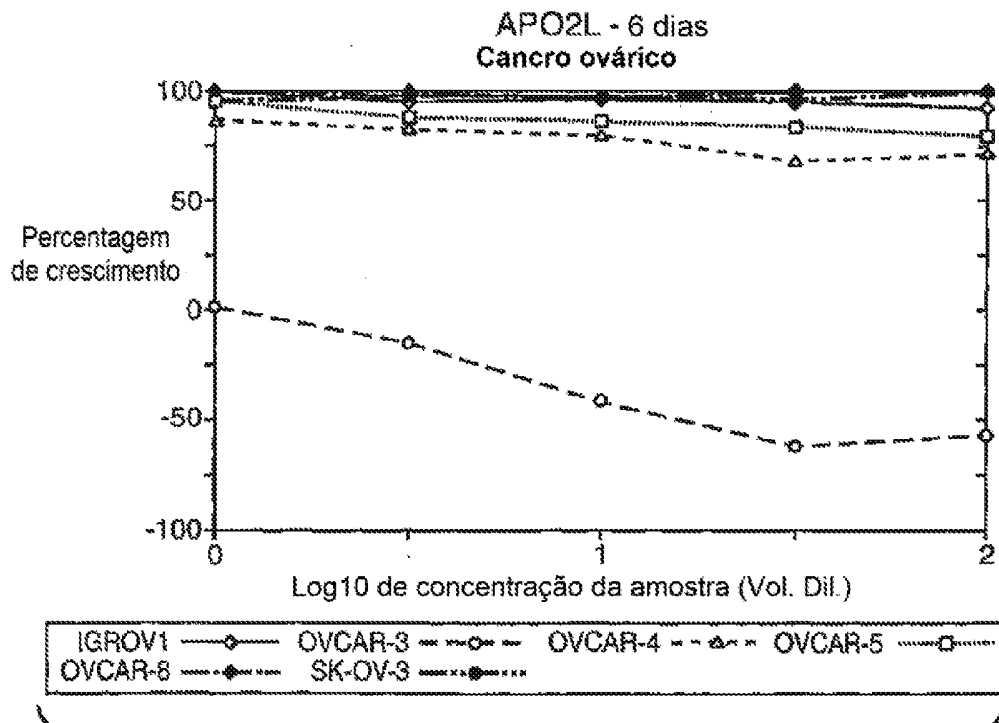
**FIG. 19A-1****FIG. 19A-2**

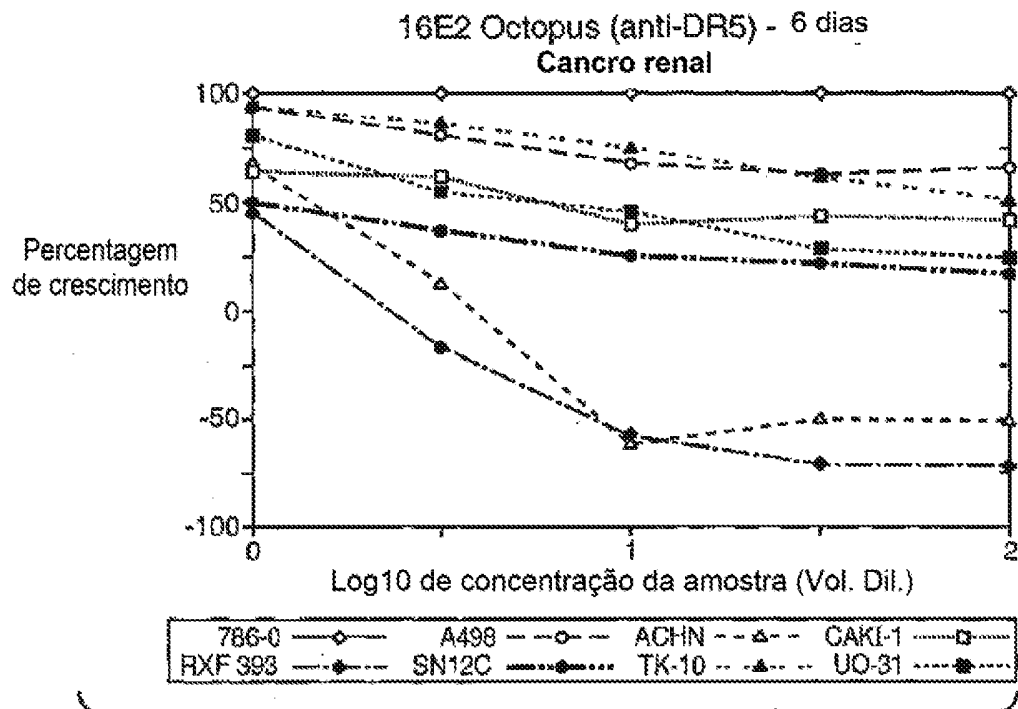
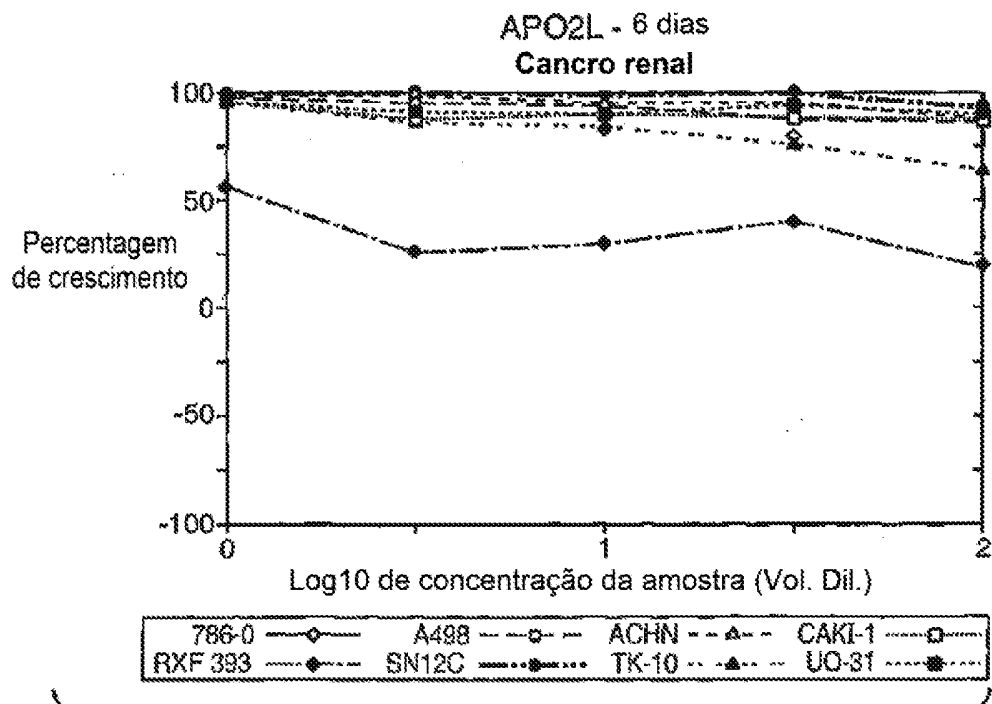
**FIG. 19A-3****FIG. 19A-4**

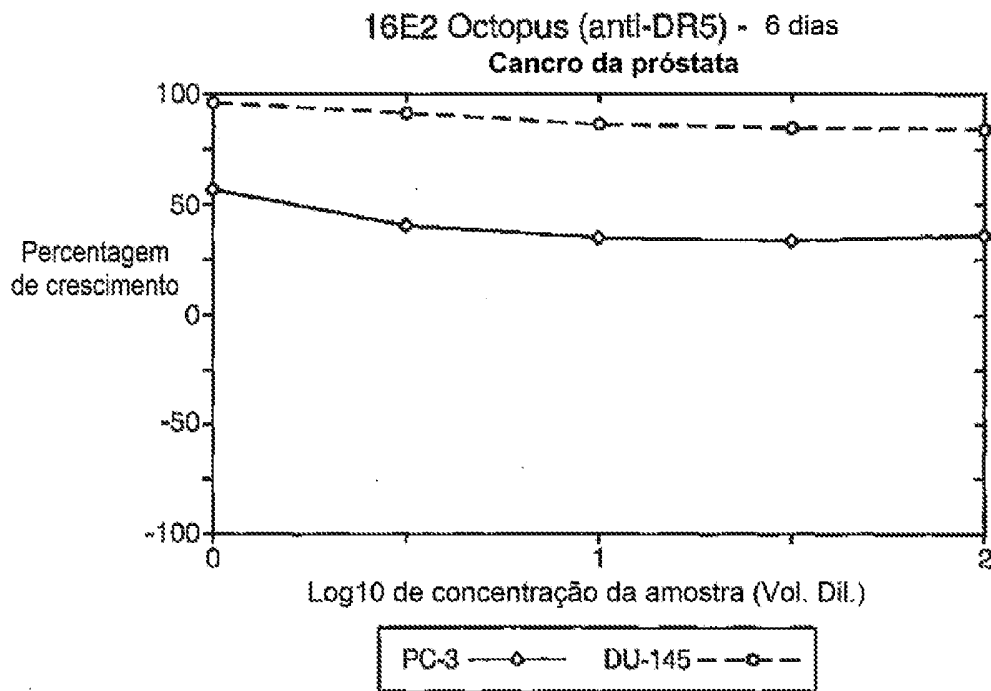
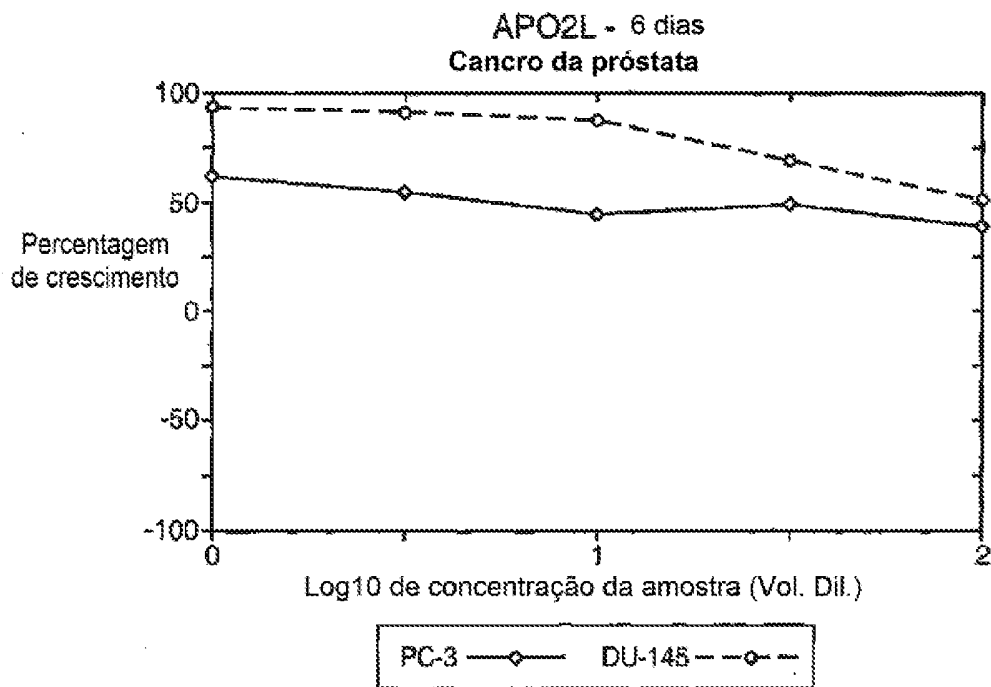
**FIG. 19A-5****FIG. 19A-6**

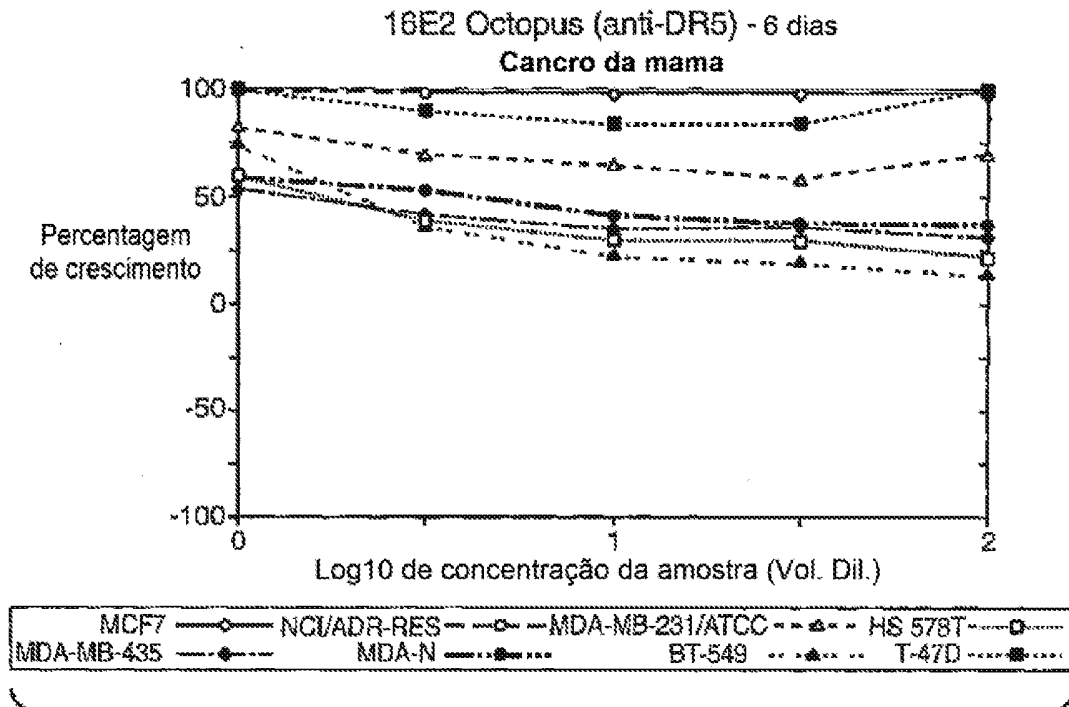
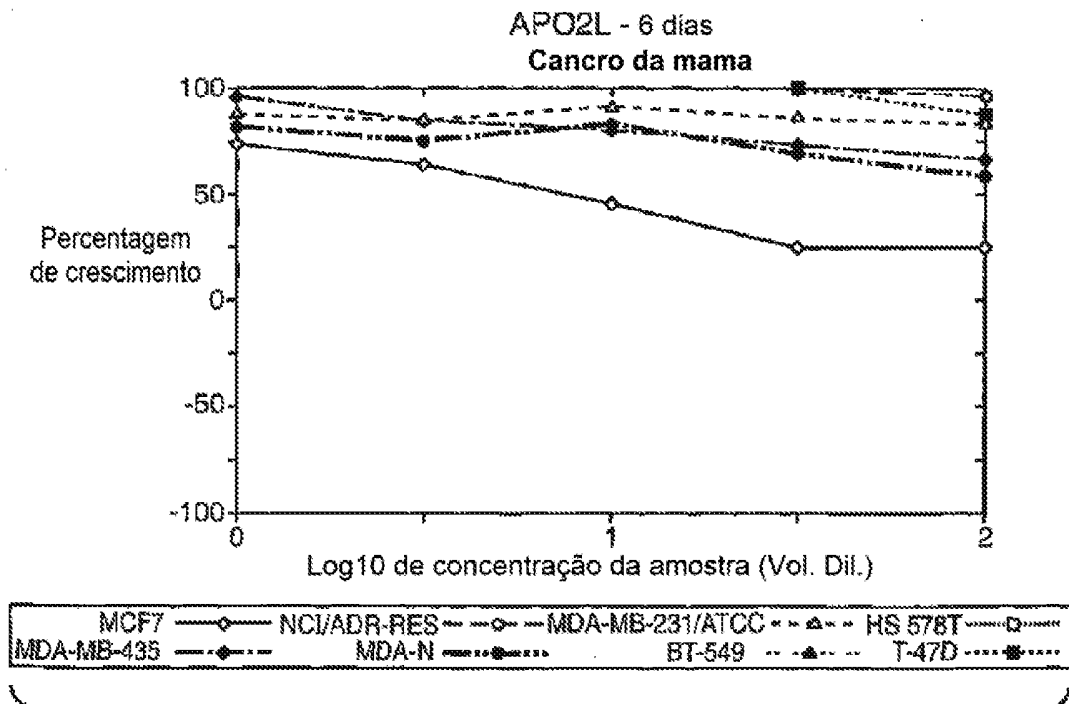
**FIG. 19B-1****FIG. 19B-2**

**FIG. 19B-3****FIG. 19B-4**

**FIG. 19B-5****FIG. 19B-6**

**FIG. 19C-1****FIG. 19C-2**

**FIG. 19C-3****FIG. 19C-4**

**FIG. 19C-5****FIG. 19C-6**

16E2 Octopus (anti-DR5) – 2 dias

Painel/Linha celular <i>1 ou 2 células</i>	Tempo zero	Concentração Log10				Densidades óticas médias			
		Ctrl	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0		
Carcinoma de células não pequenas	0,001	0,337	0,526	0,831	0,457	0,299	0,125		
	0,487	1,335	1,821	1,827	1,486	0,943	0,361		
	0,238	1,548	1,548	1,525	1,473	1,494	1,458		
	0,215	1,846	0,976	0,888	0,890	0,880	0,834		
	0,335	1,932	1,067	1,009	0,947	0,837	0,959		
Carcinoma de células não pequenas	0,279	1,868	0,965	0,887	0,481	0,630	0,537		
	0,212	1,132	1,155	1,081	1,061	1,094	1,096		
	0,567	1,345	1,247	1,256	1,237	1,182	1,181		
	0,463	1,882	1,143	1,156	1,191	1,182	1,158		
	0,638	0,988	0,717	0,817	0,541	0,551	0,584		
Carcinoma de células não pequenas	0,269	0,702	0,668	0,888	0,531	0,941	0,559		
	0,602	1,637	1,581	1,325	1,463	1,512	1,540		
	0,408	1,265	1,222	1,265	1,256	1,276	0,311		
	0,362	1,677	0,416	0,305	0,294	0,256	0,237		
	0,374	0,954	0,886	0,830	0,804	0,828	0,839		
Carcinoma de células não pequenas	0,145	0,829	0,803	-0,082	-0,008	0,004	0,039		
	0,334	0,797	0,511	0,253	0,246	0,250	0,252		
	0,385	2,058	1,341	1,331	1,008	0,826	0,904		
	0,205	1,218	0,324	0,304	0,146	0,154	0,189		
	0,322	1,464	1,547	1,523	1,366	1,353	1,483		
Carcinoma de células não pequenas	0,243	1,281	1,249	1,318	1,224	1,046	1,097		
	0,334	0,981	0,713	0,721	0,678	0,645	0,594		
	0,267	1,845	1,005	1,088	0,992	1,013	0,970		
	0,512	1,311	0,344	0,313	0,312	0,312	0,282		
	0,225	1,153	0,960	0,750	0,673	0,674	0,657		

FIG. 20A-1

16E2 Octopus (anti-DR5) - 2 Dias

Painel/Linha celular	Concentração Log10					TGI	IC50
	Percentagem de crescimento						
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0		
Leucemia							
CCRF-CEM	94	86	79	46	9	>1,00E+02	>1,00E+02
HL-60 (T8)	92	93	89	23	5	>1,00E+02	>1,00E+02
K-562	100	96	94	96	93	>1,00E+02	>1,00E+02
NOLT-4	92	83	81	81	73	>1,00E+02	>1,00E+02
SKNI-8226	76	70	63	62	65	>1,00E+02	>1,00E+02
SR	43	33	23	20	16	<1,00E+03	>1,00E+02
Cancro polimorfo de células não pequenas							
A549/ATCC	102	95	93	96	96	>1,00E+02	>1,00E+02
H7VX	87	89	86	74	79	>1,00E+02	>1,00E+02
HOP-62	109	110	115	114	111	>1,00E+02	>1,00E+02
HOP-92	26	-2	-14	-13	-10	<1,00E+03	2,90E+00
HCT-H226	90	74	61	63	62	>1,00E+02	>1,00E+02
HCT-H23	93	96	92	86	89	>1,00E+02	>1,00E+02
HCT-H322M	94	100	98	101	93	>1,00E+02	>1,00E+02
HCT-H480	4	-16	-33	-29	-35	<1,00E+03	1,27E+00
HCT-H522	85	79	74	76	80	>1,00E+02	>1,00E+02
Cancro do colon							
COLO 205	-98	-100	-100	-98	-94	<1,00E+03	<1,00E+00
HCT-2998	38	4	-26	-23	-25	<1,00E+03	3,70E+00
HCT-116	37	40	37	32	31	1,61E+00	>1,00E+02
HCT-15	12	0	-29	-23	-18	<1,00E+03	3,03E+00
HT29	107	105	109	108	102	>1,00E+02	>1,00E+02
HT12	96	94	95	82	92	>1,00E+02	>1,00E+02
SW-620	70	71	66	62	56	>1,00E+02	>1,00E+02
Cancro do SNC							
SP-203	94	94	92	95	89	>1,00E+02	>1,00E+02
SP-205	-33	-19	-39	-19	-45	<1,00E+03	<1,00E+00
SP-839	89	57	49	49	47	>1,00E+02	>1,00E+02

FIG._20A-2

Painel/linha celular		Tempo zero		Concentração Log10		Densidades óticas médias		
						1,0		
						1,5		
Citr1		0,0		0,5		2,0		
Cancro do SNC								
208-1a		0,016	1,122	1,139	1,143	1,121	1,136	1,157
208-7b		0,326	0,637	0,651	0,649	0,596	0,623	0,626
1231		0,197	0,981	0,766	0,718	0,643	0,620	0,636
Melanoma								
1022 IMVI		0,349	1,703	1,589	1,510	1,366	1,321	1,299
MELMS-34		0,350	0,732	0,643	0,600	0,553	0,557	0,553
M1 4		0,320	1,246	0,982	0,783	0,716	0,689	0,703
SK-MEL-2		0,592	0,982	0,758	0,712	0,639	0,618	0,622
SK-MEL-28		0,345	1,033	0,853	0,835	0,768	0,729	0,668
SK-MEL-5		0,346	2,111	1,937	1,893	1,770	1,863	1,721
UACC-257		0,612	1,387	1,211	1,133	1,062	1,053	0,976
UACC-62		0,597	1,886	1,504	1,318	1,166	1,038	1,024
Cancro ovarico								
IGROV1		0,269	0,934	0,927	0,876	0,815	0,805	0,889
OVCAR-2		0,434	1,295	0,966	0,926	0,860	0,839	0,831
OVCAR-4		0,358	1,485	1,464	1,453	1,432	1,404	1,361
OVCAR-5		1,107	1,829	1,539	1,355	1,318	1,181	1,253
OVCAR-8		0,238	0,880	0,903	0,876	0,881	0,923	0,882
SK-OV-3		0,480	1,951	1,851	1,861	1,834	1,869	1,875
Cancro renal								
786-0		0,403	1,483	1,534	1,506	1,482	1,491	1,512
A498		0,757	1,482	1,150	0,908	0,743	0,698	0,726
ACHN		0,360	1,638	1,336	1,390	0,931	0,904	0,899
CAKI-1		0,392	1,410	1,326	1,213	1,151	1,071	1,062
RBF 393		0,546	1,151	1,107	1,203	1,148	1,156	1,157
SN12C		0,511	1,145	0,962	0,839	0,755	0,730	0,788
TK-10		0,538	1,127	1,116	1,095	1,021	1,028	0,999
CO-31		0,560	1,330	1,391	1,351	1,319	1,301	1,294

FIG_20A-3

16E2 Octopus (anti-DR5) – 2 dias									
Painel/linha celular	Concentração Log10					G150	TGI	LC50	
	Porcentagem de crescimento								
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0				
Cancro do SNC									
3B3-19	102	103	100	102	104	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
3B3-75	104	101	87	96	97	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
3253	73	66	57	54	56	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
Melanoma									
LOX IMVI	92	86	75	72	70	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
MALME-38	77	83	53	54	53	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
M14	72	50	43	40	41	3,18E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
3K-M2L-2	43	31	12	7	8	<1,00E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
3K-M2L-28	74	71	61	56	47	6,30E+01	>1,00E+02	>1,00E+02	
3K-M2L-5	90	89	81	86	78	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
3AC2-257	86	73	65	63	52	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
3AC2-62	75	60	47	36	35	7,86E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
Cancro ovárico									
LC80V1	99	92	97	96	94	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
OVCA3-3	15	11	3	1	-1	<1,00E+00	5,19E+01	>1,00E+02	
OVCA3-4	97	96	95	92	82	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
OVCA3-5	60	34	29	10	20	1,80E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
OVCA3-8	102	98	99	103	99	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
3B-OV-3	100	102	97	103	104	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
Cancro renal									
785-0	101	101	100	100	102	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
A496	54	29	-2	-4	-4	1,21E+00	9,33E+00	>1,00E+02	
A788	76	72	44	42	42	7,90E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
CMT-1	92	82	77	70	69	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
RAF 393	93	109	100	101	101	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
SR12C	71	52	39	34	44	3,70E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
TR-10	98	95	82	83	78	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
50-51	108	103	99	96	95	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	

FIG. 20A-4

16E2 Octopus (anti-DR5) – 2 dias

Tempo zero	Concentração Log10		Densidades óticas médias			
	Ctr1	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
0,332	0,865	0,653	0,628	0,546	0,545	0,552
0,336	1,268	1,174	1,189	1,130	1,125	1,112
0,361	1,913	1,881	1,935	1,827	1,950	2,020
0,331	0,988	0,958	0,976	0,977	0,992	0,996
0,590	0,974	0,998	0,958	0,883	0,895	0,887
0,579	1,268	1,146	1,028	0,976	0,977	1,018
0,261	1,249	1,053	0,972	0,858	0,843	0,783
0,217	0,971	0,910	0,895	0,782	0,795	0,766
0,570	1,446	1,237	0,989	0,820	0,773	0,728
0,382	1,004	0,963	0,993	1,010	1,013	1,026

FIG. 20A-5

16E2 Octopus (anti-DR5) – 2 dias

Concentração Log10		Percentagem de crescimento						GI50	TGI	LC50
				0,0	0,5	1,0	1,5	2,0		
60	55	40	40	41				4,75E+00	>1,00E+02	>1,00E+02
90	91	85	85	83				>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02
98	101	94	102	107				>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02
95	98	98	101	101				>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02
106	96	76	79	77				>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02
82	65	58	58	64				>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02
80	72	60	59	53				>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02
92	90	75	77	73				>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02
76	48	29	23	18				2,90E+00	>1,00E+02	>1,00E+02
93	98	101	101	103				>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02

FIG._20A-6

APO2L - 2 dias						
Painel/linha celular	Concentração Log10			Densidades óticas médias		
	Ctrl	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Leucemia						
U937-CM	0,576	0,400	0,510	0,443	0,447	0,476
HL-60 (78)	1,926	1,660	1,118	1,074	0,680	0,657
S-562	3,598	1,629	1,557	1,816	1,373	1,349
MDM-4	1,126	1,132	1,131	1,136	1,136	1,167
BM1-8226	3,384	0,599	0,427	0,348	0,358	0,343
SR	1,820	1,578	1,475	1,417	1,428	1,463
Cancro pulmonar de células não pequenas						
A549/ATCC	1,164	1,177	1,173	1,086	1,032	1,068
293x	1,328	1,323	1,337	1,238	1,275	1,268
MDP-62	1,260	1,241	1,174	1,106	1,202	1,136
MDP-92	1,002	0,843	0,780	0,755	0,753	0,766
NCI-H226	0,642	0,651	0,691	0,677	0,665	0,663
NCI-H13	1,820	1,597	1,636	1,626	1,641	1,670
NCI-H322M	1,260	1,130	1,054	0,821	0,808	0,779
NCI-H460	1,562	0,342	0,228	0,171	0,140	0,124
NCI-H323	0,760	0,732	0,705	0,691	0,674	0,657
Cancro de cólon						
COLO 205	0,814	0,029	0,025	0,015	0,021	0,021
HCC-2998	0,742	0,538	0,354	0,291	0,260	0,236
HCT-116	1,855	0,726	0,483	0,399	0,348	0,349
HCT-15	1,183	0,379	0,211	0,144	0,128	0,129
H528	1,477	1,515	1,485	1,404	1,462	1,486
H312	1,440	1,235	1,190	0,922	0,865	0,799
SW-620	0,962	0,849	0,744	0,674	0,632	0,607
Cancro do SNC						
SP-268	0,874	0,891	0,873	0,886	0,901	0,889
SP-265	1,273	0,863	0,728	0,636	0,670	0,603
SP-539	1,840	1,006	0,820	0,632	0,528	0,574

FIG_20B-1

APO2L - 2 dias									
Painel/Linha celular	Concentração Log10					GI50	TDI	LC50	
	Porcentagem de crescimento								
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0				
Leucemia									
GM12878	64	67	73	74	80	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
HL-60 (T8)	82	44	41	27	26	2,63E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
N-562	102	97	87	83	82	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
NO12-4	101	101	101	101	104	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
REN2-8226	28	10	1	2	1	<1,00E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
SR	84	78	74	75	77	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
Cancro pulmonar de células não pequenas									
A549/ATCC	101	101	98	98	90	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
SKNS	100	101	87	93	92	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
HOP-63	98	90	83	94	86	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
HOP-93	57	43	33	33	37	1,77E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
NCI-H226	102	113	109	106	106	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
NCI-H23	98	103	101	102	105	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
NCI-H3224	84	73	43	41	37	7,61E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
NCI-H460	-6	-37	-53	-61	-66	<1,00E+00	<1,00E+00	0,36E+03	
NCI-H522	90	86	82	78	73	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
Cancro do colon									
COLO 205	-80	-83	-88	-86	-86	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	
HCT-2998	50	5	-13	-23	-30	<1,00E+00	4,34E+00	>1,00E+02	
HCT-116	23	7	0	-13	-9	<1,00E+00	1,03E+01	>1,00E+02	
HCT-15	0	1	-30	-34	-39	<1,00E+00	3,24E+00	>1,00E+02	
HCT9	103	101	94	96	97	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
Hs512	89	79	57	52	47	4,89E+01	>1,00E+02	>1,00E+02	
SW-620	86	74	65	63	57	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
Cancro do SNC									
SF-269	103	100	102	103	105	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
SF-293	46	28	16	31	12	<1,00E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
SF-539	96	73	58	58	43	1,03E+01	>1,00E+02	>1,00E+02	

FIG. 20B-2

Painel/Linha celular	APO2L - 2 dias						
	Tempo zero	Concentração Log10			Densidades óticas médias		
		Ctrl	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Cancero do SNC							
SAR-19	0,316	1,144	1,164	1,172	1,151	1,194	1,191
SAR-75	0,326	0,663	0,623	0,637	0,618	0,634	0,589
U251	0,197	0,980	0,913	0,909	0,814	0,833	0,876
Melanomas							
238 1851	0,349	1,657	1,606	1,494	1,415	1,380	1,464
MALME-36	0,350	0,693	0,710	0,701	0,663	0,671	0,647
M14	0,320	1,267	1,213	1,130	1,167	1,124	1,104
SK-MEL-2	0,592	1,003	0,879	0,929	0,920	0,905	0,954
SK-MEL-29	0,345	1,061	1,051	1,029	0,986	0,991	0,930
SK-MEL-5	0,346	2,127	2,076	2,082	2,081	2,217	2,042
UACC-357	0,612	1,245	1,289	1,256	1,199	1,189	1,113
UACC-62	0,597	2,056	1,844	1,677	1,850	1,675	1,582
Cancero ovárico							
1320V1	0,509	0,916	0,947	0,982	0,912	0,960	0,973
OVCAR-3	0,434	1,456	0,983	0,787	0,765	0,659	0,651
OVCAR-4	0,399	1,518	1,472	1,477	1,274	1,310	1,180
OVCAR-5	1,107	1,815	1,700	1,618	1,446	1,452	1,493
OVCAR-8	0,228	0,927	0,928	0,938	0,896	0,930	0,950
SK-OV-3	0,450	1,167	1,126	1,123	1,077	1,162	1,175
Cancero renal							
786-0	0,453	1,424	1,386	1,480	1,434	1,446	1,489
2488	0,767	1,493	1,293	0,950	0,766	0,606	0,616
RCAM	0,360	1,548	1,526	1,590	1,327	1,363	1,318
CAS1-1	0,292	1,503	1,439	1,477	1,266	1,371	1,210
SKP 393	0,546	1,208	1,172	1,170	1,087	1,086	1,089
SK12C	0,511	1,155	1,055	1,072	1,050	1,080	1,064
TR-10	0,539	1,080	1,060	0,975	0,939	0,839	0,756
DO-21	0,580	1,342	1,334	1,362	1,391	1,387	1,439

FIG. 20B-3

Painel/linha celular	APO2L - 2 dias					
	Concentração Log10					
	Porcentagem de crescimento					
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	
Carcino do SNC	102	103	101	106	106	LC50
	88	92	87	91	78	>1,00E+02
	91	91	79	81	87	>1,00E+02
						>1,00E+02
Melanoma	98	98	81	79	85	>1,00E+02
	106	103	93	94	87	>1,00E+02
	94	85	89	85	83	>1,00E+02
	78	82	80	76	88	>1,00E+02
Carcino ovário	93	93	89	90	82	>1,00E+02
	97	98	97	105	96	>1,00E+02
	107	102	93	81	79	>1,00E+02
	85	74	72	74	68	>1,00E+02
Carcino renal	104	109	98	106	108	>1,00E+02
	84	34	32	22	21	>1,00E+02
	96	96	79	82	71	>1,00E+02
	84	72	48	49	54	>1,00E+02
Carcino renal	100	102	93	100	103	>1,00E+02
	96	94	87	99	101	>1,00E+02
	98	98	101	102	107	>1,00E+02
	73	26	1	-20	-19	>1,00E+02
Carcino renal	98	104	81	84	81	>1,00E+02
	95	98	80	89	76	>1,00E+02
	99	84	82	82	77	>1,00E+02
	89	87	84	88	86	>1,00E+02
Carcino renal	86	81	74	56	40	>1,00E+02
	99	102	106	106	113	>1,00E+02

FIG. 20B-4

Painel/linha celular Cancro da próstata	Tempo zero	APO2L - 2 dias				
		Concentração Log10				
		Ctrl	0,0	0,5	1,0	1,5
PC-3	0,332	0,886	0,758	0,746	0,700	0,692
MDA-MB-231	0,336	1,314	1,349	1,315	1,052	0,766
Cancro da mama						
MCF7	0,361	2,212	1,918	1,618	1,333	1,188
MCF10A	0,331	0,942	0,987	0,916	0,973	0,981
MCF10B	0,390	0,966	0,945	0,988	0,958	0,923
MCF10H	0,379	1,049	1,074	1,053	1,043	1,077
MCF10A	0,361	1,392	1,295	1,274	1,027	0,954
MCF10B	0,373	0,929	0,959	0,997	0,806	0,807
MCF10H	0,370	1,415	1,333	1,377	1,386	1,356
T-47D	0,382	1,044	1,014	1,025	1,000	0,955

FIG. 20B-5

Painel/Linha celular Cancro da próstata	APO2L - 2 dias						L
	Concentração Log10						
	Percentagem de crescimento						
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	GI50	
PC-3	77	75	68	64	65	>1,00E+02	>1,00E+02
DU-145	93	90	73	52	44	4,07E+01	>1,00E+02
Cancro da mama	84	68	52	49	44	3,57E+01	>1,00E+02
	106	111	104	106	105	>1,00E+02	>1,00E+02
MDA-MB-231/ATCC	100	100	93	84	109	>1,00E+02	>1,00E+02
MDA-MB-435	105	101	98	100	106	>1,00E+02	>1,00E+02
MDA-MB-435	91	90	68	70	61	>1,00E+02	>1,00E+02
MDA-MB-435	90	96	83	83	83	>1,00E+02	>1,00E+02
BT-20	96	96	86	86	81	>1,00E+02	>1,00E+02
T-47D	95	97	93	101	87	>1,00E+02	>1,00E+02

FIG. 20B-6

16E2 Octopus (anti-OR5) - 6 dias

Painel/linha celular Leucemia	Tempo zero	Concentração Log10		Densidades óticas médias			
		Ctrl	0,0	1,5			2,0
				0,5	1,0	1,5	
C22F-C224	0,004	0,731	0,632	0,730	0,789	0,720	0,303
H1-63 (T8)	0,068	2,840	2,914	3,350	3,934	3,813	2,039
X-562	0,046	2,841	2,912	3,318	3,776	3,793	2,699
WCLT-4	0,009	0,931	0,450	0,267	0,266	0,282	0,196
WCLT-8226	0,061	3,637	0,904	0,723	0,604	0,584	0,418
SR	0,031	2,631	0,643	0,261	0,136	0,091	0,110
Cancro pulmonar de células não pequenas							
A349/ATC	0,021	2,721	2,734	0,443	0,524	2,458	2,314
EMTX	0,057	3,631	0,939	0,656	0,773	0,603	0,591
HOP-62	0,039	0,922	0,750	0,767	0,603	0,595	0,541
HOP-92	0,110	0,780	0,642	0,538	0,577	0,525	0,512
WCL-823	0,103	1,191	1,103	1,027	1,069	1,034	1,057
WCL-822M	0,038	1,051	0,841	0,716	0,858	0,965	0,826
WCL-8360	0,050	3,780	1,042	0,668	0,399	0,459	0,387
WCL-8522	0,064	0,698	0,481	0,406	0,386	0,409	0,307
Cancro do colon							
COLD 205	0,001	1,430	-0,014	-0,033	-0,014	-0,014	-0,013
WCL-3398	0,031	0,974	0,296	0,096	0,067	0,047	0,036
WCL-116	0,068	3,361	2,404	2,329	2,028	1,901	1,891
WCL-15	0,020	2,056	0,435	0,168	0,100	0,096	0,107
WCL9	0,062	2,528	2,445	2,323	2,293	2,387	2,210
WCL2	0,010	0,708	0,390	0,324	0,406	0,290	0,283
WCL-620	0,010	2,141	1,392	1,302	1,282	1,143	0,966
Cancro do SNC							
SP-266	0,041	1,069	1,017	0,969	0,999	0,980	0,966
SP-295	0,054	1,614	0,031	0,019	0,016	0,023	0,023
SP-539	0,030	1,468	0,673	0,672	0,624	0,446	0,572

FIG._21A-1

16E2 Octopus (anti-DR5) - 6 dias

Painel/Linha celular	Concentração Log10					
	Porcentagem de crescimento					
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	LC50
Leucemia						
CCRF-CGM	114	100	108	98	14	>1,00E+02
HL-60 (Tb)	103	104	103	99	71	>1,00E+02
K-562	99	92	94	95	91	>1,00E+02
K512-4	49	29	26	28	19	>1,00E+02
KPM1-9286	53	42	34	33	35	>1,00E+02
SR	24	9	4	2	3	>1,00E+02
Cancro pulmonar de células não pequenas						
H460/ATCC	100	90	93	90	85	>1,00E+02
H522	77	73	63	55	46	>1,00E+02
HOP-82	60	62	72	62	56	>1,00E+02
HOP-93	70	68	68	61	59	>1,00E+02
HCI-H13	92	85	89	86	89	>1,00E+02
HCI-H1224	79	67	81	92	78	>1,00E+02
HCI-H460	34	27	13	15	13	>1,00E+02
HCI-H522	71	59	55	59	42	>1,00E+02
Cancro do colon						
C3LO 205	-100	-100	-100	-100	-100	<1,00E+00
HCT-2098	28	7	4	3	1	>1,00E+02
HCT-116	81	78	68	64	56	>1,00E+02
HCT-15	20	7	4	4	4	>1,00E+02
H29	97	93	91	94	87	>1,00E+02
H412	34	46	68	40	39	>1,00E+02
SW-620	65	61	60	53	45	>1,00E+02
Cancro do SNC						
SP-268	65	90	93	91	89	>1,00E+02
SP-295	-43	-66	-67	-57	-57	1,45E+00
SP-539	59	45	41	43	38	>1,00E+02

FIG. 21A-2

16E2 Octopus (anti-DR5) – 6 dias							
Painel/linha celular	Tempo zero	Concentração Log10			Densidades óticas médias		
		Ctrl	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Carcinoma de GBC							
2003-19	0,018	1,813	1,594	1,598	1,544	1,794	1,822
2003-75	0,063	0,524	0,534	0,477	0,468	0,541	0,530
U251	0,012	1,561	0,188	0,163	0,116	0,166	0,147
Melanoma							
LOX IMVI	0,017	3,073	2,094	1,635	1,272	1,229	1,274
M14	0,035	1,838	1,147	0,745	0,628	0,585	0,652
SK-MEL-2	0,083	0,498	0,209	0,169	0,166	0,151	0,153
SK-MEL-28	0,043	1,316	0,703	0,668	0,603	0,504	0,478
SK-MEL-5	0,095	1,885	1,902	1,947	1,883	1,916	1,895
UACC-257	0,070	0,841	0,504	0,447	0,420	0,393	0,376
UACC-62	0,121	1,601	1,119	0,938	0,781	0,764	0,819
Carcinoma ovárico							
OVCAV1	0,019	1,567	1,476	1,603	1,622	1,529	1,510
OVCAV-3	0,086	1,285	0,039	0,041	0,039	0,040	0,033
OVCAV-4	0,071	1,563	1,304	1,287	1,028	0,996	0,854
OVCAV-5	0,101	1,638	1,390	1,053	1,046	0,873	0,837
OVCAV-8	0,038	1,565	1,634	1,571	1,587	1,638	1,570
SK-OV-3	0,056	0,811	0,817	0,812	0,813	0,759	0,769
Carcinoma renal							
786-0	0,073	1,715	1,716	1,715	1,726	1,731	1,688
7868	0,087	1,658	0,996	0,877	0,797	0,692	0,718
7869	0,041	1,878	1,331	0,907	0,016	0,020	0,020
Caki-1	0,033	1,215	0,797	0,758	0,492	0,335	0,312
SNF 393	0,101	0,973	0,496	0,086	0,043	0,029	0,028
SN12C	0,054	1,363	0,649	0,504	0,358	0,315	0,249
TS-10	0,087	1,088	1,030	0,925	0,811	0,686	0,568
VO-31	0,095	1,457	1,201	0,639	0,703	0,476	0,418

FIG_21A-3

16E2 Octopus (anti-DR5) – 6 dias									
Painel/Linha celular Cancro do SNC	Concentração Log10					GI50	TGI	LC50	
	Porcentagem de crescimento								
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0				
Cancro do SNC									
SNB-19	88	88	85	99	100	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
SNB-75	102	98	93	104	101	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
U251	11	20	7	10	9	<1,00E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
Melanoma									
SK-MEL-2	68	53	43	39	41	4,38E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
SK-MEL-2	62	38	33	31	34	1,83E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
SK-MEL-28	30	19	20	18	17	<1,00E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
SK-MEL-5	52	49	44	36	34	2,11E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
UACC-257	103	103	100	100	101	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
UACC-257	56	49	45	42	40	2,84E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
UACC-62	67	53	45	43	47	5,44E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
Cancro ovarico									
IGROV1	94	102	104	98	96	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
OVCA9-3	-55	-52	-55	-53	-52	<1,00E+00	<1,00E+00	<1,00E+00	
OVCA9-4	82	81	64	60	52	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
OVCA9-5	86	63	63	51	49	5,82E+01	>1,00E+02	>1,00E+02	
OVCA9-8	104	100	101	104	100	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
OV-99-3	101	100	100	93	94	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
Cancro renal									
796-0	100	100	103	101	98	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
A498	94	81	67	62	65	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
A498	67	14	-63	-51	-51	1,44E+00	3,92E+00	8,46E+00	
CAK-1	65	61	39	42	41	5,62E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
RDY 393	45	-15	-58	-71	-72	<1,00E+00	2,37E+00	8,08E+00	
SN12C	51	37	23	22	16	1,98E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	
79-10	94	86	75	60	51	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02	
103-31	81	55	44	28	24	5,33E+00	>1,00E+02	>1,00E+02	

FIG. 21A-4

16E2 Octopus (anti-DR5) – 6 dias						
Painel/Linha celular Cancro da próstata	Tempo zero	Concentração Log10		Densidades óticas médias		
		Ctrl	0,0	0,5	1,0	1,5
PC-3	0,030	0,879	0,520	0,379	0,334	0,333
	0,057	1,962	1,067	1,790	1,717	1,654
Cancro da mama	0,060	2,303	2,856	2,870	2,865	2,843
	0,045	1,087	1,064	1,034	1,157	1,088
MCF-7	0,042	0,818	0,674	0,577	0,536	0,573
	0,055	0,759	0,470	0,322	0,261	0,201
MDA-MB-231/ATCC	0,041	2,284	1,227	0,933	0,806	0,723
	0,010	0,361	0,490	0,457	0,355	0,313
MDA-MB-435	0,103	1,376	0,993	0,521	0,364	0,251
	0,049	0,636	0,613	0,564	0,528	0,613

FIG. 21A-5

18E2 Octopus (anti-DR5) – 6 dias

Painel/Linha celular Cancro da próstata	Concentração Log10 Porcentagem de crescimento					GI50	TGI	LC50
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0			
PC-3	38	41	36	34	26	1,70E+00	>1,00E+02	>1,30E+02
DU-145	96	91	87	88	84	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,00E+02
Cancro da mama								
MCF7	98	99	98	97	98	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,30E+02
MDA-MB-323	98	97	107	104	100	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,30E+02
MDA-MB-231/ATCC	91	69	84	57	69	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,30E+02
MDA-MB-435	89	38	29	39	21	1,84E+00	>1,00E+02	>1,30E+02
MDA-MB-435	53	41	34	33	30	1,33E+00	>1,00E+02	>1,30E+02
MDA-MB-435	56	53	40	37	36	4,04E+00	>1,00E+02	>1,30E+02
BT-549	74	33	22	16	12	2,31E+00	>1,00E+02	>1,30E+02
T-47D	98	83	83	83	98	>1,00E+02	>1,00E+02	>1,30E+02

FIG._21A-6

Painel/Linha celular	Tempo zero	APO2L-6 dias				Densidades óticas médias		
		Concentração Log10				1,0		
		Ctrl	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	
Leucemia								
CCRF-C26	0,004	0,842	0,753	0,453	0,365	0,574	0,569	
HL-60 (78)	0,068	3,532	0,312	0,317	0,203	0,116	0,080	
K-562	0,046	3,793	2,962	3,017	2,920	3,716	2,536	
HL60-4	0,009	1,040	0,929	0,928	0,965	0,999	0,787	
BM1-8226	0,061	1,661	0,072	0,038	0,041	0,025	0,022	
SR	0,031	2,591	2,540	2,234	1,913	1,822	1,708	
Cancro pulmonar de células não pequenas								
A549/HCC	0,031	2,037	0,071	2,030	3,028	3,045	2,050	
EMX	0,057	1,052	1,070	1,039	1,078	1,000	0,962	
HOP-62	0,059	0,691	0,854	0,854	0,797	0,725	0,562	
HOP-92	0,110	0,906	0,750	0,698	0,700	0,705	0,723	
HCT-823	0,103	1,184	1,180	1,147	1,122	1,189	1,183	
HCT-H32M	0,038	0,376	0,824	0,606	0,888	0,436	0,346	
HCT-H400	0,050	2,857	0,536	0,239	0,253	0,063	0,040	
HCT-H523	0,064	0,461	0,354	0,344	0,336	0,263	0,230	
Cancro do cólon								
COLO 205	0,001	1,336	-0,085	-0,097	0,006	0,002	0,014	
HCC-2998	0,031	1,083	0,602	0,274	0,305	0,202	0,189	
HCT-116	0,068	3,314	2,272	1,806	1,349	0,953	0,821	
HCT-15	0,020	2,169	0,196	0,054	0,039	0,010	0,030	
HT29	0,032	1,968	1,970	1,962	2,035	2,034	2,863	
HM13	0,010	0,673	0,244	0,218	0,113	0,052	0,052	
SW-620	0,010	3,236	1,477	1,320	1,040	0,943	0,608	
Cancro de SNC								
SF-268	0,041	0,993	0,891	0,914	0,906	0,832	0,937	
SF-295	0,054	1,638	1,054	0,706	0,634	0,587	0,529	
SF-539	0,020	1,513	1,411	1,046	1,113	1,034	0,699	

FIG_21B-1

Painel/Linha celular	APO2L - 6 dias					TCR	LC50
	Concentração Log10						
	Porcentagem de crescimento						
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0		
Leucemia							
CCRF-CEM	89	54	43	68	67	>1,00E+02	>1,00E+02
HL-60 1787	23	9	5	2	0	<1,00E+00	>1,00E+02
K-562	106	108	105	97	94	>1,00E+02	>1,00E+02
NC27-4	89	89	93	96	76	>1,00E+02	>1,00E+02
K562-6226	1	-39	-34	-59	-65	1,02E+00	2,10E+01
SK	98	86	74	70	65	>1,00E+02	>1,00E+02
Cancro pulmonar de células não pequenas							
A549/ATCC	102	103	100	100	100	>1,00E+02	>1,00E+02
209X	102	99	103	95	91	>1,00E+02	>1,00E+02
HOP-62	96	95	87	83	72	>1,00E+02	>1,00E+02
HOP-82	80	74	74	73	77	>1,00E+02	>1,00E+02
NCI-H23	100	97	94	103	98	>1,00E+02	>1,00E+02
NCI-H3228	84	63	48	42	33	8,30E+00	>1,00E+02
NCI-H460	17	7	4	0	-4	<1,00E+02	>1,00E+02
NCI-H522	73	70	68	50	44	3,57E+01	>1,00E+02
Cancro do cólon							
COLO 205	-100	-103	0	0	1	<1,00E+00	>1,00E+02
HCT-2998	62	23	26	16	15	1,43E+00	>1,00E+02
HCT-116	75	52	40	30	36	3,91E+03	>1,00E+02
HCT-15	8	3	1	-10	0	<1,00E+02	>1,00E+02
H729	100	103	103	103	128	>1,00E+02	>1,00E+02
H461	38	33	20	7	7	<1,00E+02	>1,00E+02
SK-620	66	54	46	42	27	3,39E+03	>1,00E+02
Cancro do SNC							
SF-268	100	103	102	95	104	>1,00E+02	>1,00E+02
SF-295	62	41	36	31	30	1,92E+03	>1,00E+02
SF-539	93	69	73	66	44	7,59E+01	>1,00E+02

FIG. 21B-2

Painel/linha celular	APO2L - 6 dias				
	Concentração Log10				
	Tempo zero	Ctrl	0,0	0,5	1,0
Densidades óticas médias					
1,5					
2,0					
2,5					
3,0					
3,5					
4,0					
4,5					
5,0					
5,5					
6,0					
6,5					
7,0					
7,5					
8,0					
8,5					
9,0					
9,5					
10,0					
10,5					
11,0					
11,5					
12,0					
12,5					
13,0					
13,5					
14,0					
14,5					
15,0					
15,5					
16,0					
16,5					
17,0					
17,5					
18,0					
18,5					
19,0					
19,5					
20,0					
20,5					
21,0					
21,5					
22,0					
22,5					
23,0					
23,5					
24,0					
24,5					
25,0					
25,5					
26,0					
26,5					
27,0					
27,5					
28,0					
28,5					
29,0					
29,5					
30,0					
30,5					
31,0					
31,5					
32,0					
32,5					
33,0					
33,5					
34,0					
34,5					
35,0					
35,5					
36,0					
36,5					
37,0					
37,5					
38,0					
38,5					
39,0					
39,5					
40,0					
40,5					
41,0					
41,5					
42,0					
42,5					
43,0					
43,5					
44,0					
44,5					
45,0					
45,5					
46,0					
46,5					
47,0					
47,5					
48,0					
48,5					
49,0					
49,5					
50,0					
50,5					
51,0					
51,5					
52,0					
52,5					
53,0					
53,5					
54,0					
54,5					
55,0					
55,5					
56,0					
56,5					
57,0					
57,5					
58,0					
58,5					
59,0					
59,5					
60,0					
60,5					
61,0					
61,5					
62,0					
62,5					
63,0					
63,5					
64,0					
64,5					
65,0					
65,5					
66,0					
66,5					
67,0					
67,5					
68,0					
68,5					
69,0					
69,5					
70,0					
70,5					
71,0					
71,5					
72,0					
72,5					
73,0					
73,5					
74,0					
74,5					
75,0					
75,5					
76,0					
76,5					
77,0					
77,5					
78,0					
78,5					
79,0					
79,5					
80,0					
80,5					
81,0					
81,5					
82,0					
82,5					
83,0					
83,5					
84,0					
84,5					
85,0					
85,5					
86,0					
86,5					
87,0					
87,5					
88,0					
88,5					
89,0					
89,5					
90,0					
90,5					
91,0					
91,5					
92,0					
92,5					
93,0					
93,5					
94,0					
94,5					
95,0					
95,5					
96,0					
96,5					

Painel/Linha celular	APOB - 6 dias					
	Concentração Log10					
	Porcentagem de crescimento					
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	LC50
Cancro do SNC						
SNB-19	104	94	100	103	99	>1,00E+02
SNB-15	91	101	94	102	102	>1,00E+02
U251	23	30	23	21	22	>1,00E+02
Melanoma						
LMX IMVI	85	74	76	68	71	>1,00E+02
M14	94	85	83	89	85	>1,00E+02
SK-MEL-2	87	62	73	71	73	>1,00E+02
SK-MEL-28	83	86	81	74	61	>1,00E+02
SK-MEL-5	102	105	100	107	118	>1,00E+02
UACC-253	90	85	89	82	78	>1,00E+02
UACC-62	93	94	80	79	83	>1,00E+02
Cancro ovariano						
IGROV1	100	94	94	85	91	>1,00E+02
OVCAR-3	1	-16	-43	-63	-57	1,00E+01
OVCAR-4	87	82	79	67	70	>1,00E+02
OVCAR-5	94	87	86	83	78	>1,00E+02
OVCAR-8	94	98	97	100	98	>1,00E+02
SK-OV-3	98	95	101	97	98	>1,00E+02
Cancro renal						
786-0	100	101	102	100	101	>1,00E+02
A498	97	94	93	88	86	>1,00E+02
A498	96	97	95	93	88	>1,00E+02
CAKI-1	103	87	94	95	89	>1,00E+02
K562 J93	55	25	30	40	18	>1,00E+02
SK-RC	100	100	97	100	93	>1,00E+02
TK-10	94	86	84	73	64	>1,00E+02
VO-31	94	91	90	87	87	>1,00E+02

FIG. 21B-4

Painel/Linha celular Cancro da próstata	Tempo zero	APO2L-6 dias				
		Concentração Log10		Densidades óticas médias		
		Ctr1	0,0	0,5	1,0	2,0
PC-3	0,020	0,813	0,520	0,467	0,264	0,342
MD-145	0,037	1,911	1,610	1,744	1,633	1,024
Cancro da mama						
MCF7	0,060	3,104	3,264	2,012	1,444	0,700
MCF/ADR-ME3	0,045	1,813	1,037	1,036	1,017	0,974
M22-M2-231/ATOC	0,042	0,873	0,774	0,755	0,805	0,720
R3 5787	0,055	0,481	0,512	0,511	0,508	0,515
M22-M2-475	0,041	2,083	2,007	1,758	1,719	1,387
M22-M	0,010	0,684	0,809	0,738	0,803	0,571
BT-549	0,100	1,298	1,457	1,398	1,377	1,346
T-47D	0,049	0,567	0,582	0,568	0,535	0,480

FIG. 21B-5

Painel/Linha celular	APO2L- 6 dias						TC1	TC50
	Concentração Log10							
	Percentagem de crescimento							
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0			
Cancro da próstata								
PC-3	82	86	43	50	40	>1,00E+02	>1,00E+02	
DU-145	96	91	88	70	52	>1,00E+02	>1,00E+02	
Cancro da mama								
MCF7	73	84	43	25	23	7,57E+00	>1,00E+02	
MCF/ADR-MES	102	102	100	88	66	>1,00E+02	>1,00E+02	
MDA-MB-231/ATCC	88	86	92	85	82	>1,00E+02	>1,00E+02	
HS 578T	106	105	104	106	106	>1,00E+02	>1,00E+02	
MDA-MB-435	96	84	82	72	66	>1,00E+02	>1,00E+02	
MDA-N	82	75	81	68	58	>1,00E+02	>1,00E+02	
BT-20	113	109	107	111	104	>1,00E+02	>1,00E+02	
T-47D	103	100	103	100	85	>1,00E+02	>1,00E+02	

FIG. 21B-6

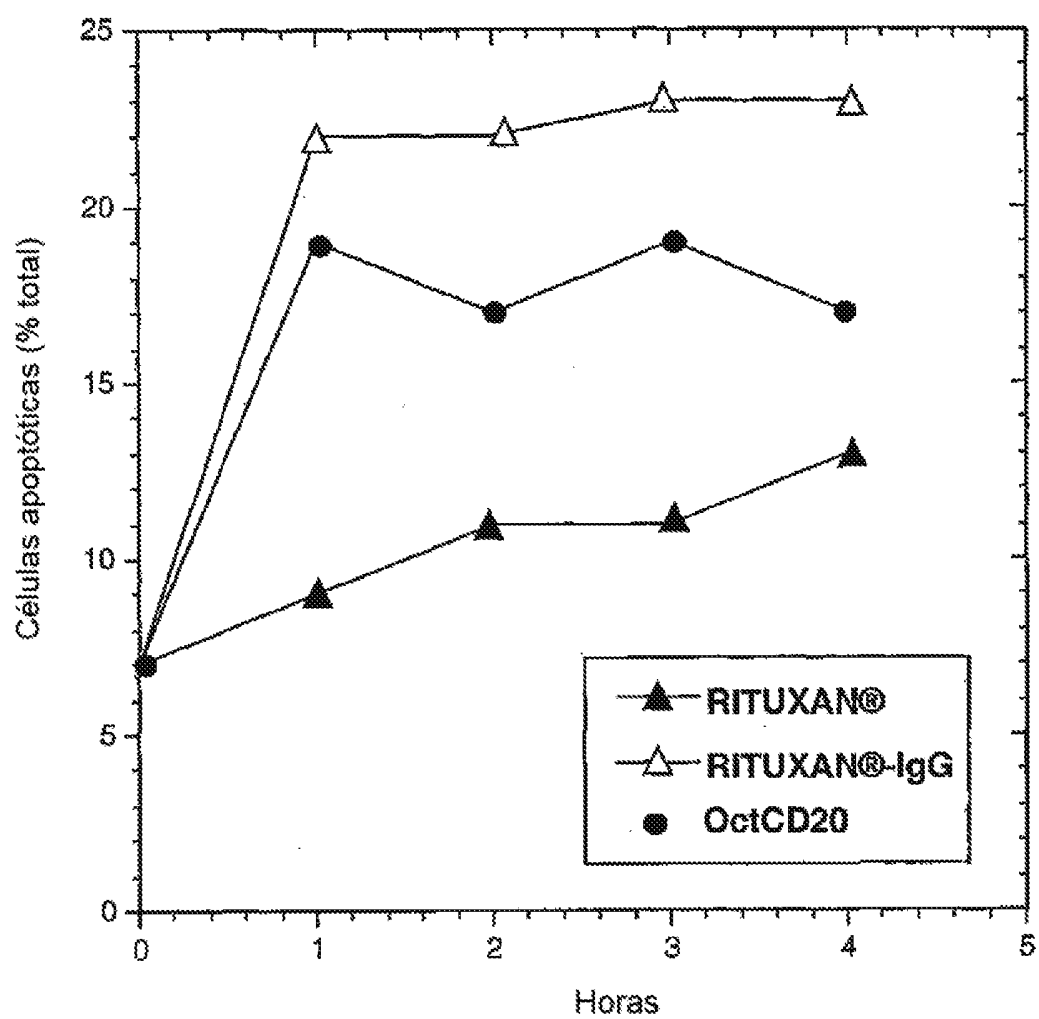
**FIG. 22**

FIG._23A

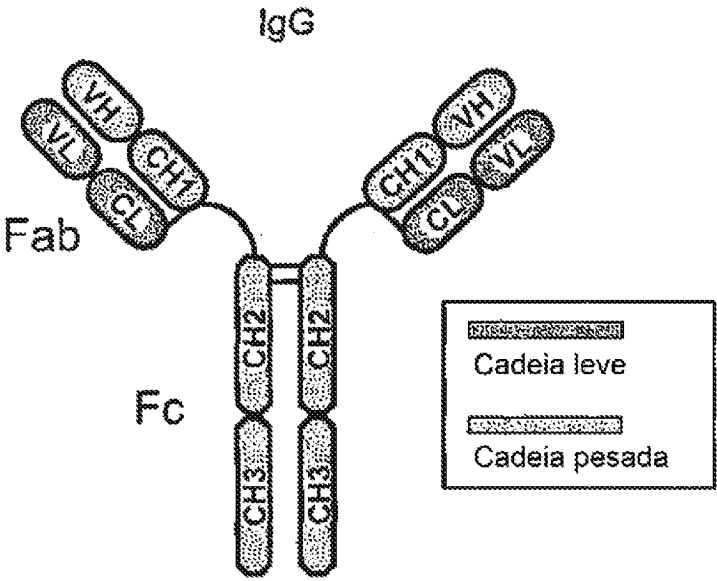
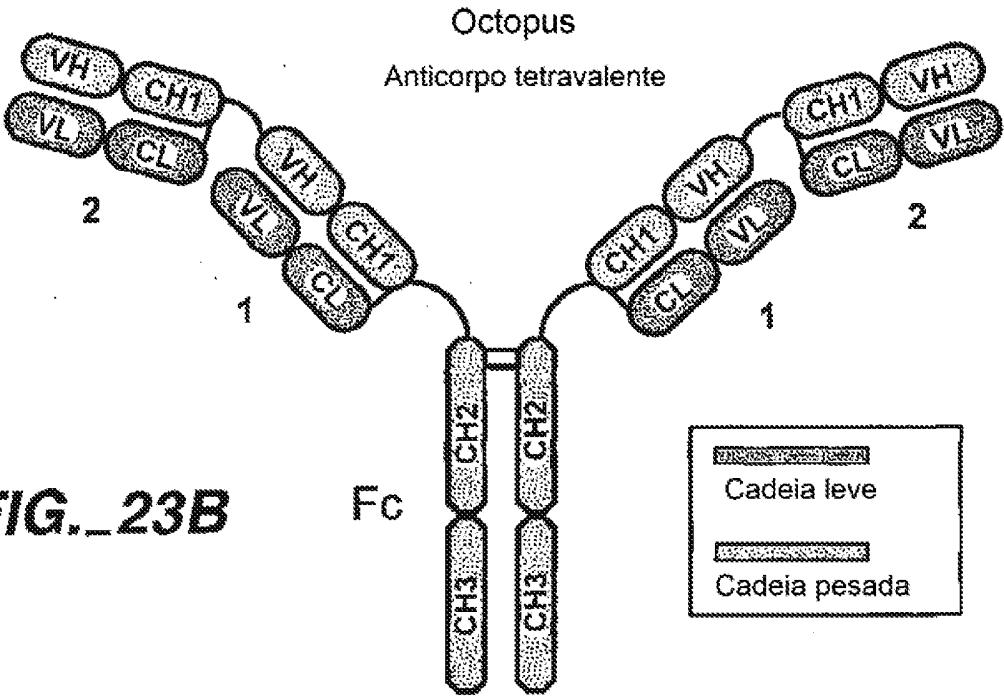
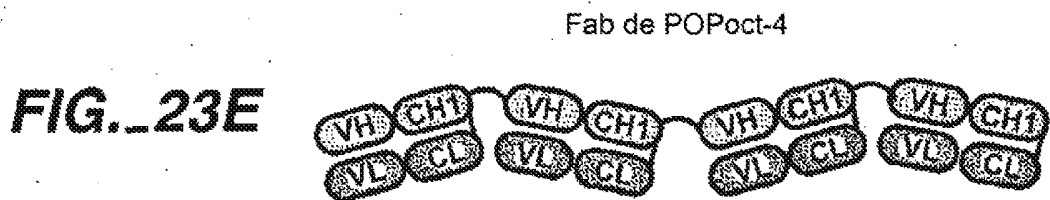
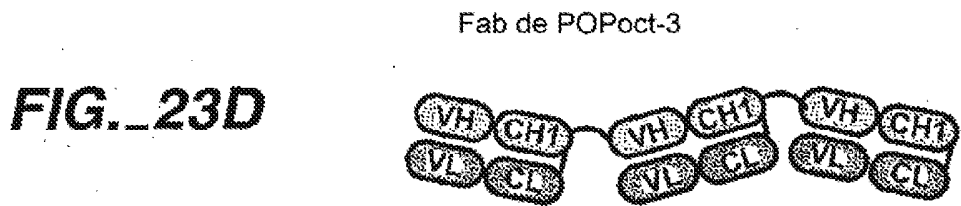
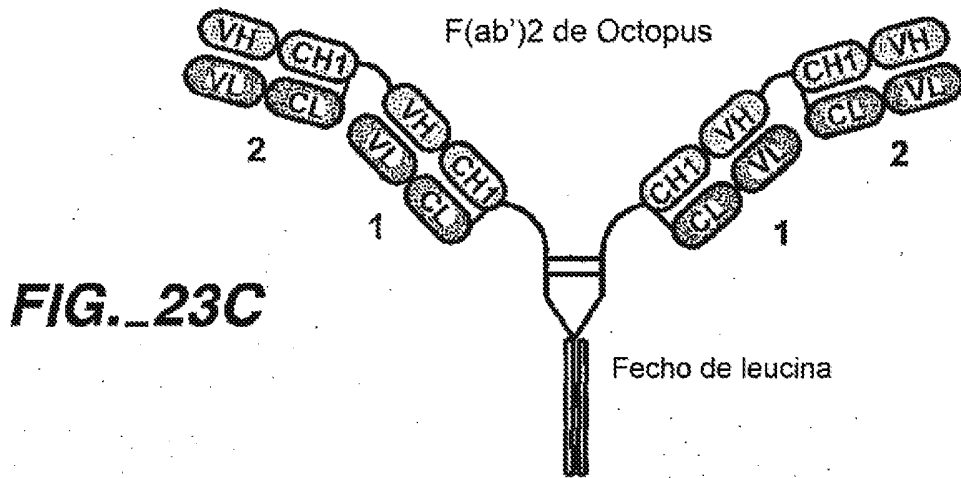
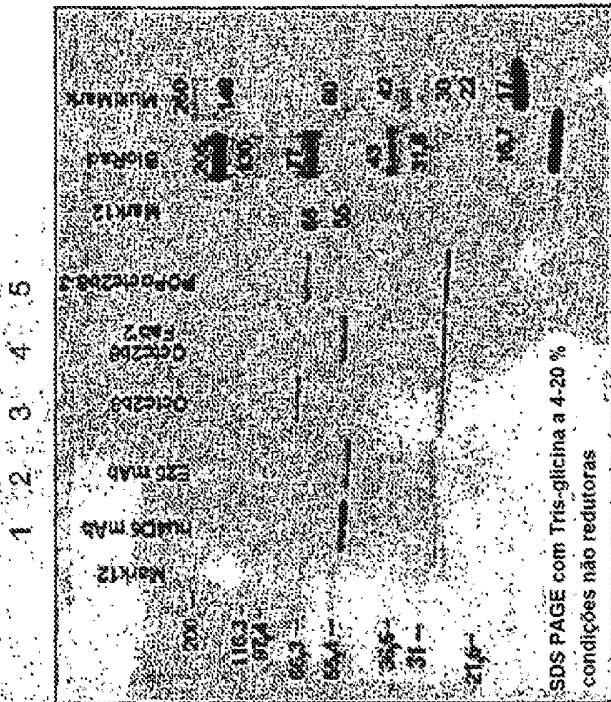


FIG._23B





Comparação de tamanho de construções de Octopus:

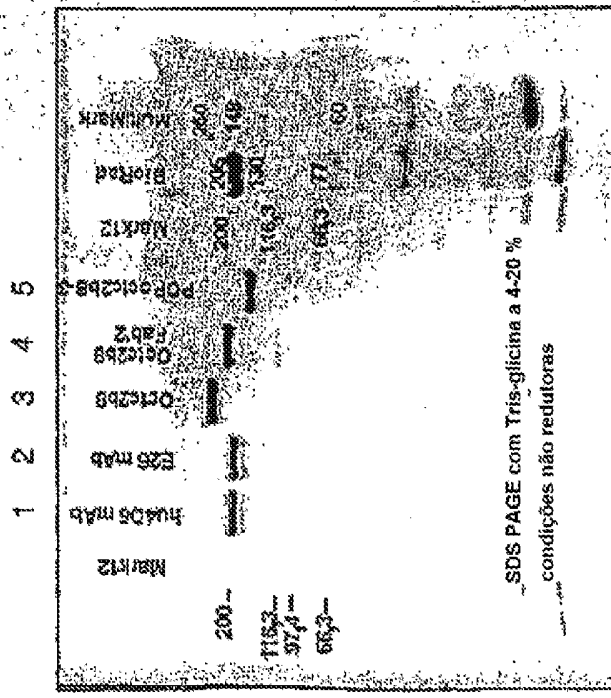


Condições redutoras
MW de cadeia pesada + leve

mAb	55 kDa
OctC2B8	75 kDa
OctC2B8 Fab'2	55 kDa
POpOctC2B8-3	73 kDa
POpOct-4	97 kDa

FIG._23G

Comparação de tamanho de construções de Octopus:



Condições não redutoras
MW de cadeia pesada + leve

mAb	150 kDa
OctC2B8	240 kDa
OctC2B8 Fab'2	200 kDa
POpOctC2B8-3	140 kDa
POpOct-4	190 kDa

FIG._23F

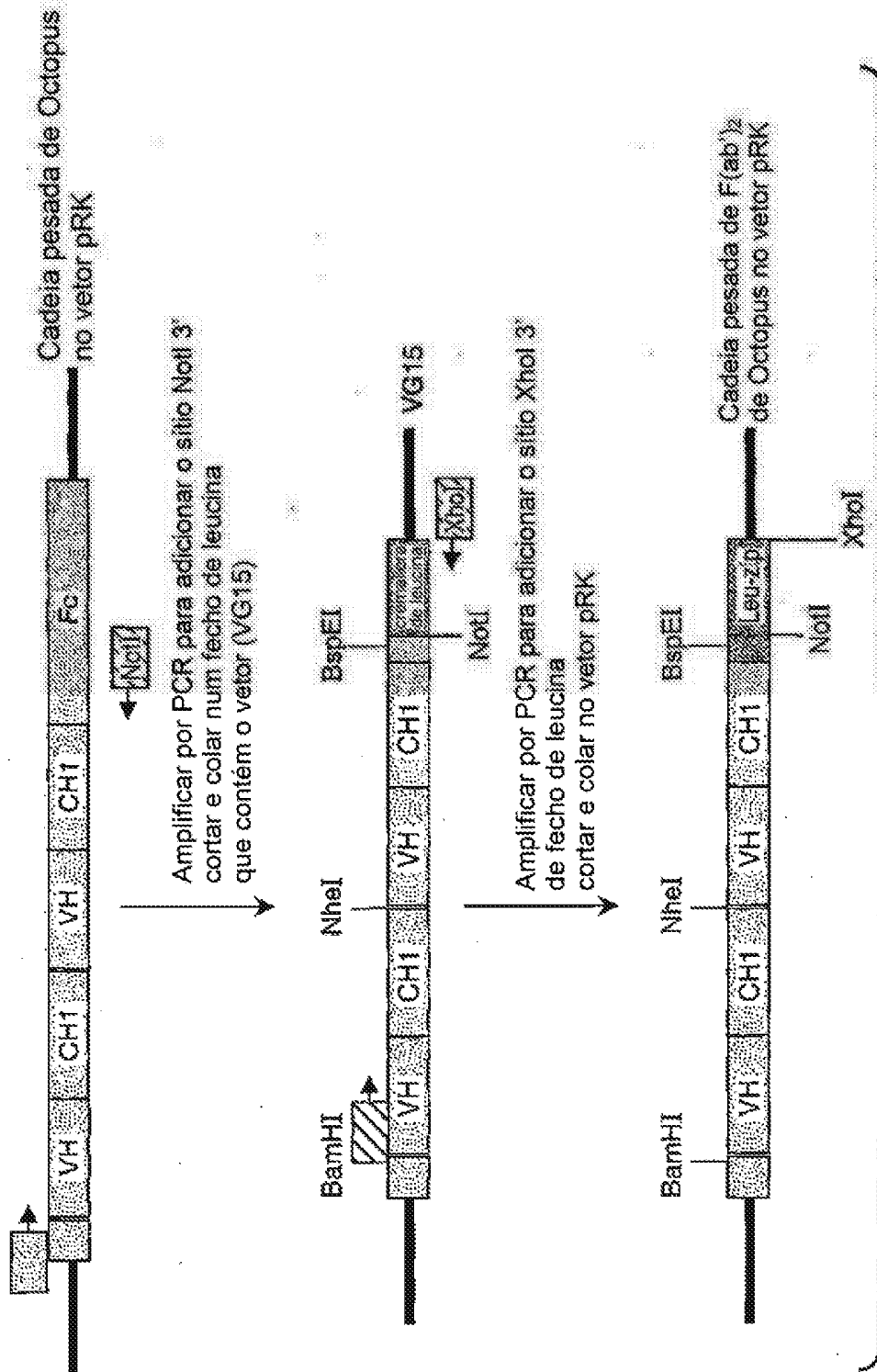


FIG. 24

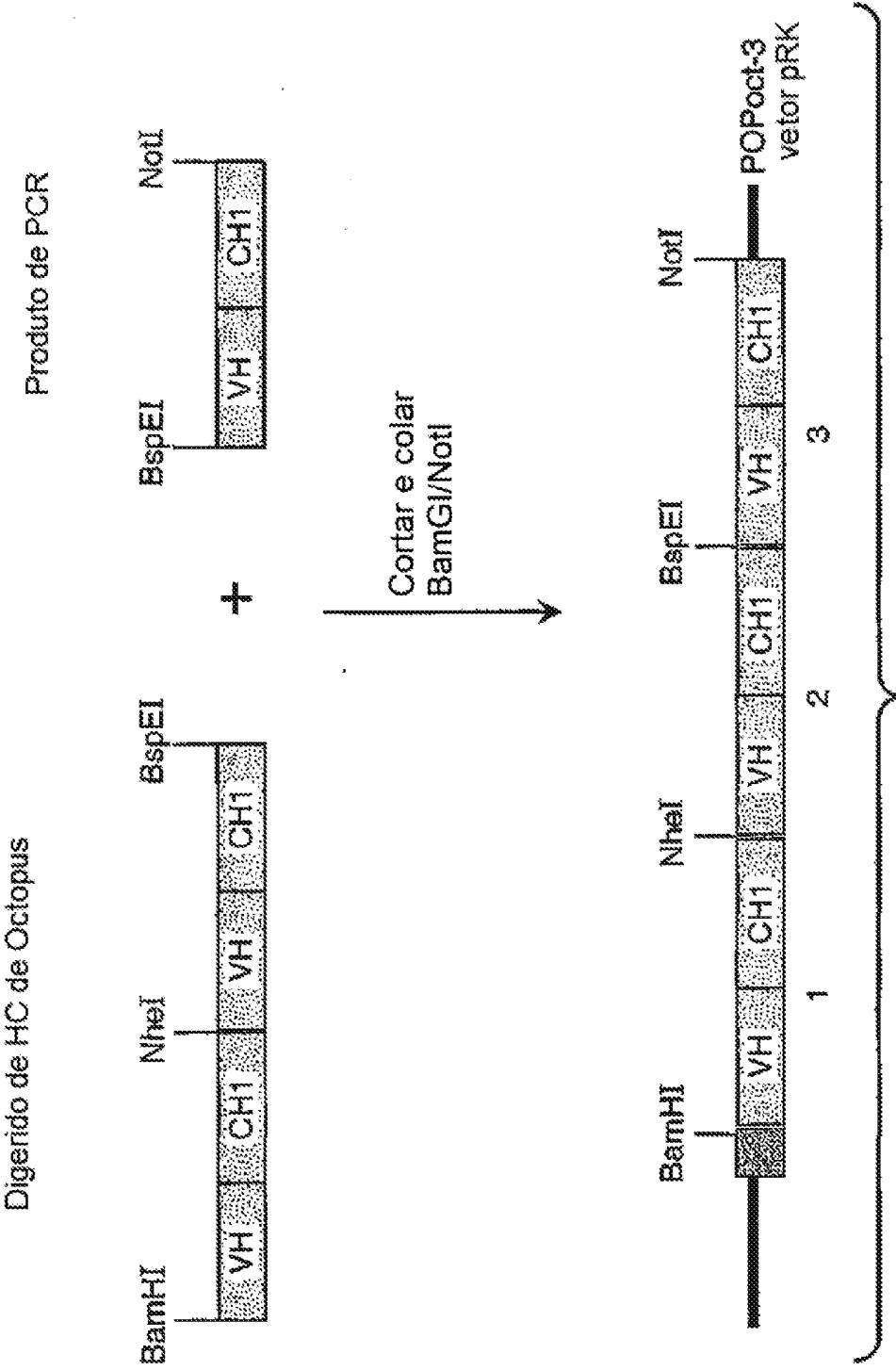


FIG. 25

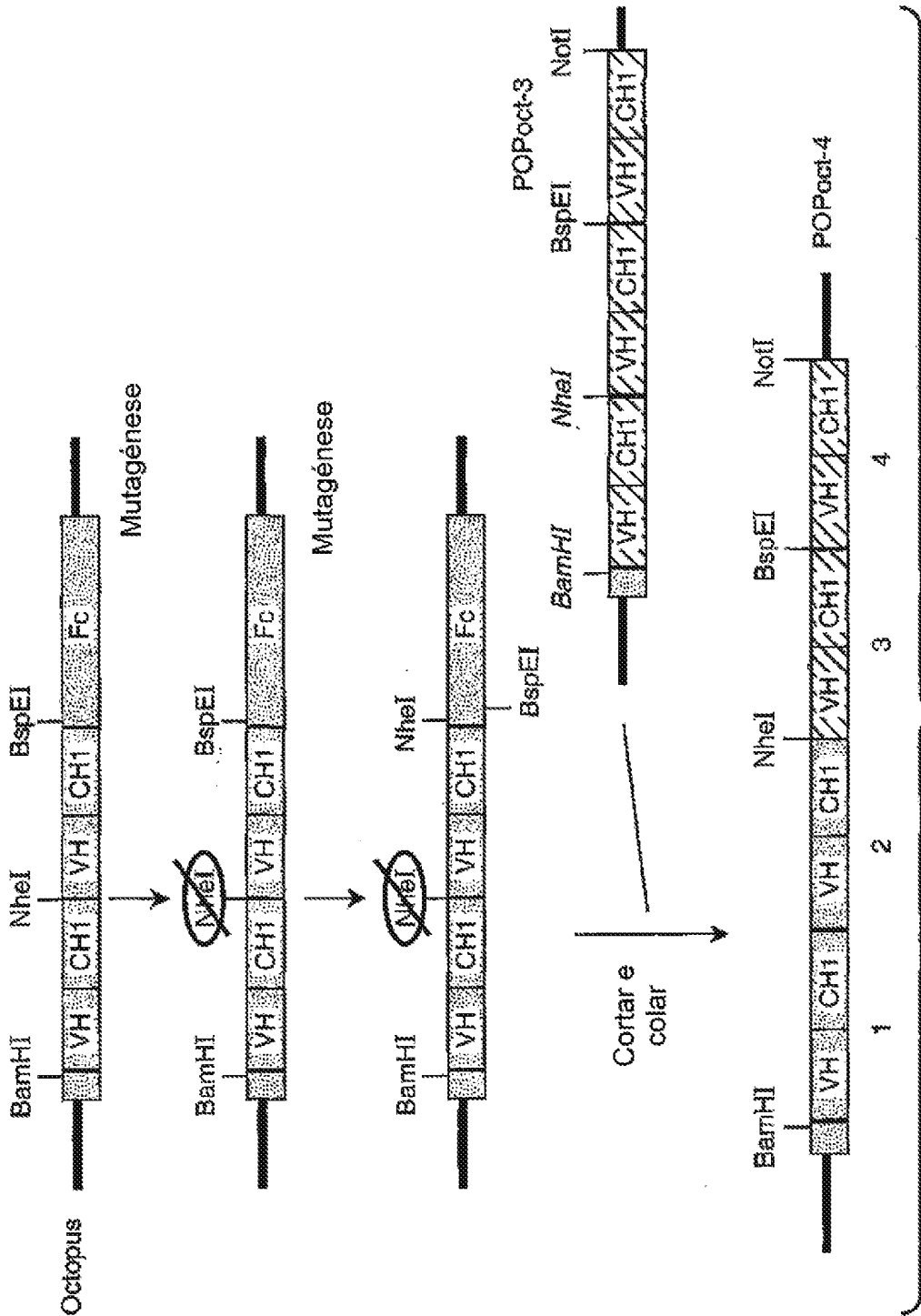
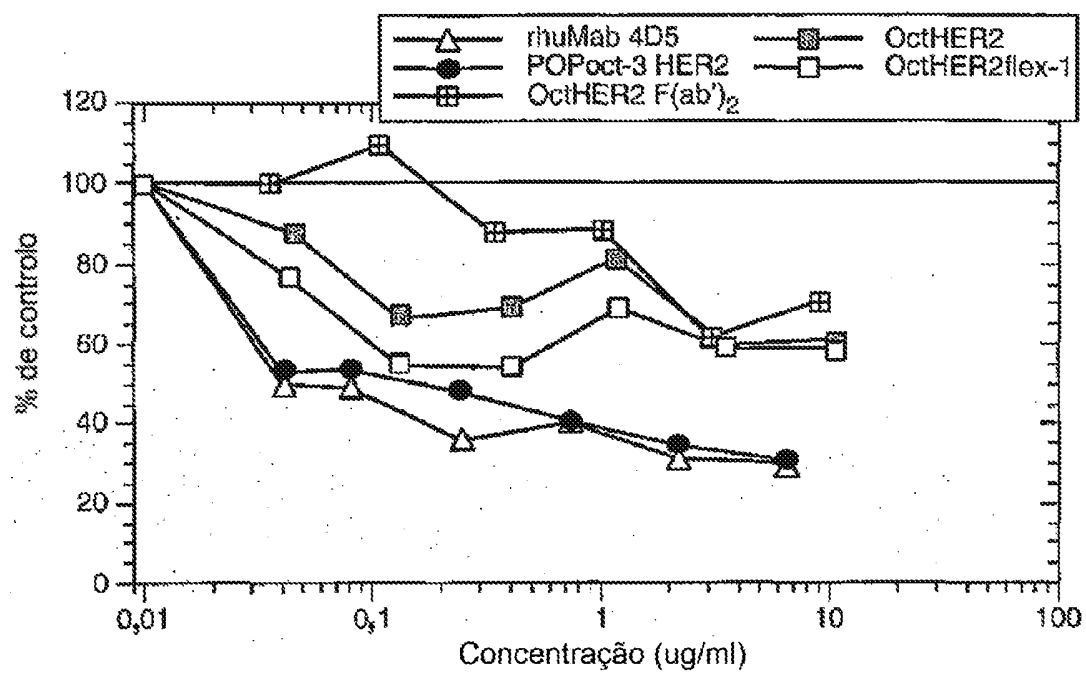
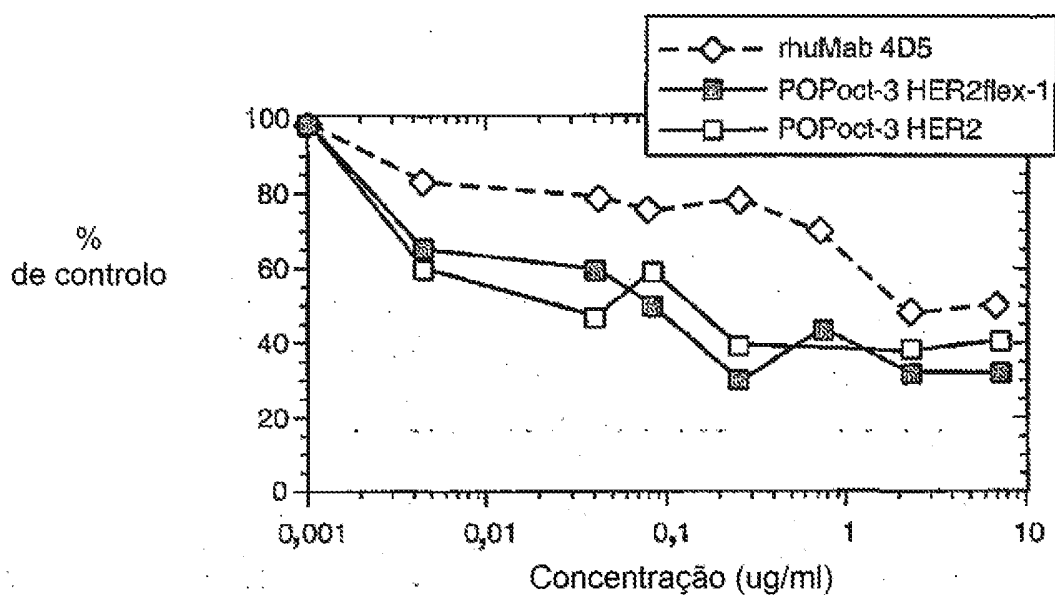
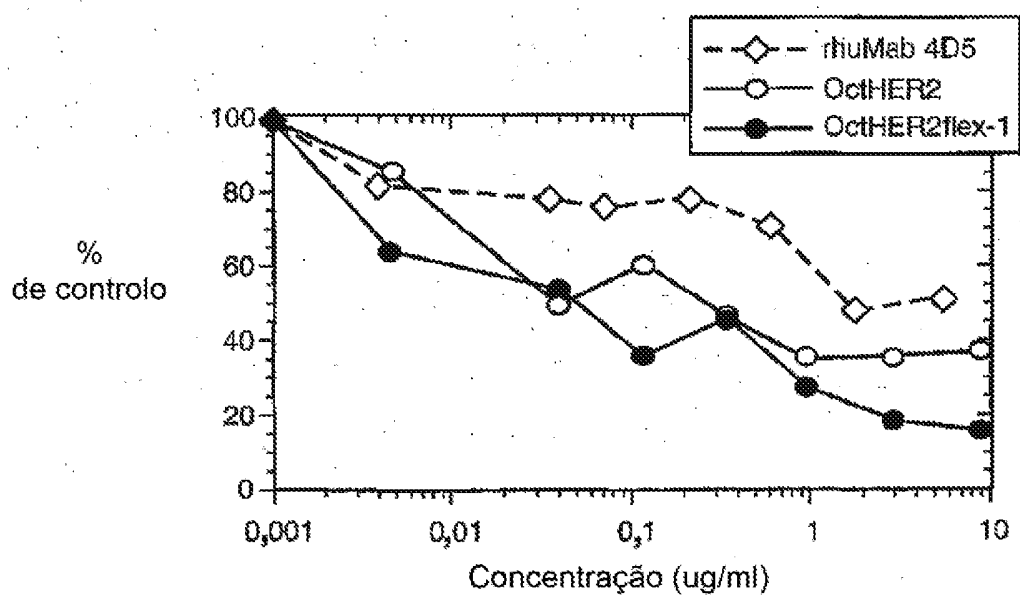


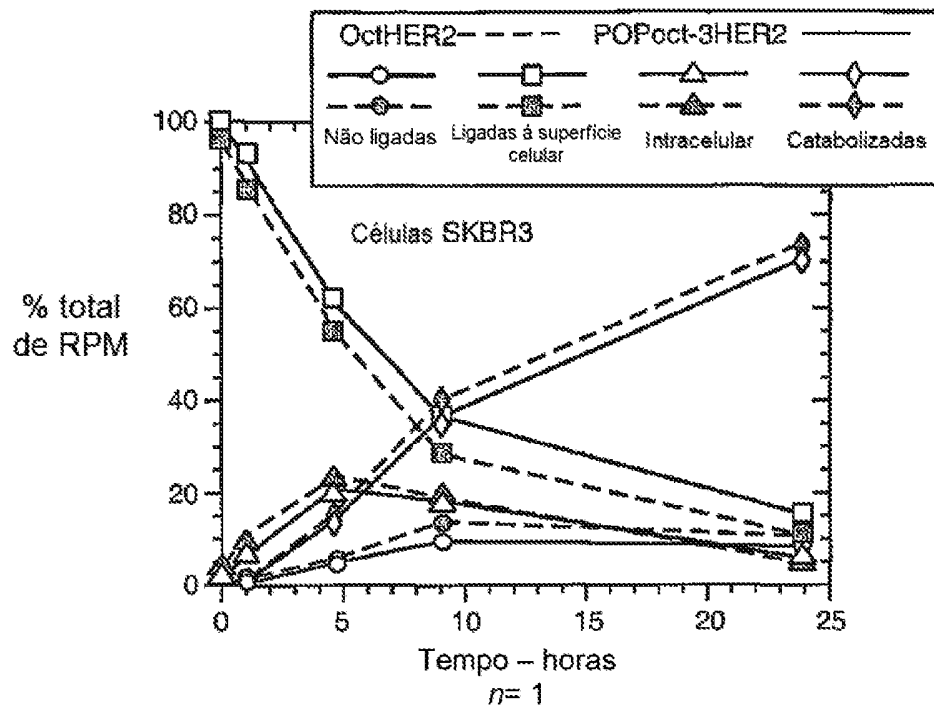
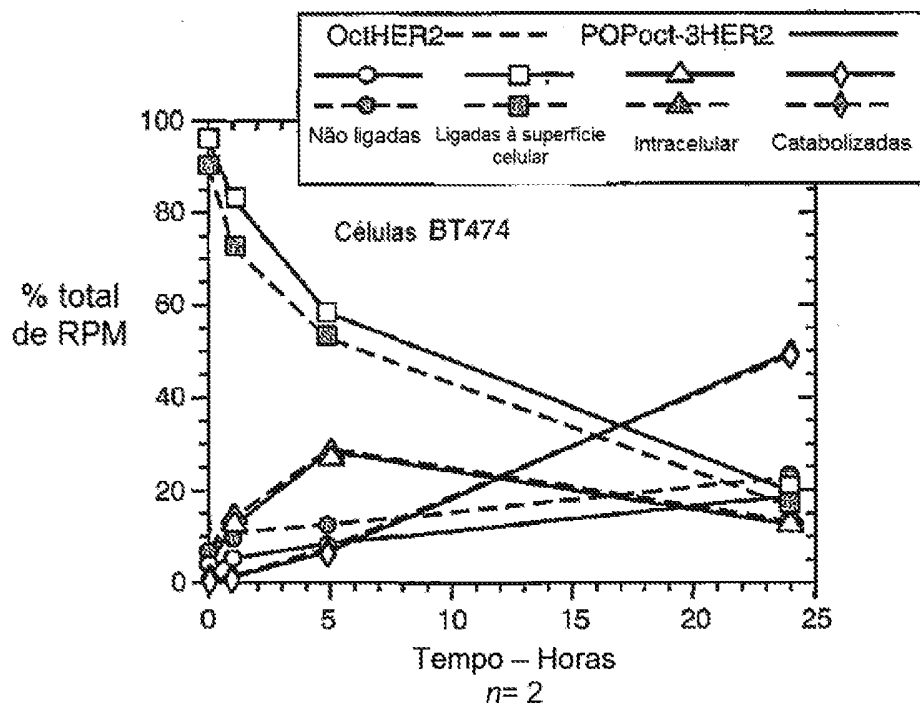
FIG. 26

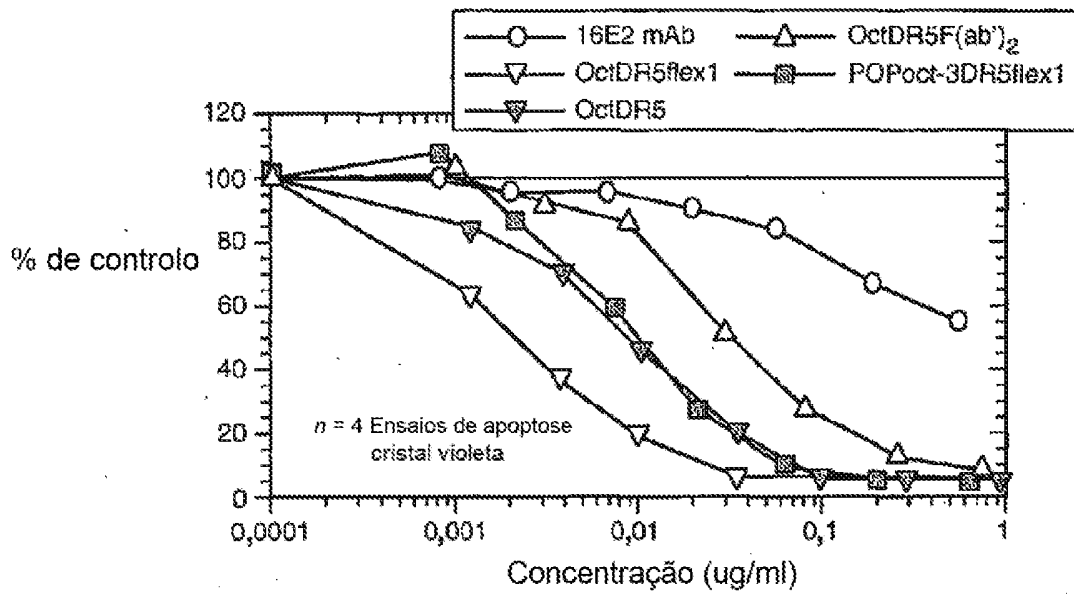
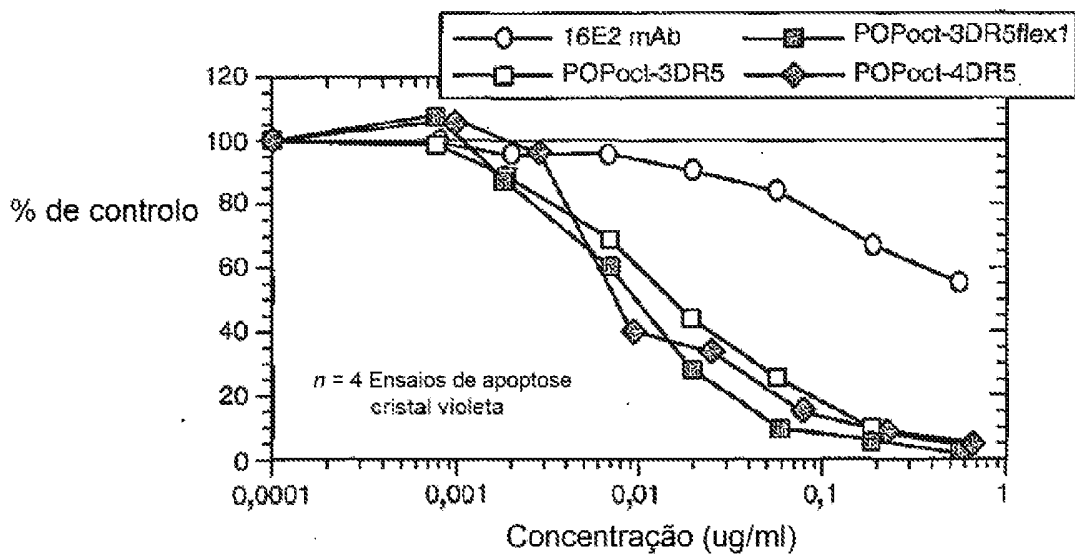


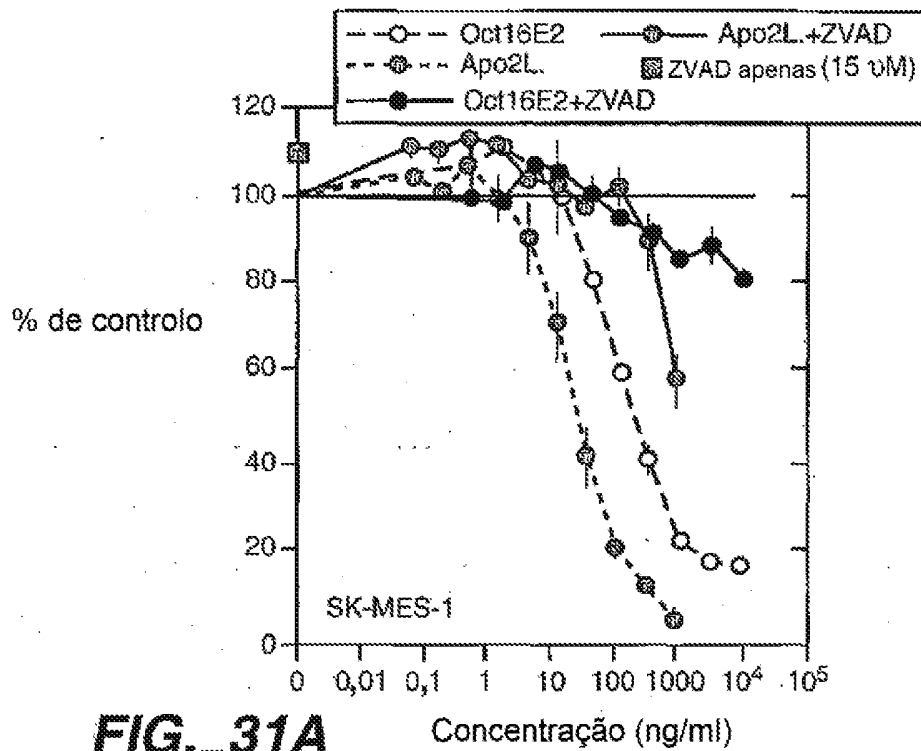
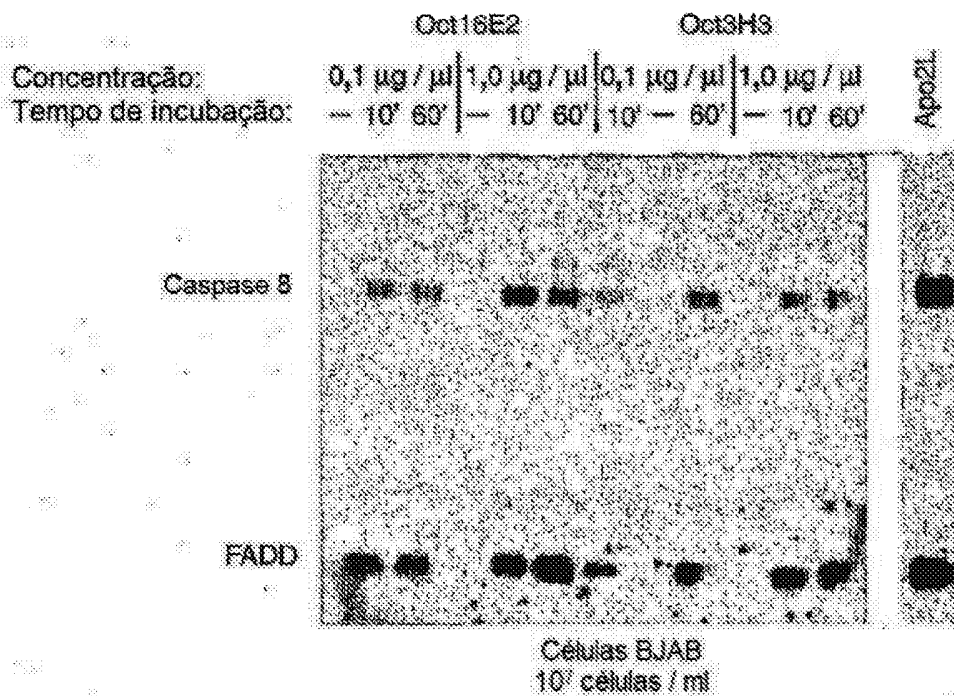
Traçado representativo de $n = 6$ ensaios de citoestase; cristal violeta

FIG. 27

**FIG. 28A****FIG. 28B**

**FIG. 29A****FIG. 29B**

**FIG. 30A****FIG. 30B**

**FIG. 31A****FIG. 31B**

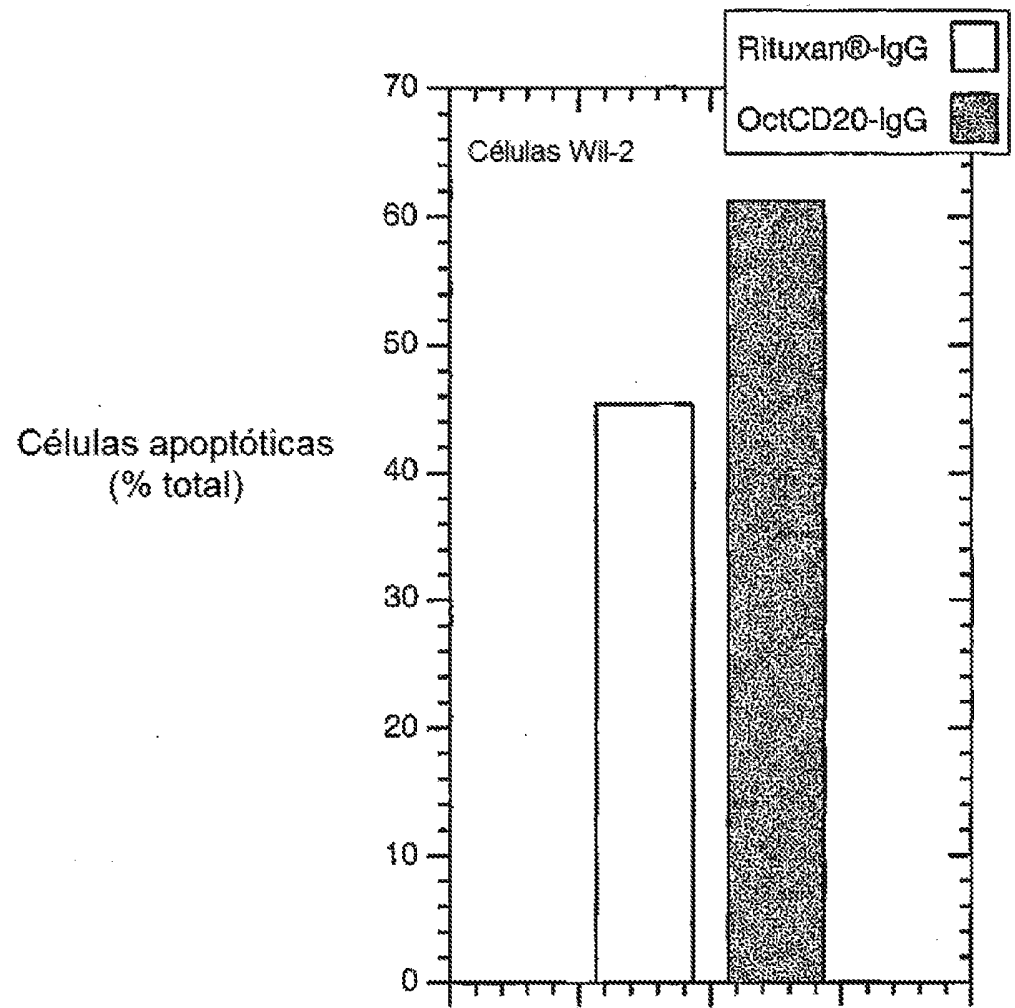
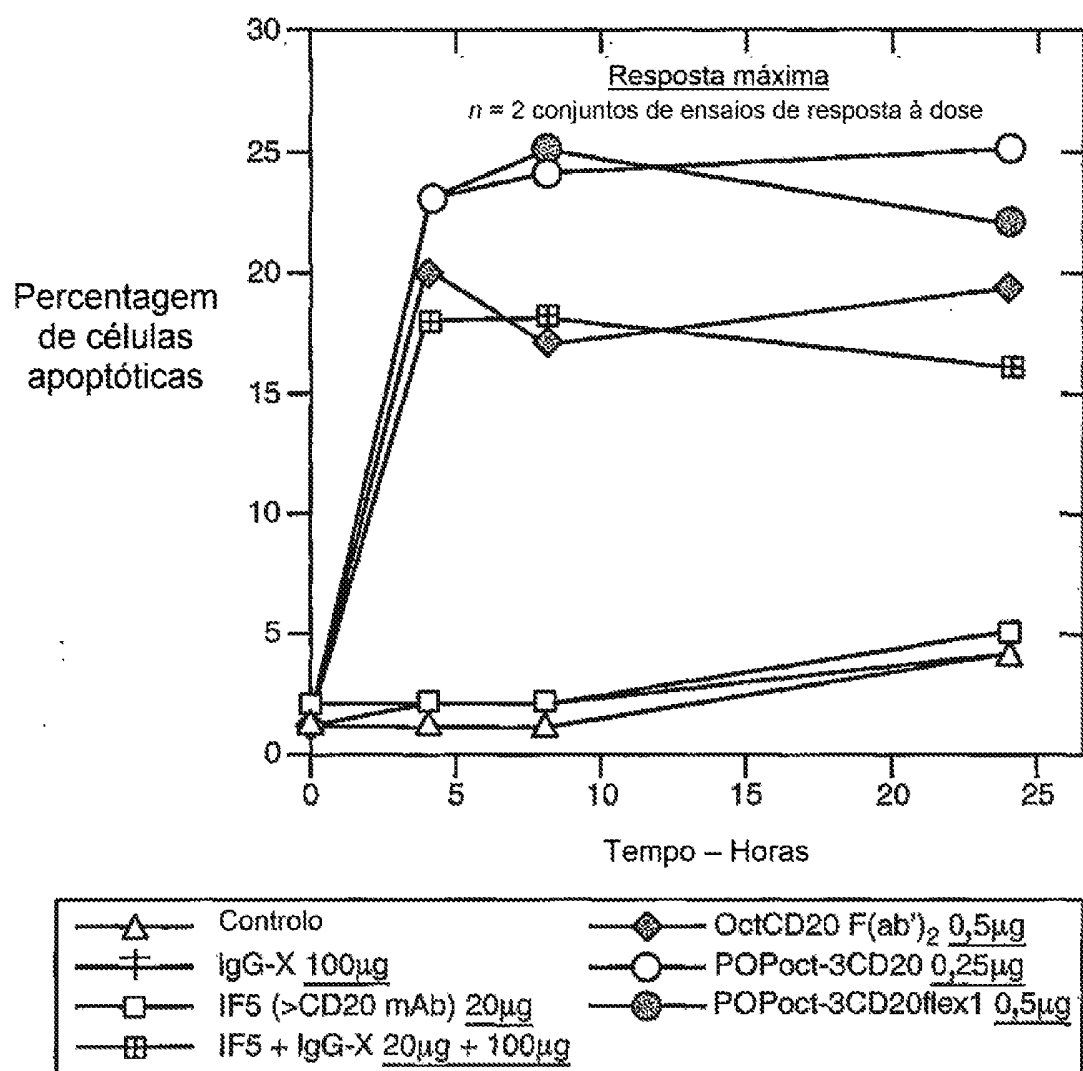


FIG. 32

**FIG. 33**

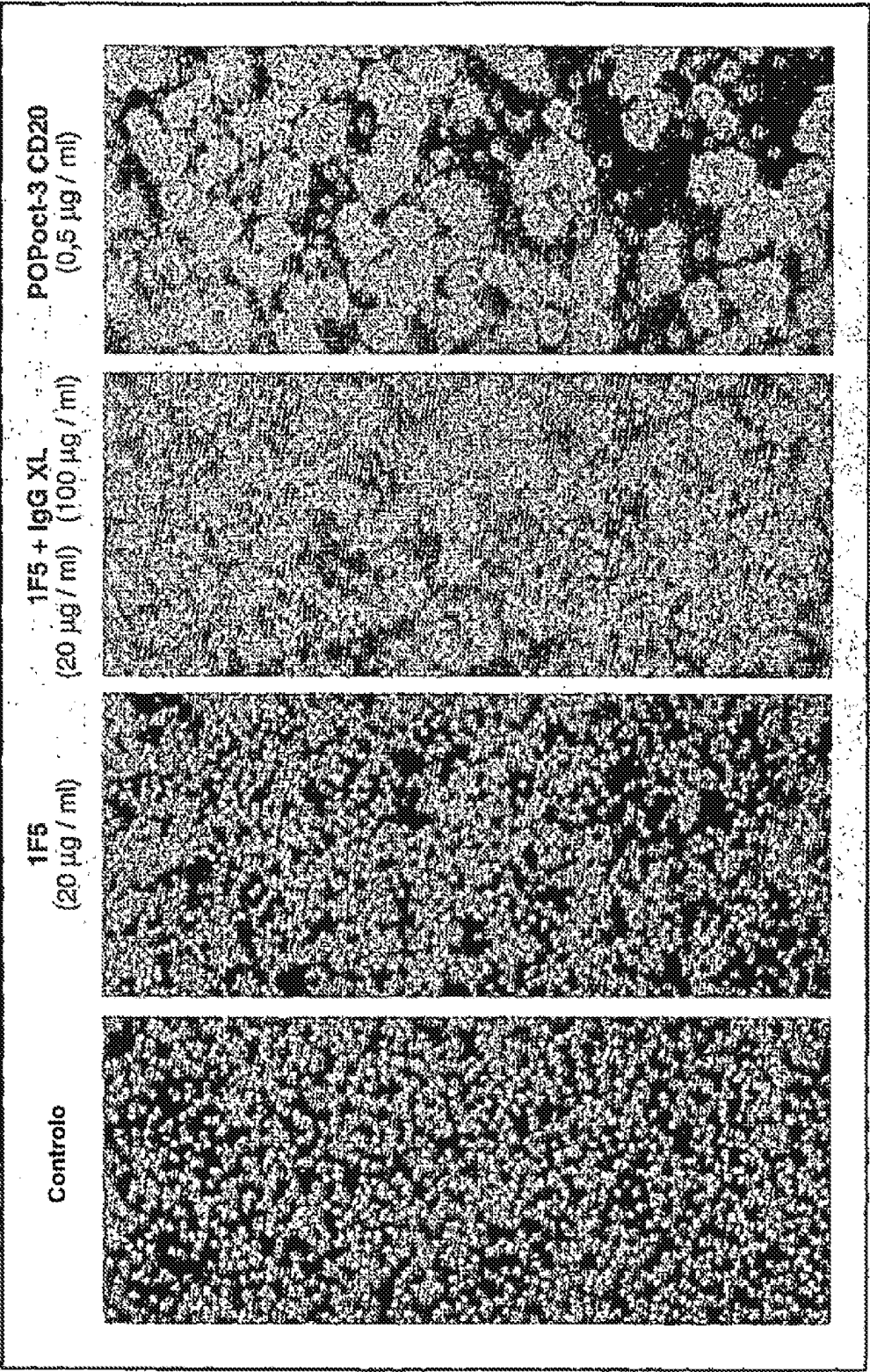
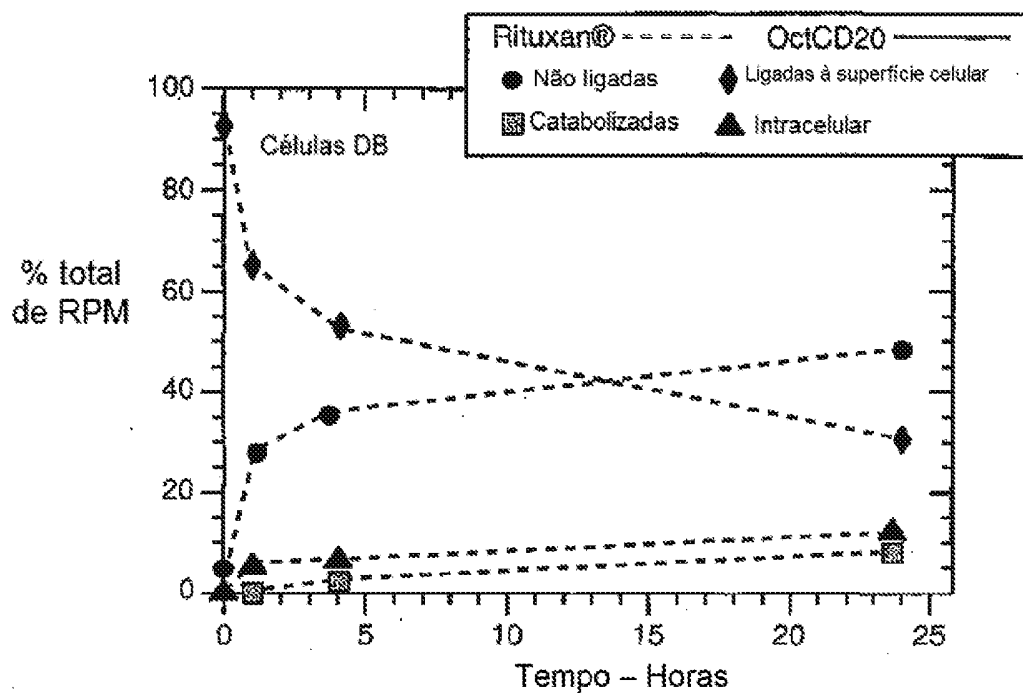
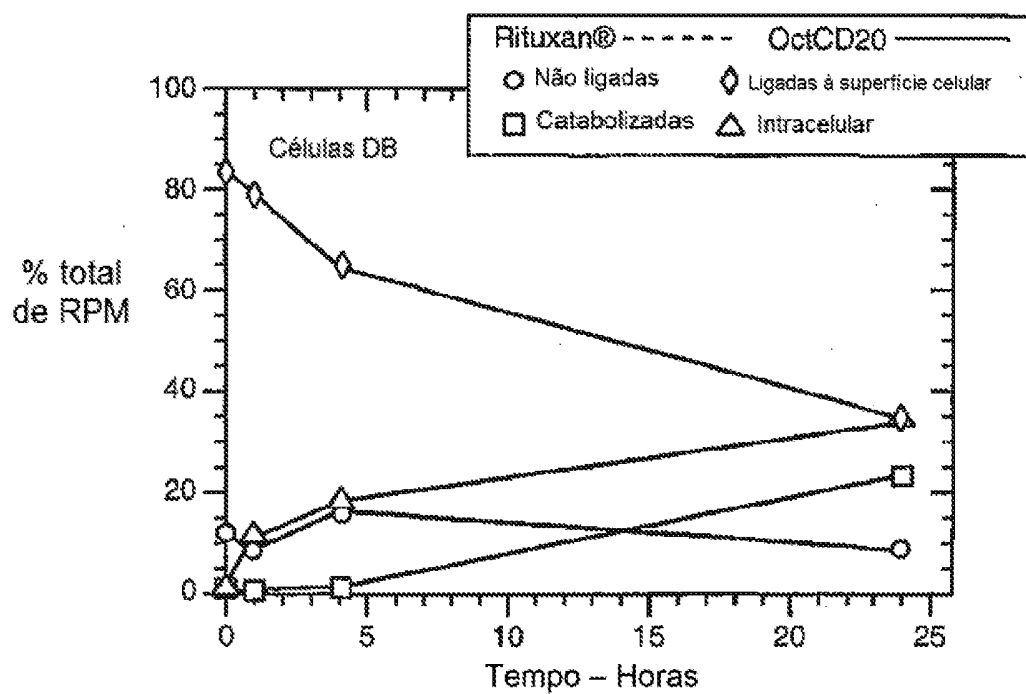
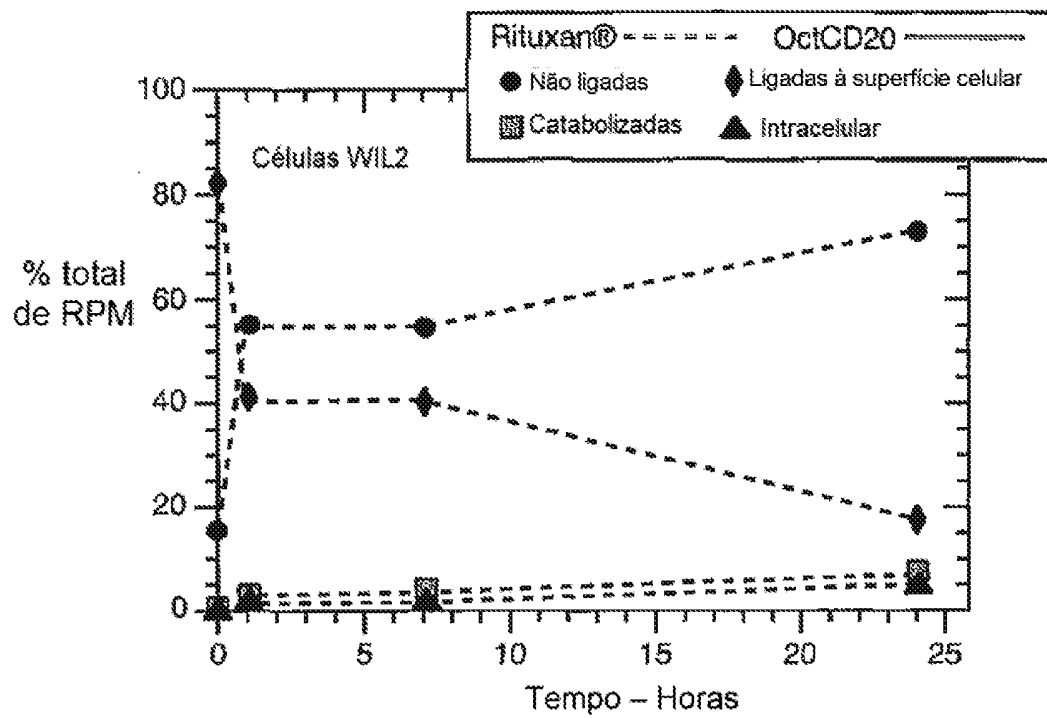
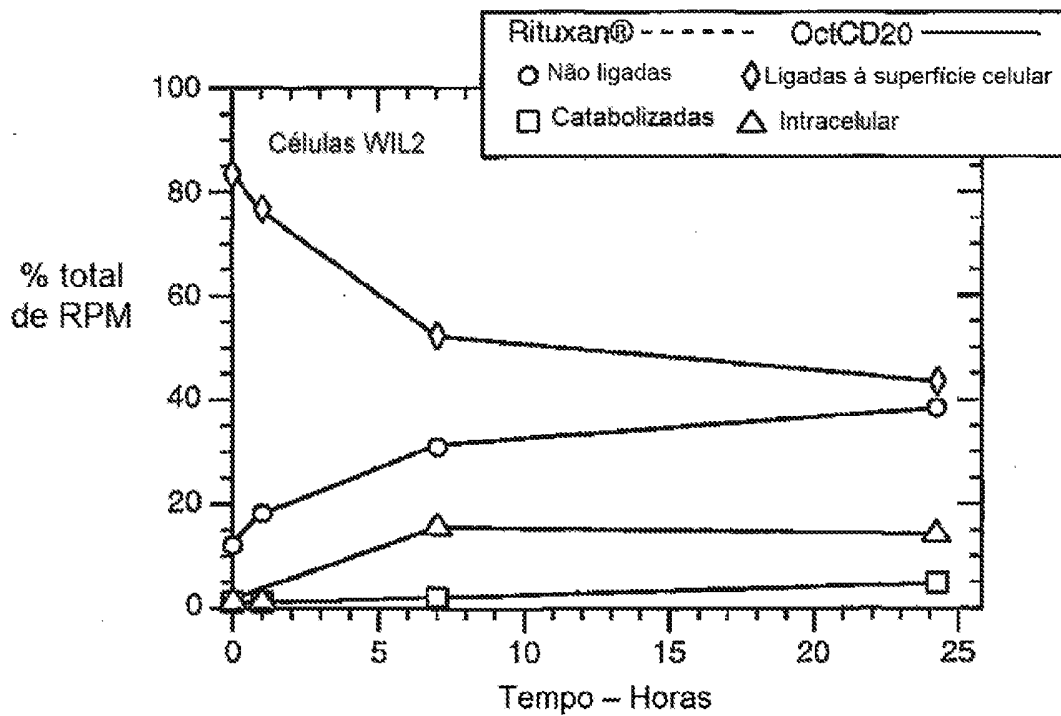
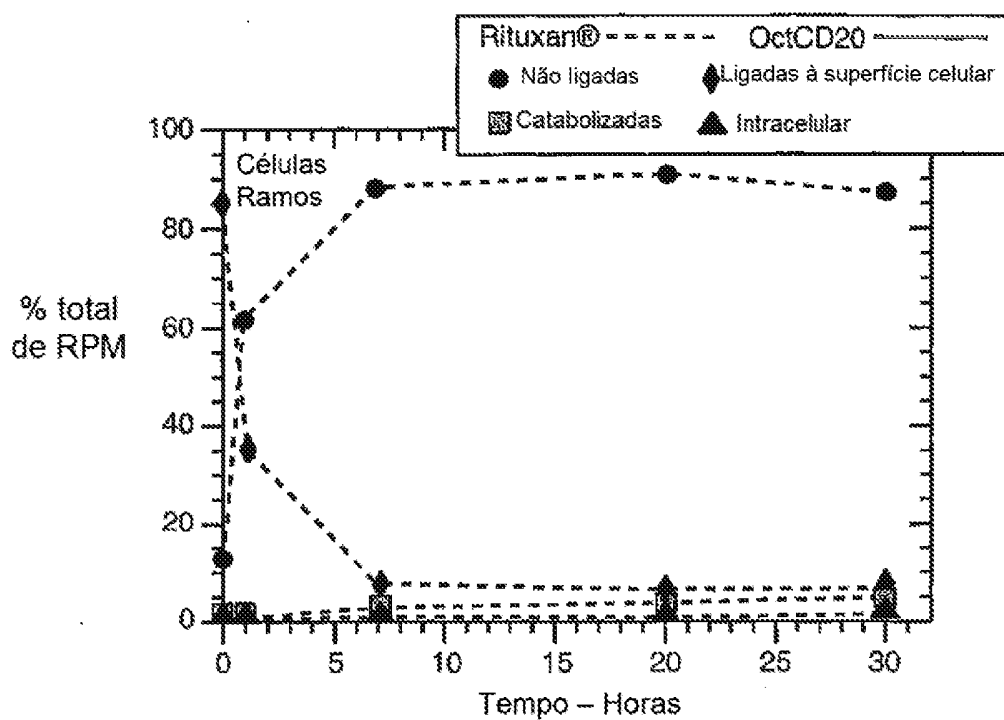
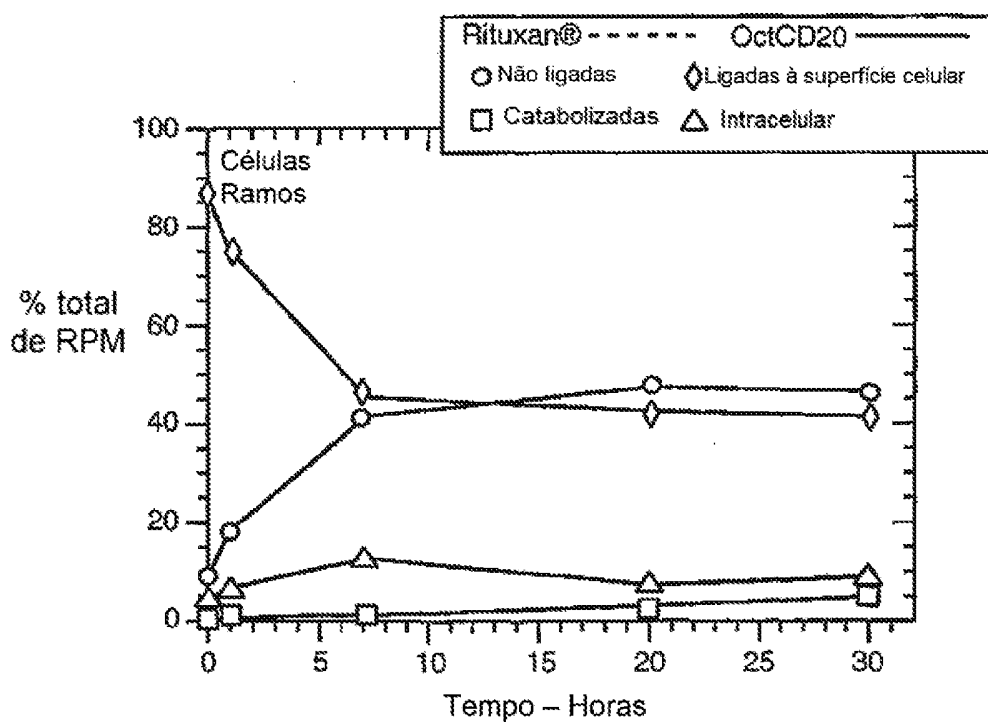


FIG. 34

**FIG. 35A****FIG. 35B**

**FIG. 35C****FIG. 35D**

**FIG. 35E****FIG. 35F**