



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

(11) PI 0821777-7 B1



(22) Data do Depósito: 16/12/2008

(45) Data de Concessão: 12/05/2020

(54) Título: ANTICORPO BIESPECÍFICO BIVALENTE, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DO MESMO E COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: C07K 16/46; C07K 16/22; C07K 16/28; C07K 19/00; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 21/12/2007 EP 07 024865.3.

(73) Titular(es): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.

(72) Inventor(es): CHRISTIAN KLEIN; WOLFGANG SCHAEFER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008010704 de 16/12/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/080253 de 02/07/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/06/2010

(57) Resumo: ANTICORPO BIESPECÍFICO BIVALENTE, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DO MESMO E COMPOSIÇÃO A presente invenção refere-se a novos anticorpos bivalentes bi-específicos com troca de domínio, sua fabricação e utilização.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTICORPO BIESPECÍFICO BIVALENTE, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DO MESMO E COMPOSIÇÃO**".

A presente invenção refere-se a novos anticorpos biespecíficos bivalentes, sua fabricação e utilização.

Antecedentes da Invenção

As proteínas planejadas, tais como os anticorpos bi- ou multiespecíficos capazes de se ligar a dois ou mais antígenos, são conhecidas na técnica. Tais proteínas multiespecíficas podem ser geradas usando a fusão celular, conjugação química ou técnicas de DNA recombinante.

Uma ampla variedade de formatos de anticorpos biespecíficos recombinantes tem sido desenvolvida nos últimos anos, por exemplo, anticorpos biespecíficos tetravalentes mediante a fusão de, por exemplo, um formato de anticorpos IgG e domínios de cadeia única (ver, por exemplo, Coloma, M.J., et al, Nature Biotech 15 (1997) 159-163; WO 2001077342; e Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234).

Também vários outros novos formatos em que a estrutura do núcleo de anticorpos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) não é mais retida tal como os dia, tria ou tetracorpos, minicorpos, vários formatos de cadeia única (scFv, Bis scFv), que são capazes de se ligar a dois ou mais antígenos, têm sido desenvolvidos (Holliger, P., et al, Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., Léger O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J., et al, Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C., et al, Nature Biotech 25 (2007) 1290-1297).

Todos tais formatos utilizam ligantes para fundir o núcleo de anticorpos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) à uma outra proteína de ligação (por exemplo, scFv) ou para fundir, por exemplo, dois fragmentos Fab ou scFv. (Fischer N., Léger O., Pathobiology 74 (2007) 3-14). Embora seja óbvio que os ligantes possuem vantagens para o planejamento de anticorpos biespecíficos, eles também podem causar problemas em contextos terapêuticos. Na verdade, estes peptídeos estrangeiros podem extrair uma resposta imune contra o próprio ligante ou a junção entre a proteína e o ligante. Ainda mais,

a natureza flexível destes peptídeos os torna mais propensos à clivagem proteolítica, potencialmente levando à fraca estabilidade de anticorpos, agregação e imunogenicidade aumentada. Além disso, pode-se desejar reter as funções efectoras, tais como, por exemplo, citotoxicidade dependente do
5 complemento (CDC) ou citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC), que são mediadas através da ligação de receptor Fc, através da manutenção de um grau elevado de similaridade de ocorrência natural.

Assim, de maneira ideal, deve-se visar o desenvolvimento de anticorpos biespecíficos que são muito similares na estrutura geral aos anticorpos naturais (como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), com desvio mínimo das se-
10 quências humanas.

Em uma abordagem os anticorpos biespecíficos que são muito semelhantes aos anticorpos naturais têm sido produzidos utilizando a tecnologia quadroma (ver Milstein, C. and A.C. Cuello, Nature, 305 (1983) 537-
15 40), com base na fusão somática de duas linhagens celulares de hibridoma diferentes que expressam anticorpos monoclonais de murino com as especificidades desejadas do anticorpo biespecífico. Devido ao emparelhamento aleatório de duas cadeias pesada e leve de anticorpo diferentes dentro da linhagem celular de hibridoma híbrido resultante (ou quadroma), até dez es-
20 pécies diferentes de anticorpos são geradas, das quais apenas uma é a desejada, o anticorpo biespecífico funcional. Devido à presença de subprodutos mal emparelhados, e rendimentos de produção significativamente reduzidos, procedimentos de purificação sofisticados do meio são requeridos (ver, por exemplo, Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234). Em
25 geral, o mesmo problema de subprodutos mal emparelhados permanece se as técnicas de expressão recombinantes forem usadas.

Uma abordagem para contornar o problema de subprodutos mal emparelhados, que é conhecida como "saliências-em-orifícios" ("*knobs-into-holes*"), visa usar a força do emparelhamento de duas cadeias pesadas de
30 anticorpos diferentes mediante a introdução das mutações nos domínios CH3 para modificar a interface de contato. Em uma cadeia, os aminoácidos volumosos foram substituídos por aminoácidos com cadeias laterais curtas

para criar um 'orifício'. De modo inverso, os aminoácidos com grandes cadeias laterais, foram introduzidos no outro domínio CH3, para criar uma 'saliência'. Mediante a coexpressão destas duas cadeias pesadas (e duas cadeias leves idênticas, que devem ser apropriadas para ambas as cadeias pesadas), altos rendimentos de formação de heterodímero ('saliência-orifício') versus formação de homodímero ('orifício-orifício' ou 'saliência-saliência') foram observados (Ridgway, J.B., Presta LG, Carter P; e WO 1996027011). A percentagem de heterodímero pode ser ainda aumentada mediante a remodelação da superfície de interação dos dois domínios CH3 utilizando uma abordagem de apresentação fago e a introdução de uma ponte de dissulfeto para estabilizar o heterodímeros (Merchant, A.M., et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., Ridgway, J.B., Wells, J.A., Carter, P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35). Novas abordagens para a tecnologia saliências em orifícios são descritas, por exemplo, na EP 1870459A1. Embora este formato pareça muito atrativo, nenhum dado que descreva a progressão com respeito a clínica está correntemente disponível. Uma restrição importante desta estratégia é que as cadeias leves dos dois anticorpos de origem devem ser idênticas para prevenir o mau emparelhamento e formação de moléculas inativas. Assim, esta técnica não é apropriada para desenvolver facilmente anticorpos recombinantes, bivalente, biespecíficos contra dois antígenos que partem de dois anticorpos contra o primeiro e o segundo antígeno, como as cadeias pesadas destes anticorpos e/ou as cadeias leves idênticas devem ser otimizadas.

Simon T. et al, EMBO Journal, 9 (1990) 1051 - 1056 refere-se aos mutantes do domínio de anticorpos monoespecíficos.

Sumário da Invenção

A invenção refere-se a um anticorpo bivalente biespecífico, que compreende:

- a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno; e
- b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL

e CH1 são substituídos uns pelos outros.

Uma outra modalidade da invenção é um método para a preparação de um anticorpo, bivalente, biespecífico de acordo com a invenção compreendendo as etapas de:

- 5 a) transformar uma célula hospedeira com
- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno

- 10 - vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos uns pelos outros;

b) cultivar a célula hospedeira sob condições que permitam a síntese da referida molécula de anticorpo; e

- 15 c) recuperar dita molécula de anticorpo de dita cultura.

Uma outra modalidade da invenção é uma célula hospedeira que compreende

- 20 - vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno

- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos uns pelos outros.

- 25 Uma outra modalidade da invenção é uma composição, preferivelmente uma composição farmacêutica ou de diagnóstico do anticorpo de acordo com a invenção.

- 30 Uma outra modalidade da invenção é uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo de acordo com a invenção e pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Uma modalidade adicional da invenção é um método para o tratamento de um paciente com necessidade de terapia, caracterizado pela

administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo de acordo com a invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

5 A invenção refere-se a um anticorpo bivalente biespecífico, que compreende:

a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno; e

10 b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos uns pelos outros.

Portanto, dito anticorpo, bivalente biespecífico compreende:

a) uma primeira cadeia leve e uma primeira cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno; e

15 b) uma segunda cadeia leve e uma segunda cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL e CH1 da segunda cadeia leve e da segunda cadeia pesada são substituídos por outro.

Assim, para o referido anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno o que segue se aplica:

20 dentro da cadeia leve

o domínio constante de cadeia leve CL é substituído pelo domínio constante de cadeia pesada CH1 de dito anticorpo;

e dentro da cadeia pesada

25 o domínio constante da cadeia pesada CH1 é substituído pelo domínio constante de cadeia leve CL de dito anticorpo.

O termo "anticorpo" como aqui utilizado refere-se no todo, aos anticorpos monoclonais. Tais anticorpos totais consistem de dois pares de uma "cadeia leve" (LC) e uma "cadeia pesada" (HC) (tais pares de cadeia leve (LC)/cadeia pesada são abreviados aqui como LC/HC). As cadeias le-
30 ves e cadeias pesadas de tais anticorpos são polipeptídeos que consistem de vários domínios. Em um anticorpo total, cada cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada (abreviado aqui como HCVR ou VH) e

uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada compreende os domínios constantes de cadeia pesada CH1, CH2 e CH3 (classes de anticorpos IgA, IgD, e IgG) e, opcionalmente, o domínio constante de cadeia pesada CH4 (classes de anticorpos IgE e IgM). Cada

5 cadeia leve compreende um domínio variável de cadeia leve VL e um domínio constante de cadeia leve CL. A estrutura de um anticorpo inteiro de ocorrência natural, o anticorpo IgG, é mostrada, por exemplo, na Fig.1. Os domínios variáveis VH e VL podem ser ainda subdivididos em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade

10 (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada VH e VL é composto de três CDRs e quatro FRS, dispostas a partir do terminal de amino até o terminal de carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, CDR2, FR3, CDR3, FR4 ((Janeway, C.A., Jr, et al, (2001). Immunobiology., 5th ed., Garland Publishing; and Woof, J., Burton, D., Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99). Os dois pares de cadeia pesada e

15 cadeia leve (HC/LC) são capazes de ligação específica ao mesmo antígeno. Assim dito anticorpo inteiro é um anticorpo bivalente monoespecífico. Tais "anticorpos" incluem, por exemplo, anticorpos de camundongo, anticorpos humanos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e anticorpos geneticamente planejados (anticorpos variantes ou mutantes) contanto que as

20 suas propriedades características sejam mantidas. Especialmente preferidos são os anticorpos humanos ou humanizados, especialmente como anticorpos recombinantes humanos ou humanizados.

Existem cinco tipos de cadeias pesadas de anticorpo de mamífero denotadas por letras gregas: α , δ , ϵ , γ e μ (Janeway, C.A., Jr, et al, (2001). Immunobiology., 5th ed., Garland Publishing). O tipo de cadeia pesada presente define a classe de anticorpos; estas cadeias são observadas nos anticorpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente (Rhoades RA, Pflanzner RG (2002). Human Physiology, 4th ed., Thomson Learning). As cadeias pesadas

30 distintas diferem em tamanho e composição; α e γ contêm aproximadamente 450 aminoácidos, enquanto que μ e ϵ possuem aproximadamente 550 aminoácidos.

Cada cadeia pesada possui duas regiões, a região constante e a região variável. A região constante é idêntica em todos os anticorpos do mesmo isótipo, mas difere nos anticorpos de diferentes isótipos. As cadeias pesadas γ , α e δ possuem uma região constante composto de três domínios constantes CH1, CH2 e CH3 (em uma linhagem), e uma região de dobradiça para maior flexibilidade (Woof, J., Burton, D., Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99); as cadeias pesadas μ e ϵ possuem uma região constante composta de quatro domínios constantes CH1, CH2, CH3 e CH4 (Janeway, C.A., Jr. et al. (2001). Immunobiology., 5th ed., Garland Publishing). A região variável da cadeia pesada difere em anticorpos produzidos por diferentes células B, mas é a mesma para todos os anticorpos produzidos por uma única célula B ou clone de célula B. A região variável de cada cadeia pesada é de aproximadamente 110 aminoácidos de comprimento e é composta por um domínio de anticorpo único.

Nos mamíferos existem apenas dois tipos de cadeia leve, que são chamados lambda (λ) e kappa (κ). Uma cadeia leve possui dois domínios sucessivos: um domínio constante CL e um domínio variável VL. O comprimento aproximado de uma cadeia leve é de 211 a 217 aminoácidos. Preferivelmente a cadeia leve é uma cadeia leve kappa (κ), e o domínio constante CL é preferivelmente C kappa (κ).

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal" como aqui usado referem-se a uma preparação de moléculas de anticorpos de uma composição de aminoácido único.

Os "anticorpos" de acordo com a invenção podem ser de qualquer classe (por exemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, preferivelmente IgG ou IgE), ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 IgA2 e, preferivelmente IgG1), por meio dos quais ambos anticorpos, dos quais o anticorpo biespecífico bivalente de acordo com a invenção é derivado, possuem uma parte Fc da mesma subclasse (por exemplo, IgG1, IgG4 e outros mais, preferivelmente IgG1), de preferência do mesmo alótipo (por exemplo, caucasianos).

Uma "parte Fc de um anticorpo" é uma expressão bem conheci-

da dos artifícios versados e definida com base na clivagem de papaína de anticorpos. Os anticorpos de acordo com a invenção contêm como parte Fc, preferivelmente uma parte Fc derivada de origem humana e preferivelmente todas as outras partes das regiões constantes humanas. A parte Fc de um

5 anticorpo está diretamente envolvida na ativação do complemento, ligação de C1q, ativação de C3 e ligação ao receptor Fc. Embora a influência de um anticorpo sobre o sistema complementar seja dependente de certas condições, a ligação ao C1q é causada por sítios de ligação definidos na parte Fc. Tais sítios de ligação são conhecidos no estado da técnica e descritos, por

10 exemplo, por Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., and Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Im-

15 munology 86 (1995) 319-324; and EP 0 307 434. Tais sítios de ligação são, por exemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 e P329 (numeração de acordo com o índice UE de Kabat, ver abaixo). Os anticorpos das subclasse IgG1, IgG2 e IgG3 geralmente apresentam ativação comple-

20 mentar, ligação de C1q e ativação de C3, enquanto IgG4 não ativam o sistema complementar, não se ligam a C1q e não ativam C3. Preferivelmente a parte Fc é uma parte Fc humana.

O termo "anticorpo quimérico" refere-se a um anticorpo que compreende uma região variável, isto é, região de ligação, de uma fonte ou espécie e pelo menos uma parte de uma região constante derivada de uma

25 fonte ou espécie diferente, geralmente preparada por técnicas recombinantes de DNA. Os anticorpos quiméricos compreendendo uma região variável de murino e uma região constante humana são preferíveis. Outras formas preferidas de "anticorpos quiméricos" incluídas pela presente invenção são aqueles em que a região constante foi modificada ou alterada daquela do

30 anticorpo original para gerar as propriedades de acordo com a invenção, especialmente no que diz respeito à ligação de C1q e/ou ligação ao receptor de Fc (FCR). Tais anticorpos quiméricos também são referidos como "anti-

corpos de classe comutada". Os anticorpos quiméricos são o produto de genes de imunoglobulina expressos compreendendo segmentos de DNA que codificam as regiões variáveis de imunoglobulina e segmentos de DNA que codificam as regiões constantes de imunoglobulina. Métodos para a produção de anticorpos quiméricos envolvem as técnicas convencionais de DNA e gene recombinantes que são bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5.202.238 e US 5.204.244.

O termo "anticorpo humanizado" refere-se aos anticorpos em que a estrutura ou "regiões determinantes de complementaridade" (CDR) foram alteradas para compreender a CDR de uma imunoglobulina de especificidade diferente em comparação com aquela da imunoglobulina de origem. Em uma modalidade preferida, uma CDR de murino é enxertada na região estrutural de um anticorpo humano para preparar o "anticorpo humanizado". Ver, por exemplo, Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; and Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. As CDRs particularmente preferidas correspondem àquelas que representam as sequências que reconhecem os antígenos mencionados acima para anticorpos quiméricos. Outras formas de "anticorpos humanizados" incluídas pela presente invenção são aquelas em que a região constante foi adicionalmente modificada ou alterada daquela do anticorpo original para gerar as propriedades de acordo com a invenção, especialmente no que diz respeito à ligação de C1q e/ou ligação ao receptor de Fc (FcR).

O termo "anticorpo humano", como aqui utilizado, se destina a incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas das sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos são bem conhecidos no estado da técnica (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Os anticorpos humanos também podem ser produzidos em animais transgênicos (por exemplo, camundongos), que são capazes, após a imunização, de produzir um repertório completo ou uma seleção de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. A transferência da série de gene

de imunoglobulina da linha germinativa humana em tais camundongos mutante da linha germinativa resultará na produção de anticorpos humanos após a prova de antígeno (ver, por exemplo, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Os anticorpos humanos também podem ser produzidos em bibliotecas de apresentação fago (Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). As técnicas de Cole et al. e Boerner et al. também são disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); and Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Como já mencionado com relação aos anticorpos quiméricos e humanizados de acordo com a invenção, o termo "anticorpo humano" conforme aqui usado também compreende tais anticorpos que são modificados na região constante para gerar as propriedades de acordo com a invenção, especialmente em relação à ligação de C1q e/ou ligação de FcR, por exemplo, mediante a "comutação de classe", isto é, mudança ou mutação das partes Fc (por exemplo, da mutação de IgG1 a IgG4 e/ou IgG1/IgG4).

O termo "anticorpo humano recombinante", como aqui utilizado, se destina a incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meio de recombinação, tais como os anticorpos isolados a partir de uma célula hospedeira tal como célula NS0 ou CHO ou de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico para os genes de imunoglobulina humana ou anticorpos expressos usando um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira. Tais anticorpos humanos recombinantes possuem regiões variáveis e constantes em uma forma reorganizada. Os anticorpos humanos recombinantes de acordo com a invenção foram submetidos à hipermutação somática in vivo. Assim, as sequências de aminoácido das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas e relacionadas com as sequências VH e VL da linha germinativa humana, não podem

naturalmente existir dentro do repertório da linha germinativa humano in vivo.

O "domínio variável" (domínio variável de uma cadeia leve (VL), região variável da uma cadeia pesada (VH)) como utilizado neste documento
5 significa cada um dos pares de cadeias leves e pesadas que está envolvido diretamente na ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios de cadeias leves e pesadas humanas variáveis possuem a mesma estrutura geral e cada domínio compreende quatro regiões estruturais (FR) cujas sequências são amplamente conservadas, conectadas por três "regiões hipervariáveis"
10 (ou regiões determinantes da complementaridade, CDRs). As regiões estruturais adotam uma conformação folha β e as CDRs podem formar circuitos que se conectam a estrutura de folha β . As CDRs em cada cadeia são mantidas em sua estrutura tridimensional pelas regiões estruturais e formam juntamente com as CDRs da outra cadeia o sítio de ligação ao antígeno. As
15 regiões CDR3 de cadeia pesada e leve do anticorpo desempenham um papel particularmente importante na especificidade/afinidade de ligação dos anticorpos de acordo com a invenção e, portanto, fornecem um outro objeto da invenção.

Os termos "região hipervariável" ou "parte de ligação ao antígeno de um anticorpo" quando aqui utilizados referem-se aos resíduos de aminoácido de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácido das "regiões determinantes da complementaridade" ou "CDRs". As regiões "estruturais" ou "FR" são aquelas regiões de domínio variáveis diferentes dos resíduos da
25 região hipervariável como aqui definido. Portanto, as cadeias leves e pesadas de um anticorpo compreendem do terminal N a C dos domínios, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. As CDRs em cada cadeia pesada são separadas por tais aminoácidos estruturais. Especialmente, a CDR3 da cadeia pesada é a região que mais contribui para a ligação ao antígeno. As
30 regiões CDR e FR são determinadas de acordo com a definição padrão de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Os "domínios constantes" da cadeia pesada e da cadeia leve não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas apresentam várias funções efetoras. Dependendo da sequência de aminoácido da região constante de suas cadeias pesadas, os anticorpos ou

5 imunoglobulinas são divididos nas classes:

O termo "anticorpo bivalente biespecífico" como aqui utilizado refere-se a um anticorpo como descrito acima, em que cada um dos dois pares de cadeia pesada e cadeia leve (HC/LC) é especificamente ligado a um antígeno diferente, isto é, a primeira cadeia pesada e a primeira cadeia leve

10 (provenientes de um anticorpo contra um primeiro antígeno) são especificamente ligados entre si a um primeiro antígeno, e a segunda cadeia pesada e a segunda cadeia leve (provenientes de um anticorpo contra um segundo antígeno) são especificamente ligados entre si a um segundo antígeno (como apresentado na Figura 2); tais como os anticorpos bivalentes biespecíficos

15 são capazes especificamente se ligar a dois antígenos diferentes ao mesmo tempo, e não mais do que dois antígenos, ao contrário, por um lado, em um anticorpo monoespecífico capaz de se ligar apenas a um antígeno, e por outro lado, por exemplo, um anticorpo tetravalente tetraespecífico que pode se ligar a quatro moléculas de antígeno ao mesmo tempo.

De acordo com a invenção, a relação de um anticorpo bivalente biespecífico desejado em relação aos produtos secundários indesejáveis pode ser melhorada através da substituição de certos domínios, em apenas um par de cadeia pesada e cadeia leve (HC/LC). Embora o primeiro dos dois pares de HC/LC se origina de um anticorpo que se liga especificamente a

20 um primeiro antígeno e é deixado essencialmente inalterado, o segundo dos dois pares de HC/LC se origina de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, e é alterado pela seguinte substituição:

25

- cadeia leve: substituição do domínio constante de cadeia leve CL pelo domínio constante da cadeia pesada CH1 do referido anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, e

30

- cadeia pesada: substituição do domínio constante de cadeia pesada CH1 pelo domínio constante de cadeia leve CL de dito anticorpo que

se liga especificamente a um segundo antígeno.

Assim, os anticorpos bivalentes biespecíficos resultantes são anticorpos artificiais que compreendem:

5 a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno; e

b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno;

em que dita cadeia leve (de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno) contém um domínio constante CH1 ao invés de CL

em que dita cadeia pesada (de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno) contém um domínio constante CL em vez de CH1.

15 Em um aspecto adicional da invenção tal relação melhorada de um anticorpo bivalente biespecífico desejado comparada com os produtos secundários indesejados pode ser ainda melhorada por uma das seguintes duas alternativas:

A) Primeira alternativa (ver a Figura 3):

20 Os domínios de CH3 de dito anticorpo bivalente biespecífico de acordo com a invenção podem ser alterados pela tecnologia de "saliências em orifícios" que descreve com detalhes em vários exemplos, por exemplo, na WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al, Protein Eng 9 (1996) 617-621; and Merchant, A.M., et al, Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681. Neste método, as superfícies de interação dos dois domínios CH3 são alteradas para aumentar a heterodimerização de ambas as cadeias pesadas contendo estes dois domínios CH3. Cada um dos dois domínios CH3 (das duas cadeias pesadas) pode ser a "saliência", enquanto o outro é o "orifício". A introdução de uma ponte de dissulfeto estabiliza os heterodímeros (Merchant, A.M., et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., Ridgway, J.B., Wells, J.A., Carter, P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35) e aumenta o rendimento.

Portanto, na modalidade preferida, os domínios CH3 de um anticorpo bivalente biespecífico em que o primeiro domínio de CH3 e o segundo

domínio de CH3 cada um vai ao encontro de uma interface que compreende uma interface original entre os domínios de CH3 de anticorpo que são alterados pela tecnologia de "saliências-em-orifícios" incluindo ainda a estabilização mediante a introdução de uma ponte de dissulfeto nos domínios de

5 CH3 (descrito na WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al, Protein Eng 9 (1996) 617-621; Merchant. A.M, et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; e Atwell, S., Ridgway, J.B., Wells, J.A., Carter P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35) para promover a formação do anticorpo bivalente biespecífico.

Assim, em um aspecto da invenção, dito anticorpo bivalente biespecífico é caracterizado pelo fato de que

10

o domínio de CH3 de uma cadeia pesada e o domínio de CH3 da outra cadeia pesada cada um encontram-se em uma interface que compreende uma interface original entre os domínios de CH3 do anticorpo;

em que dita interface é alterada para promover a formação do anticorpo bivalente biespecífico, em que a alteração é caracterizada pelo

15 fato de que:

a) o domínio de CH3 de uma cadeia pesada é alterado, de modo que dentro da interface original o domínio de CH3 de uma cadeia pesada se encontra com a interface original do domínio de CH3 da outra cadeia pesada dentro do anticorpo bivalente biespecífico,

20

um resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo um maior volume de cadeia lateral, gerando assim uma protuberância dentro da interface do domínio de CH3 de uma cadeia pesada que é posicionável em uma cavidade dentro da interface do domínio de CH3 da outra cadeia pesada

25

e

b) o domínio de CH3 da outra cadeia pesada é alterado, de modo que dentro da interface original do segundo domínio de CH3 que se encontra com a interface original do primeiro domínio de CH3 dentro do anticorpo bivalente biespecífico,

30

um resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo um menor volume de cadeia lateral, gerando assim uma

cavidade dentro da interface do segundo domínio de CH3 dentro da qual uma protuberância dentro da interface do primeiro domínio de CH3 é posicionável.

- Preferivelmente dito resíduo de aminoácido tendo um maior volume de cadeia lateral é selecionado do grupo consistindo em arginina (R),
5 fenilalanina (F), tirosina (Y), triptofano (W).

Preferivelmente dito resíduo de aminoácido tendo um maior volume de cadeia lateral é selecionado do grupo consistindo em alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

- 10 Em um aspecto da invenção ambos os domínios de CH3 são ainda alterados na introdução de cisteína (C) como aminoácido nas posições correspondentes de cada domínio de CH3, tal como aquele de uma ponte de dissulfeto entre ambos os domínios de CH3, podem ser formados.

- Em outra modalidade preferida da invenção ambos os domínios de CH3 são alterados pelo uso de resíduos R409D; K370E (K409D) para os
15 resíduos de *saliências* e D399K; E357K para os resíduos de *orifício* descritos, por exemplo, na EP 1870459A1.

ou

B) Segunda alternativa (ver a Figura 4):

- 20 pela substituição de um domínio constante de cadeia pesada CH3 por um domínio constante de cadeia pesada CH1; e o outro domínio constante de cadeia pesada CH3 é substituído por um domínio constante de cadeia leve CL. O domínio constante da cadeia pesada CH1 pelo qual o domínio de cadeia pesada CH3 é substituído pode ser de qualquer classe de
25 Ig (por exemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). O domínio constante da cadeia leve CL, através do qual o domínio de cadeia pesada CH3 é substituído, pode ser do tipo lambda (λ) ou kappa (κ), preferivelmente do tipo kappa (κ).

- Assim, uma modalidade preferida da invenção é um anticorpo
30 bivalente biespecífico, compreendendo:

a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno; e

b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos uns pelos outros,

e em que opcionalmente

5 c) o domínio de CH3 de uma cadeia pesada e o domínio de CH3 da outra cadeia pesados cada um se encontra em uma interface que compreende uma interface original entre os domínios de CH3 do anticorpo;

em que dita interface é alterada para promover a formação do anticorpo bivalente biespecífico, em que a alteração é caracterizada pelo
10 fato de que:

ca) o domínio de CH3 de uma cadeia pesada é alterado,

de modo que dentro da interface original o domínio de CH3 de uma cadeia pesada se encontra com a interface original do domínio de CH3 da outra cadeia pesada dentro do anticorpo bivalente biespecífico,

15 um resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo um maior volume de cadeia lateral, gerando assim uma protuberância dentro da interface do domínio de CH3 de uma cadeia pesada que é posicionável em uma cavidade dentro da interface do domínio de CH3 da outra cadeia pesada

20 e

cb) o domínio de CH3 da outra cadeia pesada é alterado,

de modo que dentro da interface original do segundo domínio de CH3 que se encontra com a interface original do primeiro domínio de CH3 dentro do anticorpo bivalente biespecífico

25 um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido tendo um menor volume de cadeia lateral, gerando assim uma cavidade dentro da interface do segundo domínio de CH3 dentro da qual uma protuberância dentro da interface do primeiro domínio de CH3 é posicionável;

30 ou

d) um domínio constante de cadeia pesada CH3 é substituído por um domínio constante de cadeia pesada CH1 e o outro domínio constan-

te de cadeia pesada CH3 é substituído por um domínio constante da cadeia leve CL.

Os termos "antígeno" ou "molécula do antígeno", como usados neste documento são utilizados de modo trocável e referem-se a todas as moléculas que podem ser especificamente ligadas por um anticorpo. O anticorpo bivalente biespecífico é especificamente ligado a um primeiro antígeno e um segundo antígeno distinto. O termo "antígeno" como aqui usado inclui, por exemplo, proteínas, epítomos diferentes nas proteínas (como antígenos diferentes dentro do significado da invenção), e polissacarídeos. Isto inclui principalmente as partes (coberturas, cápsulas, paredes celulares, flagelos, fimbriae e toxinas) de bactérias, vírus e outros microorganismos. Os lipídeos e ácidos nucleicos são antigênicos apenas quando combinados com proteínas e polissacarídeos. Os antígenos exógenos não microbianos (não uniformes) podem incluir pólen, clara de ovo, e as proteínas dos tecidos e órgãos transplantados ou na superfície das células do sangue em transfusão. Preferivelmente, o antígeno é selecionado do grupo consistindo em citocinas, proteínas da superfície celular, enzimas e citocinas receptoras, proteínas da superfície celular, enzimas e receptores.

Os antígenos de tumor são aqueles antígenos que são apresentados por moléculas de MHC I ou MHC II na superfície das células tumorais. Estes antígenos podem às vezes ser apresentados pelas células tumorais e nunca pelas normais. Neste caso, eles são chamados de antígenos específico do tumor (TSAs) e tipicamente resultam de uma mutação específica do tumor. Mais comuns são os antígenos que são apresentados pelas células tumorais e células normais, e eles são chamados de antígenos associados com o tumor (TAAs). Os linfócitos T citotóxicos que reconhecem estes antígenos podem ser capazes de destruir as células tumorais antes que elas se proliferem ou se espalhem por metástase. Os antígenos tumorais também podem estar na superfície do tumor na forma de, por exemplo, um receptor submetido a mutação, em cujo caso eles serão reconhecidos pelas células B.

Em uma modalidade preferida, pelo menos um dos dois antíge-

nos diferentes (primeiro e segundo antígenos), em que o anticorpo bivalente biespecífico se liga especificamente a ele, é um antígeno tumoral.

Em outra modalidade preferida ambos dos dois antígenos diferentes (primeiro e segundo antígenos), em que o anticorpo bivalente biespecífico se liga especificamente a eles, são antígenos tumorais; neste caso o primeiro e segundo antígenos também podem ser de dois epítomos diferentes em uma mesma proteína específica do tumor.

Em uma outra modalidade preferida um dos dois antígenos diferentes (primeiro e segundo antígenos), em que o anticorpo bivalente biespecífico se liga especificamente a ele, é um antígeno tumoral e o outro é um antígeno de células efectoras, como, por exemplo, um receptor da Célula T, CD3, CD16 e outros mais.

Em uma outra modalidade preferida um dos dois antígenos diferentes (primeiro e segundo antígenos), em que o anticorpo bivalente biespecífico se liga especificamente a ele, é um antígeno tumoral e o outro é uma substância anti-câncer tal como uma toxina ou um inibidor da cinase.

Como aqui usado, "ligação específica" ou "se liga especificamente a" refere-se a um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno. Preferivelmente a afinidade de ligação do anticorpo que se liga especificamente a este antígeno é de valor KD de 10^{-9} mol/l ou mais baixo (por exemplo, 1^{-10} mol/l), preferivelmente com um valor de KD de 10^{-10} mol/l ou mais baixo (por exemplo, 10^{-12} mol/l). A afinidade de ligação é determinada com um ensaio de ligação padrão, tal como a técnica de ressonância de plásmon superficial (Biacore®).

O termo "epítopo" inclui qualquer polipeptídeo determinante capaz de ligação específica a um anticorpo. Em certas formas de realização, o epítopo determinante inclui agrupamentos de superfície quimicamente ativa de moléculas tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, fosforila ou sulfonila e, em certas formas de realização, podem ter características estruturais tridimensionais específicas, e/ou características de carga específicas. Um epítopo é uma região de um antígeno que é ligado por um anticorpo. Em certas formas de realização, um anticorpo é dito de se ligar especificamente

um antígeno quando preferencialmente se reconhece o seu antígeno alvo em uma mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas.

Uma outra modalidade da invenção é um método para a preparação de um anticorpo bivalente biespecífico de acordo com a invenção

5 compreendendo

a) transformar uma célula hospedeira com

- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno

10 - vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos uns pelos outros;

b) cultivar a célula hospedeira sob condições que permitem a
15 síntese de dita molécula de anticorpo; e

c) recuperar dita molécula de anticorpo de dito cultivo.

Em geral existem dois vetores que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de dito anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno, e ainda dois vetores que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de dito anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno.
20 Um dos dois vetores é o que codifica a respectiva cadeia leve e o outro dos dois vetores é o que codifica a respectiva cadeia pesada. No entanto, em um método alternativo para a preparação de um anticorpo bivalente biespecífico de acordo com a invenção, apenas um primeiro vetor que codifica a cadeia
25 leve e a cadeia pesada do anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno e apenas um segundo vetor que codifica a cadeia leve e a pesada cadeia do anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno pode ser usado para transformar a célula hospedeira.

A invenção abrange um método para a preparação dos anticorpos
30 pos que compreende o cultivo das células hospedeiras correspondente sob as condições que permitem a síntese de ditas moléculas de anticorpo e recuperação de ditos anticorpos de dito cultivo, por exemplo, expressando:

- uma primeira sequência de ácido nucleico que codifica a cadeia leve de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno;

5 - uma segunda sequência de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada de dito anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno;

10 - uma terceira sequência de ácido nucleico que codifica a cadeia leve de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que o domínio constante de cadeia leve CL é substituído pelo domínio constante de cadeia pesada CH1; e

15 - uma quarta sequência de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada de dito anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que o domínio constante de cadeia pesada CH1 é substituído pelo domínio constante de cadeia leve CL.

20 Uma outra modalidade da invenção é uma célula hospedeira que compreende

- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno

25 - vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos uns pelos outros.

30 Uma outra modalidade da invenção é uma célula hospedeira que compreende

a) um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia leve e um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada, de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno

35 b) um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia leve e um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada de um anticorpo que se liga espe-

cificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos uns pelos outros.

Uma outra modalidade da invenção é uma composição, preferivelmente uma composição farmacêutica ou de diagnóstico do anticorpo bivalente biespecífico de acordo com a invenção.

Uma modalidade adicional da invenção é uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo bivalente biespecífico de acordo com a invenção e pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Uma outra modalidade da invenção é um método para o tratamento de um paciente com necessidade de terapia, caracterizado pela administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo bivalente biespecífico de acordo com a invenção.

O termo "ácido nucleico ou molécula de ácido nucleico", como aqui utilizado, se destina a incluir as moléculas de DNA e as moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de filamento único ou filamento duplo, mas preferivelmente é DNA de filamento duplo.

Como aqui usado, as expressões "célula", "linhagem celular" e "cultura de células" são utilizadas de modo trocável e todas tais designações incluem a progênie. Assim, as palavras "transformantes" e "células transformadas" incluem a célula sujeita primária e as culturas derivadas desta sem levar em conta o número de transferências. Fica também entendido que todas as progênies não podem ser exatamente idênticas no conteúdo de DNA, devido às mutações deliberadas ou inadvertidas. A progênie variante que possui a mesma função ou atividade biológica quando submetida a triagem para a célula originariamente transformada é incluída. Onde as designações distintas forem destinadas, ficará claro a partir do contexto.

O termo "transformação" como aqui utilizado refere-se ao processo de transferência de um vetor/ácido nucleico em uma célula hospedeira. Se as células sem as formidáveis barreiras da parede celular forem usadas como células hospedeiras, a transfecção é realizada, por exemplo, pelo método de precipitação de fosfato de cálcio como descrito por Graham and Van der Eh, Virology 52 (1978) 546ff. No entanto, outros métodos para a

introdução de DNA nas células tais como por injeção nuclear ou por fusão de protoplastos também podem ser usados. Se as células procariotas ou células que contêm construções de parede celular substanciais forem utilizadas, por exemplo, um método de transfecção é o tratamento de cálcio usando cloreto de cálcio conforme descrito por Cohen, F. N, et al, PNAS. 69 (1972) 7110ff.

A produção recombinante de anticorpos utilizando a transformação é bem conhecida no estado da técnica e descrita, por exemplo, nos artigos de revisão de Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., et al., Arzneimittelforschung 48 (1998) 870-880 assim como nas US 6.331.415 e US 4.816.567.

Como aqui usado, "expressão" refere-se ao processo pelo qual um ácido nucleico é transcrito em mRNA e/ou ao processo pelo qual o mRNA transcrito (também referido como transcrição) está subsequentemente sendo trasladado nos peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. As transcrições e os polipeptídeos codificados são referidos coletivamente como produto genético. Se o polinucleotídeo for derivado de DNA genômico, a expressão em uma célula eucariótica pode incluir a recomposição do mRNA.

Um "vetor" é uma molécula de ácido nucleico, em particular auto-replicante, que transfere uma molécula de ácido nucleico inserida em e/ou entre as células do hospedeiro. O termo inclui vetores que funcionam principalmente para a inserção de DNA ou RNA em uma célula (por exemplo, integração cromossômica), replicação de vetores que funcionam principalmente para a replicação do DNA ou RNA, e vetores de expressão que funcionam para a transcrição e/ou translação do DNA ou RNA. Também estão incluídos os vetores que fornecem mais do que uma das funções como descritas.

Um "vetor de expressão" é um polinucleotídeo que, quando introduzido em uma célula hospedeira apropriada, pode ser transcrita e trasladada em um polipeptídeo. Um "sistema de expressão" geralmente refere-se a uma célula hospedeira adequada compreendida de um vetor de expressão que pode funcionar para produzir um produto de expressão desejado.

Os anticorpos bivalentes biespecíficos de acordo com a invenção são preferivelmente produzidos por meio de recombinação. Tais métodos são amplamente conhecidos no estado da técnica e compreendem a expressão da proteína em células procarióticas e eucarióticas com isolamento subsequente do polipeptídeo de anticorpo e, geralmente, a purificação para um grau de pureza farmacêuticamente aceitável. Para a expressão de proteína, ácidos nucleicos que codificam as cadeias leves e pesadas ou seus fragmentos são inseridos em vetores de expressão por meio de métodos padrão. A expressão é executada nas células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas como células de CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células de COS, leveduras ou células de *E. coli*, e o anticorpo é recuperado a partir de células (sobrenadante ou células após a lise). Os anticorpos bivalentes biespecíficos podem estar presentes nas células inteiras, em um lisato de células, ou em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. A purificação é executada a fim de eliminar outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos ou proteínas celulares, por técnicas padrão, incluindo tratamento alcalino/SDS, cromatografia de coluna e outros bem conhecidos na técnica. Ver Ausubel, F., et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

A expressão nas células NS0 é descrita, por exemplo, por Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; e Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. A expressão transitória é descrita, por exemplo, por Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. A clonagem de domínios variáveis é descrita por Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; e Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Um sistema de expressão transitória preferido (HEK 293) é descrito por Schlaeger, E.-J., and Christensen, K., in *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 e por Schlaeger, E.-J., in *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

As sequências de controle que são adequadas para procarion-

tes, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente, uma sequência de operador, e um sítio de ligação dos ribossomas. As células eucarióticas são conhecidas de utilizar promotores, intensificadores e sinais de poliadenilação.

5 O ácido nucleico é "operavelmente ligado" quando for colocado em uma conexão funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, o DNA para um líder de pré-sequência ou secretor é operavelmente ligado ao DNA para um polipeptídeo se for expresso como uma pré-proteína que participa da secreção do polipeptídeo; um promotor ou intensificador é
10 operavelmente ligado a uma sequência de codificação, se ela afeta a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação ao ribossomo é operavelmente ligado a uma sequência de codificação, se ele estiver posicionado de modo a facilitar a translação. Geralmente, "operavelmente ligado" significa que a sequências de DNA sendo ligadas são contíguas, e, no caso de um líder
15 secretor, contíguas e na estrutura de leitura. No entanto, os intensificadores não devem ser contíguos. A ligação é executada mediante a ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existem, os adaptadores ou ligantes de oligonucleotídeo sintéticos são utilizados em conformidade com a prática convencional.

20 Os anticorpos bivalentes biespecíficos são adequadamente separados do meio de cultura por processos convencionais de purificação de imunoglobulina tais como, por exemplo, a proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade. O DNA e o RNA que codificam os anticorpos monoclonais são facil-
25 mente isolados e sequenciados utilizando os procedimentos convencionais. As células de hibridoma podem servir como uma fonte de tal DNA e RNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser inserido em vetores de expressão, que são depois transfectados em células hospedeiras tais como células HEK 293, células de CHO, ou células de mieloma que de outra forma não produ-
30 zem a proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais recombinantes nas células hospedeiras.

As variantes da sequência de aminoácido (ou mutantes) do anti-

corpo bivalente biespecífico são preparadas pela introdução de alterações de nucleotídeo apropriadas no DNA de anticorpo, ou através da síntese de nucleotídeo. Tais modificações podem ser executadas, no entanto, apenas em uma faixa muito limitada, por exemplo, como descrito acima. Por exemplo, as modificações não alteram as características de anticorpo acima mencionadas tais como o isótipo IgG e ligação ao antígeno, mas podem melhorar o rendimento da produção recombinante, estabilidade da proteína ou facilitar a purificação.

Os seguintes exemplos, listagem de sequência e figuras são fornecidas para auxiliar a compreensão da presente invenção, o verdadeiro escopo da qual é apresentado nas reivindicações anexas. Entende-se que modificações podem ser feitas nos procedimentos apresentados, sem se afastar do espírito da invenção.

Sequência de Listagem

15 SEQ ID NO: 1 - sequência de aminoácido da cadeia pesada de anticorpos <IGF-1R> do tipo silvestre

SEQ ID NO: 2 - sequência de aminoácido de cadeia leve de anticorpos <IGF-1R> do tipo silvestre

20 SEQ ID NO: 3 - sequência de aminoácido da cadeia pesada** (HC**) de anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R>, em que o domínio da cadeia pesada CH1 é substituído pelo domínio de cadeia leve CL.

SEQ ID NO: 4 - sequência de aminoácido de cadeia leve** (LC**) de anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R>, em que o domínio de cadeia leve CL é substituído pelo domínio da cadeia pesada CH1.

25 SEQ ID NO: 5 - sequência de aminoácido do rótulo de peptídeo da ligação de His-Estreptavidina em ectodomínio IGF-1R (IGF-1R-His-SBP ECD).

SEQ ID NO: 6 - sequência de aminoácidos de cadeia pesada de anticorpo de ANGPT2 <ANGPT2> tipo silvestre.

30 SEQ ID NO: 7 - sequência de aminoácido da cadeia leve de anticorpo de ANGPT2 de <ANGPT2> tipo silvestre.

SEQ ID NO: 8 - sequência de aminoácido de domínio CH3 (Sali-

ências) com uma troca de T366W para utilização na tecnologia saliências-em-orifícios.

5 SEQ ID NO: 9 - sequência de aminoácidos do domínio CH3 (Orifício), com uma troca de L368A, T366S, Y407V para utilização na tecnologia saliências-em-orifícios.

SEQ ID NO: 10 - sequência de aminoácido do rótulo de peptídeo da ligação de His-Estreptavidina do ectodomínio IGF-1R (IGF-1R-His-SBP ECD).

Descrição das Figuras

10 Figura 1 - Figura esquemática de IgG, um anticorpo inteiro de ocorrência natural específico para um antígeno com dois pares de cadeias leves e pesadas que compreendem os domínios variáveis e constantes em uma ordem típica.

15 Figura 2 - Figura esquemática de um anticorpo bivalente biespecífico, compreendendo: a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno; e b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos uns pelos outros.

20 Figura 3 - Figura esquemática de um anticorpo bivalente biespecífico, compreendendo: a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno; e b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos uns pelos outros, e em que os domínios CH3 de ambas as cadeias pesadas são alterados pela tecnologia saliências-em-orifícios.

30 Figura 4 - Figura esquemática de um anticorpo bivalente biespecíficos, compreendendo: a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno; e b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos uns pelos outros, e em que um dos domínios constantes de cadeia pesada CH3

de ambas as cadeias pesada é substituído por um domínio constante da cadeia pesada CH1, e o outro domínio constante da cadeia pesada CH3 é substituído por um domínio constante de cadeia leve CL.

Figura 5 - Esquema da sequência de proteína de <IGF-1R>HC** de cadeia pesada do anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> (com um domínio constante de cadeia leve (CL) kappa.

Figura 6 - Esquema da sequência de proteína de <IGF-1R> LC** de cadeia leve** e anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R>.

Figura 7 - Mapa de plasmídeo do vetor de expressão de <IGF-1R> HC** de cadeia pesada** PUC-HC**-IGF-1R.

Figura 8 - Mapa de plasmídeo do vetor de expressão de <IGF-1R> LC** de cadeia leve** PUC-LC**-IGF-1R.

Figura 9 - Mapa de plasmídeo do vetor de expressão 4700-Hyg-OriP.

Figura 10 - Princípio de ensaio do ensaio de ligação com ponte de FACS IGF-1R-ANGPT2 celular sobre as células de expressão I24 IGF-1R para detectar a presença de anticorpo de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R> biespecífico funcional.

Figura 11 - Esquema IGF-1R ECD Biacore.

Figura 12 - SDS-PAGE e cromatografia de exclusão por tamanho de anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> bivalente monoespecífico (IgG1**) com HC** e LC** isolados a partir dos sobrenadantes de cultura de células após a transfecção transitória de células HEK293-F.

Figura 13 - Ligação de anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> monoespecífico e anticorpo <IGF-1R> tipo silvestre ao IGF-1R ECD em um ensaio de ligação com base em ELISA.

Figura 14 - SDS-PAGE e cromatografia de exclusão por tamanho da mistura de anticorpos de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R> purificada a partir dos sobrenadantes de cultura celular das células HEK293-F transitoriamente transfectadas.

Figura 15 - Resultados para as Amostras de A a F do ensaio de ligação com ponte de FACS IGF-1R-ANGPT2 celular sobre as células de

expressão I24 IGF-1R para detectar a presença de anticorpo de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R> funcional biespecífico na mistura de anticorpos purificados: Proteínas purificadas

Amostras de A a F:

5

A = I24 não tratada

B = I24 + 2 µg/ml de hANGPT2 + Isótipo hIgG

C = I24 + 2 µg/ml de hANGPT2 + Mistura da coexpressão de anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> e de anticorpo do tipo silvestre <ANGPT2> compreendendo anticorpo de troca de CL-CH1 de <ABGPT2-

10 IGF-1R> biespecífico

D: não presente

E = I24 + 2 µg/ml de hANGPT2 + anticorpo <ANGPT2> tipo silvestre

F = I24 + 2 µg/ml de hANGPT2 + anticorpo tipo silvestre <IGF-

15 1R>

Exemplos

Materiais e métodos gerais

A informação geral sobre as sequências de nucleotídeo de cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas humanas é fornecida em: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Os aminoácidos de cadeias de anticorpos são numerados e referidos de acordo com a numeração da EU (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)).

25

Técnicas de DNA recombinante

Os métodos padrão foram utilizados para manipular o DNA conforme descrito em Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Os reagentes biológicos moleculares foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

30

Síntese genética

Os segmentos genéticos desejados foram preparados a partir de oligonucleotídeos produzidos pela síntese química. Os segmentos genéticos longos de 600 a 1800 bp, que são flanqueados por sítios de clivagem da endonuclease de restrição singular, foram montados pelo recozimento e ligação de oligonucleotídeos incluindo a amplificação PCR e subsequentemente clonados através dos sítios de restrição indicados, por exemplo, KpnI/SacI ou AscI/PacI em um pPCRScripT (Stratagene), com base no vetor de clonagem pGA4. As sequências de DNA dos fragmentos de gene subclonados foram confirmadas pelo sequenciamento de DNA. Os fragmentos da síntese genética foram ordenados de acordo com as especificações dadas em Genart (Regensburg, Germany).

Determinação da sequência de DNA

As sequências de DNA foram determinadas por sequenciamento de filamento duplo executado em MediGenomix GmbH (Martinsried, Germany) ou Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Germany).

Análise de sequências de DNA e proteína e gerenciamento dos dados da sequência

O pacote de software da GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) versão 10.2 e Infomax's Vector NT1 Advance suite version 8.0 foi utilizado para a criação de sequência, mapeamento, análise, anotação e ilustração.

Vetores de expressão

Para a expressão dos anticorpos descritos, variantes dos plasmídeos de expressão para células de expressão transitória (por exemplo, HEK293 EBNA ou F-HEK293) com base em uma organização de cDNA com um promotor CMV-Intron A ou em uma organização genômica com um promotor CMV foram aplicadas.

Em comparação com o cassete de expressão de anticorpos os vetores continham:

- uma origem de replicação que permite a replicação deste plasmídeo em E. coli, e

- um gene β -lactamase que confere resistência à ampicilina em *E. coli*.

A unidade de transcrição do gene de anticorpo é composta dos seguintes elementos:

- 5 - sítio(s) de restrição único(s) na extremidade 5'
- o intensificador e promotor de início imediato a partir do citomegalovirus,
- seguido pela sequência Intron A no caso da organização de cDNA,
- 10 - uma região não trasladada 5' de um gene de anticorpos humanos,
- uma sequência de sinal de cadeia pesada de imunoglobulina,
- a cadeia de anticorpo humano (tipo silvestre ou com troca de domínio), como cDNA ou como organização genômica com uma organização exon-intron da imunoglobulina
- 15 - uma região não trasladada 3' com uma sequência de sinal de poliadenilação, e
- sítio(s) de restrição único(s) na extremidade 3'.

Os genes de fusão compreendendo cadeias de anticorpos descritas como descritas a seguir foram gerados por PCR e/ou síntese genética e montados com métodos e técnicas recombinantes conhecidas mediante a conexão dos segmentos de ácido nucleico de acordo, por exemplo, usando sítios de restrição únicos nos respectivos vetores. As sequências de ácido nucleico subclonadas foram verificadas pelo sequenciamento de DNA. Para as transfecções transitórias maiores quantidades dos plasmídeos foram preparadas mediante a preparação de plasmídeo a partir de culturas de *E. coli* transformadas (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Técnicas de cultura celular

As técnicas de cultura celular padrão foram utilizadas como descritas em Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Os anticorpos biespecíficos foram expressos pela co-transfecção transitória dos respectivos plasmídeos de expressão na HEK293-EBNA aderentemente em desenvolvimento ou em células HEK29-F em desenvolvimento na suspensão como descrito abaixo.

5 Transfecções transitórias no sistema EBNA-HEK293

Os anticorpos biespecíficos foram expressos pela co-transfecção transitória dos respectivos plasmídeos de expressão (por exemplo, que codificam a cadeia pesada e pesada modificada, assim como a cadeia leve e leve modificada correspondente) em células HEK293-EBNA aderentemente em desenvolvimento (linhagem celular de rim embrionário humano 293 expressando o antígeno nuclear Epstein-Barr-Virus; American type culture collection deposit number ATCC # CRL-10852, Lot. 959 218) cultivadas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco), suplementado com 10% Ultra Low IgG FCS (soro fetal bovino, Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), e 250 µg/ml Geneticin (Gibco). Para a transfecção FuGENE™ 6 Transfection Reagent (Roche Molecular Biochemicals) foi utilizado em uma relação de reagente FuGENE™ (µl) para DNA (µg) de 4:1 (variando de 3:1 a 6:1). As proteínas foram expressas a partir dos respectivos plasmídeos usando uma relação molar de cadeia leve e cadeia pesada (modificada e tipo silvestre) que codificam os plasmídeos de 1:1 (equimolar), variando 1:2 a 2:1, respectivamente. As células foram alimentadas no dia 3 com L-Glutamine ad 4 mM, Glicose [Sigma] e NAA [Gibco]. Os sobrenadantes de cultura celular contendo anticorpo biespecífico foram colhidos a partir do dia 5 até 11 após a transfecção por centrifugação e armazenados a -20°C. Informação geral sobre a expressão recombinante de imunoglobulina humana, por exemplo, em células HEK293 é fornecida em: Meissner, P. et al. Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

25 Transfecções transitórias no sistema HEK293-F

Os anticorpos biespecíficos foram gerados pela transfecção transitória dos respectivos plasmídeos (por exemplo, que codificam a cadeia pesada e pesada modificada, assim como a cadeia leve e leve modificada correspondente), utilizando o sistema HEK293-F (Invitrogen) de acordo com

a instrução do fabricante. Em resumo, células HEK293-F (Invitrogen) em desenvolvimento na suspensão ou em um frasco agitado ou em um fermentador agitado no meio de expressão Freestyle 293 livre de soro (Invitrogen) foram transfectadas com uma mistura dos quatro plasmídeos de expressão e 293fectin ou fectin (Invitrogen). Para o frasco de agitação de 2 L (Corning), células HEK293-F foram semeadas em uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/mL em 600 mL e incubadas a 120 rpm, CO₂ a 8%. O dia após as células terem sido transfectadas com uma densidade celular de ca. $1,5 \times 10^6$ células/mL com ca. 42 mL de mistura de A) 20 mL Opti-MEM (Invitrogen) com 600 µg de DNA plasmídeo total (1 mg/mL) que codifica a cadeia pesada ou pesada modificada, respectivamente, e a cadeia leve correspondente em uma relação equimolar e B) 20 mL Opti-MEM + 1,2 mL 293 fectin ou fectin (2 µl/ml). De acordo com o consumo de glicose, solução de glicose foi adicionada durante o decurso da fermentação. O sobrenadante contendo o anticorpo secretado foi colhido após 5 a 10 dias e os anticorpos foram diretamente purificados a partir do sobrenadante ou o sobrenadante foi congelado e armazenado.

Determinação de proteína

A concentração de proteína de anticorpos purificados e derivados foi determinada através da determinação da densidade óptica (DO) em 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar calculado na base da sequência de aminoácido de acordo com Pace et al., Protein Science, 1995, 4 2411-1423.

Determinação da concentração de anticorpos nos sobrenadantes

A concentração de anticorpos e derivados em sobrenadantes de cultura celular foi estimada por imunoprecipitação com Protein A Agarose-beads (Roche). 60 µL de glóbulos de Protein A Agarose são lavados três vezes em TBS-NP40 (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40). Subsequentemente, de 1 a 15 mL de sobrenadante de cultura celular foram aplicados aos glóbulos de Protein A Agarose pré-equilibrados em TBS-NP40. Após incubação durante 1 h em temperatura ambiente os glóbulos foram lavadas em uma Ultrafree-MC-filter column (Amicon), uma vez com

0,5 mL de TBS-NP40, duas vezes com 0,5 mL 2x tampão de fosfato (2xPBS, Roche) e brevemente quatro vezes com 0,5 mL 100 mM Na-citrato pH 5,0. O anticorpo ligado foi eluído pela adição de 35 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen). Metade da amostra foi combinada com NuPAGE® Sample Reducing Agent ou deixada não reduzida, respectivamente, e aquecida durante 10 min a 70°C. Consequentemente, de 5 a 30 µl foram aplicados a um 4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (com tampão MOPS para SDS-PAGE não reduzido e tampão MES com NuPAGE® Antioxidant running buffer additive (Invitrogen) para SDS-PAGE reduzido) e manchados com Coomassie Blue.

A concentração de anticorpos e derivados nos sobrenadantes de cultura celular foi medida quantitativamente por cromatografia de afinidade HPLC. Resumidamente, os sobrenadantes de cultura celular contendo anticorpos e derivados que se ligam à Proteína A foram aplicados a uma coluna Applied Biosystems Poros A/20 em 200 mM KH₂PO₄, 100 mM citrato de sódio, pH 7,4 e eluídos a partir da matriz com 200 mM NaCl, 100 mM ácido cítrico, pH 2,5 em um sistema Agilent HPLC 1100. A proteína eluída foi quantificada por absorção de UV e integração das áreas de pico. Um anticorpo IgG1 padrão purificado serviu como um padrão.

Alternativamente, a concentração de anticorpos e derivados em sobrenadantes de cultura celular foi medida por Sandwich-IgG-ELISA. Resumidamente, placas de microtítulo com 96 reservatórios StreptaWell High Bind Streptavidin A (Roche) foram revestidas com 100 µL/reservatório, molécula de captura de IgG anti-humano biotinilada F(ab')₂-h-Fcγ BI (Dianova) com 0,1 µg/mL durante 1 h em temperatura ambiente ou, alternativamente, durante a noite a 4°C e, subsequentemente, lavadas três vezes com 200 µL/reservatório de PBS, 0,05% de Tween (PBST, Sigma). 100 µL/reservatório de uma série de diluição em PBS (Sigma) dos respectivos sobrenadantes de cultura celular contendo anticorpos foi adicionada aos reservatórios e incubada durante 1 a 2 h em um agitador de placa de microtítulo na temperatura ambiente. Os reservatórios foram lavados três vezes com 200 µL/reservatório de PBST e o anticorpo ligado foi detectado com 100 µl

F(ab')₂<hFcγ>POD (Dianova) com 0,1 µg/mL como anticorpo de detecção durante 1 a 2 h em um agitador de microplaca na temperatura ambiente. O anticorpo de detecção não ligado foi removido por lavagem três vezes com 200 µL/reservatório de PBST e o anticorpo de detecção ligado foi detectado
5 pela adição de 100 ABTS uL/reservatório. A determinação da absorbância foi realizada em um Tecan Flúor Spectrometer em uma medição do comprimento de onda de 405 nm (comprimento de onda de referência 492 nm).

Purificação da proteína

As proteínas foram purificadas a partir dos sobrenadantes de
10 cultura celular filtrados referindo-se aos protocolos padrão. Resumindo, os anticorpos foram aplicados a uma coluna de Protein A Sepharose (GE Healthcare) e lavados com PBS. A eluição de anticorpos foi obtida em pH 2,8, seguido pela neutralização imediata da amostra. A proteína agregada foi separada dos anticorpos monomérica pela cromatografia de exclusão de
15 tamanho (Superdex 200, GE Healthcare) em PBS ou em 20 mM histidina, 150 mM NaCl, pH 6,0. As frações de anticorpo monoméricas foram reunidas, concentradas se requerido usando, por exemplo, um concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), congeladas e armazenadas a -20°C ou -80°C. Parte das amostras foram fornecidas para subseqüentes análises
20 de proteína e caracterização analítica, por exemplo, por SDS-PAGE, cromatografia de exclusão de tamanho ou espectrometria de massa.

SDS-PAGE

O sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) foi utilizado conforme a instrução do fabricante. Em particular, 10% ou 4 a 12% de géis
25 NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6,4) e um NuPAGE® MES (géis reduzida, com aditivo tampão de operação NuPAGE® Antioxidant) ou tampão de operação MOPS (géis não reduzidos) foi usado.

Cromatografia de exclusão de tamanho analítica

A cromatografia de exclusão de tamanho para a determinação
30 da agregação e estado oligomérico de anticorpos foi executada por cromatografia HPLC. Resumidamente, os anticorpos purificados de Proteína A foram aplicados a uma coluna Tosoh TSKgel G3000SW em 300 mM NaCl, 50

mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,5 em um sistema Agilent HPLC 1100 ou a uma coluna Superdex 200 (GE Healthcare) em 2 x PBS em um Dionex HPLC-Sistem. A proteína eluída foi quantificada por absorção de UV e integração das áreas de pico. BioRad Gel Filtration Standard 151-1901 serviu como um

5 padrão.

Espectrometria de massa

A massa submetida ao tratamento de retirada de glicose total de anticorpos com cruzamento foi determinada e confirmada através de espectrometria de massas com ionização de eletropulverização (ESI-MS). Resu-

10 midamente, 100 µg de anticorpos purificados foram submetidos ao tratamento de retirada de glicose com 50 mU N-Glicosidase F (PNGaseF, ProZyme) em 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7 a 37°C durante 12 a 24 horas em uma concentração de proteínas de até 2 mg/ml e subsequentemente submetidos ao tratamento de retirada de sal através de HPLC em uma coluna Sephadex

15 G25 (GE Healthcare). A massa das respectivas cadeias pesadas e leves foi determinada por ESI-MS após desglicosilação e redução. Em poucas palavras, 50 µg de anticorpos em 115 µl foram incubados com 60 µl de 1M TCEP e 50 µl de 8 M de cloridrato de guanidina subsequentemente submetido ao tratamento de retirada de sal. A massa total e a massa das cadeias pesada

20 e leve reduzidas foi determinada através de ESI-MS em um sistema Q-Star MS Elite equipado com uma fonte NanoMate.

ELISA de ligação IGF-1R ECD

As propriedades de ligação dos anticorpos gerados foram avaliadas em um ensaio ELISA com o domínio extracelular IGF-1R (ECD). Por

25 esta causa o domínio extracelular de IGF-1R (resíduos de 1-462) compreendendo a sequência líder natural e os 12 domínios ricos em LI-cisteína do ectodomínio IGF-1R humano da cadeia alfa (de acordo com o McKern et al., 1997; Ward et al., 2001) fundido a um rótulo de peptídeo de ligação a His-Estreptavidina N-terminal (His-SBP) foi clonado em um vetor pcDNA3 derivado e transitoriamente expresso em células HEK293F. A sequência de pro-

30 teína do IGF-1R-His-SBP ECD é dada na SEQ ID NO: 10. Placas de microtítulo de 96 reservatórios StreptaWell High Bind Streptavidin A (Roche) foram

revestidas com 100 µL/reservatório de sobrenadante de cultura celular contendo proteína de fusão solúvel IGF-1R-ECD-SBP durante a noite a 4°C e lavadas três vezes com 200 µL/reservatório de PBS, 0,05% de Tween (PBST, Sigma). Subsequentemente, 100 uL/reservatório de uma série de diluições do respectivo anticorpo e como um anticorpo <IGF-1R> tipo silvestre de referência em PBS (Sigma), incluindo 1% BSA (fração V, Roche) foi adicionada aos reservatórios e incubada durante 1 a 2 h em um agitador de placa de microtítulo na temperatura ambiente. Para a série de diluição a mesma quantidade de anticorpos purificados foi aplicada nos reservatórios.

Os reservatórios foram lavados três vezes com 200 µL/reservatório de PBST e o anticorpo ligado foi detectado com 100 µL/reservatório de F(ab')₂-hFcγ-POD (Dianova) em 0,1 µg/ml (1:8000) como anticorpo de detecção durante 1 a 2 h em um agitador de placa de microtítulo na temperatura ambiente. O anticorpo de detecção não ligado foi removido por lavagem três vezes com 200 µL/reservatório de PBST e o anticorpo de detecção ligado foi detectado mediante a adição de 100 µl de ABTS/reservatório. A determinação da absorbância foi executada em um Tecan Flúor Spectrometer em uma medição do comprimento de onda de 405 nm (comprimento de onda de referência 492 nm).

20 IGF-1R ECD Biacore

A ligação de anticorpos gerados para ao IGF-1R ECD humano também foi investigada por ressonância de plásmon superficial usando um instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden). Resumidamente, para medições de afinidade anticorpos Goat-Anti-Human IgG, JIR 109-005-098 foram imobilizados em um chip CM5 através do acoplamento de aminas para a apresentação dos anticorpos contra IGF-1R ECD-Fc humano rotulado. A ligação foi medida em tampão HBS (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20, pH 7,4), 25°C. IGF-1R ECD (R&D Systems ou em linhagem purificada) foi adicionado em várias concentrações em solução. A associação foi medida por uma injeção de IGF-1R ECD de 80 segundos a 3 minutos; a dissociação foi medida pela lavagem da superfície do chip com tampão HBS durante 3 a 10 minutos e um

valor KD foi estimado utilizando um modelo de ligação Langmuir 1:1. Devido à baixa densidade de carga e nível de captura de anticorpos <IGF-1R> monovalente, a ligação de IGF-1R ECD foi obtida. Os dados de controle negativo (por exemplo, curvas de tampão) foram subtraídos das curvas de amostra para a correção da deriva de linha de base intrínseca do sistema e para a redução do sinal de interferência. Biacore T100 Evaluation Software versão 1.1.1 foi utilizado para análise de sensorgramas e para o cálculo dos dados de afinidade. A Figura 11 mostra um esquema do ensaio Biacore.

EXEMPLOS 1

- 10 Produção, expressão, purificação e caracterização de anticorpo <IGF-1R> bivalente, em que os domínios variáveis CL e CH1 são substituídos entre si (abreviado aqui como anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R>

EXEMPLO 1A

- 15 PRODUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO PARA O ANTICORPO DE TROCA DE CL-CH1 DE <IGF-1R> MONOESPECÍFICO, BIVALENTE

As sequências para os domínios variáveis de cadeia pesada e leve do anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> monoespecífico, bivalente incluindo as respectivas sequências condutoras descritas neste exemplo, são derivadas de uma cadeia pesada de anticorpo de <IGF-1R> humano (SEQ ID NO: 1, plasmídeo 4843-pUC-HC-IGF-1R) e uma cadeia leve (SEQ ID NO: 2, plasmídeo 4842-pUC-LC-IGF-1R) descritas na WO 2005/005635, e os domínios constantes de cadeia pesada e leve são derivados de um anticorpo humano (C-capa e IgG1). O segmento de genes codificando a sequência condutora de anticorpo <IGF-1R>, o domínio variável de cadeia pesada (VH) e o domínio de cadeia capa-leve humano (CL) foram unidos e fundidos à extremidade 5' dos domínios Fc dos domínios constantes de cadeia pesada e humana (Hinge-CH2-CH3). O DNA codificando para a respectiva proteína de fusão resultante da troca do domínio CH1 pelo domínio CL (troca de CH1-CL) foi gerado pela síntese dos genes e é denotado HC** de <IGF-1R> (SEQ ID NO: 3) no seguinte.

Os segmentos de genes para a sequência condutora do anticorpo <IGF-1R>, o domínio variável de cadeia leve (VL) e o domínio constante

de cadeia leve γ 1 humano (CH1) foram unidos como cadeia independente. O DNA codificando para a respectiva proteína de fusão resultante da troca do domínio CL pela domínio CH1 (troca CL-DH1) foi gerado pela síntese de genes e é denotado LC** de <IGF-1R> (SEQ ID NO: 4) no seguinte.

5 A Figura 5 e a Figura 6 apresentam uma vista esquemática da sequência de proteínas da cadeia pesada modificada de HC** <IGF-1R> e da cadeia leve modificada de LC** de <IGF-1R>.

No seguinte, os vetores de expressão respectivos são resumidamente descritos:

10 Vetor pUC-HC**-IGF-1R

O vetor pUC-HC**-IGF-1R é um plasmídeo de expressão, por exemplo para expressão transiente de uma cadeia pesada HC** de <IGF-1R> de troca de CL-CH1 (cassete de expressão organizada de cDNA; com CMV-Íntron A) em células HEK293 (EBNA) ou para expressão estável em

15 células de CHO.

Além do cassete de expressão HC** de <IGF-1R>, este vetor contém:

- uma origem de replicação do vetor pUC18, que possibilita a replicação deste plasmídeo em *E. coli*, e
- 20 - um gene de β -lactamase que confere resistência à ampicilina em *E. coli*.

A unidade de transcrição do gene HC** de <IGF-1R> é composta dos seguintes elementos:

- o sítio de restrição Ascl na extremidade 5',
- 25 - o intensificador prematuro imediato e o promotor do citomegalovírus humano,
- seguido pela sequência de Íntron A,
- uma região não transladada 5' de um gene de anticorpo humano,
- 30 - uma sequência de sinal de cadeia leve de imunoglobulina,
- a cadeia de HC** madura de <IGF-1R> humano codificando uma fusão do domínio variável de cadeia pesada humana (VH) e o domínio

constante de cadeia capa-leve humana (CL) fundido à extremidade 5' dos domínios Fc dos domínios constantes de cadeia pesada $\gamma 1$ (Hinge-CH2-CH3).

- uma região não transladada 3' com uma sequência de sinal de poliadenilação, e o sítio de restrição SgrAI na extremidade 3'.

O mapa do plasmídeo do vetor de expressão PUC-HC**-IGF-1R HC** de <IGF-1R> de troca da cadeia** CL-CH1 pesada é mostrado na Figura 7. A sequência de aminoácidos do HC** de <IGF-1R> (incluindo a sequência de sinal) é dada na SEQ ID NO: 3.

10 Vetor pUC-LC**-IGF-1R

O vetor pUC-LC**-IGF-1R é um plasmídeo de expressão, por exemplo para expressão transiente de uma cadeia leve LC** de <IGF-1R> de troca de CL-CH1 (cassete de expressão organizado de cDNA; com Íntron-CMV A) em células HEK293 (EBNA) ou para expressão estável em células de CHO.

Além do cassete de expressão LC** de <IGF-1R>, este vetor contém:

- uma origem de replicação do vetor pUC18, que possibilita a replicação deste plasmídeo em *E. coli*, e
- um gene de β -lactamase que confere resistência à ampicilina em *E. coli*.

A unidade de transcrição do gene LC** de <IGF-1R> é composta dos seguintes elementos:

- o sítio de restrição Sse8387I na extremidade 5',
- o intensificador prematuro imediato e o promotor do citomegalovírus,
- seguido pela sequência de Íntron A,
- uma região não transladada 5' de um gene de anticorpo humano,
- uma sequência de sinal de cadeia pesada de imunoglobulina,
- a cadeia de LC** madura de anticorpo de <IGF-1R> humano codificando uma fusão do domínio variável de cadeia leve humana (VL) e os

domínios constantes de cadeia γ 1-pesada humana (CH1).

- uma região não transladada 3' com uma sequência de sinal de poliadenilação, e os sítios de restrição Sall e FseI na extremidade 3'.

O mapa do plasmídeo do vetor de expressão pUC-LC^{**}-IGF-1R LC^{**} de <IGF-1R> de troca da cadeia^{**} leve CL-CH1 é mostrado na Figura 8. A sequência de aminoácidos do LC^{**} de <IGF-1R> (incluindo a sequência de sinal) é dada na SEQ ID NO: 4.

Os plasmídeos pUC-HC^{**}-IGF-1R e pUC-LC^{**}-IGF-1R podem ser usados para cotransfecções transientes ou estáveis, por exemplo nas células HEK293, HEK293 EBNA ou de CHO (sistema de 2 vetores). Por razões comparativas, o anticorpo de <IGF-1R> do tipo selvagem foi transientemente expresso dos plasmídeos 4842-pUC-LC-IGF-1R (SEQ ID NO: 2) e 4843-pUC-HC-IGF-1R (SEQ ID NO: 1) análogos àqueles descritos neste exemplo.

De modo a se obter níveis de expressão mais elevados nas expressões transientes em células HEK293 EBNA, o cassete de expressão HC^{**} de <IGF-1R> pode ser subclonado através dos sítios AscI, SgrAI e o cassete de expressão LC^{**} de <IGF-1R> pode ser subclonado através dos sítios Sse8387I e FseI no vetor de expressão 4700 pUC-Hyg_OriP contendo

- um elemento OriP, e
- um gene de resistência à higromicina como um marcador selecionável.

As unidades de transcrição de cadeias pesada e leve podem ou ser subclonadas em dois vetores 4700-pUC-Hyg-OriP independentes para cotransfecção (sistema de dois vetores) ou eles podem ser clonados em um vetor 4700-pUC-Hyg-OriP comum (sistema de 1 vetor) para transfecções transientes ou estáveis subsequentes com os vetores resultantes. A Figura 9 apresenta um mapa de plasmídeo do vetor básico 4700-pUC-OriP.

EXEMPLO 1B

30 PRODUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO DE ANTICORPOS DE TROCA DE CL-CH1 DE <IGF-1R> MONOESPECÍFICOS, BIVALENTES

Os genes de fusão de <IGF-1R> (genes de fusão de HC^{**} e

LC**) compreendendo as sequências de FAB trocadas do anticorpo de <IGF-1R> do tipo selvagem foram montados com métodos e técnicas re-combinantes conhecidas mediante conexão dos segmentos de ácido nucleico concordantes.

- 5 As sequências de ácido nucleico codificando o HC** e o LC** de IGF-1R foram, cada um, sintetizados por síntese química e subsequentemente clonados em um pPCRScripT (Stratagene) com base no vetor de clonagem pGA4 na Geneart (Regensburg, Alemanha). O cassete de expressão codificando o HC** de IGF-1R foi ligado no respectivo plasmídeo de *E. coli* 10 através dos sítios de restrição PvuII e BmgBI, resultando no vetor final pUC-HC**-IGF-1R; o cassete de expressão codificando o LC** de IGF-1R foi ligado no respectivo plasmídeo de *E. coli* através dos sítios de restrição PvuII e Sall, resultando no vetor final pUC-LC**-IGF-1R. As sequências de ácido nucleico subclonadas foram verificadas por sequenciação de DNA. Quanto 15 às transfecções transientes e estáveis, maiores quantidades dos plasmídeos foram preparadas pela preparação de plasmídeo das culturas de *E. coli* transformadas (Nucleobond AX, Macherey-Nagel)

EXEMPLO 1C

- 20 EXPRESSÃO TRANSIENTE DE ANTICORPO DE TROCA DE CL-CH1 DE <IGF-1R> MONOESPECÍFICO, BIVALENTE, PURIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE MEDIANTE ESPECTROMETRIA DE MASSA

- O anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> recombinante foi expresso por cotransfecção transiente dos plasmídeos pUC-HC**-IGF-1R e pUC-LC**-IGF-1R em células de suspensão HEK293-F conforme descrito 25 acima.

- O anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> monoespecífico, bivalente, expresso e secretado, foi purificado dos sobrenadantes de cultura celular filtrados por cromatografia de afinidade de Proteína A de acordo com o descrito acima. Em resumo, os sobrenadantes da cultura celular contendo 30 o anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> das transfecções transientes foram clarificados por centrifugação e filtração e aplicados a uma coluna HiTrap MabSelect Xtra de Proteína A (GE Healthcare) equilibrada com tampão

de PBS (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,4). As proteínas não ligadas foram removidas por lavagem com tampão de equilíbrio de PBS seguido por tampão de citrato de sódio 0,1 M, pH 5,5, e lavadas com PBS. A eluição do anticorpo foi obtida com citrato de sódio 100 mM, pH 2,8, seguido por neutralização imediata da amostra com 300 μl de Tris 2 M, pH 9,0, por fração de 2 ml. A proteína agregada foi separada dos anticorpos monoméricos por cromatografia de exclusão de tamanho em uma coluna de graduação de 200 prep HiLoad 26/60 Superdex (GE Healthcare) em Histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0, e frações de anticorpos monoméricos foram subsequentemente concentradas com o uso de um concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra-15. O anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> foi congelado e armazenado em -20°C ou -80°C . A integridade do anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> foi analisado por SDS-PAGE na presença e ausência de um agente redutor e subsequente mancha com azul brilhante de Coomassie, como descrito acima. O estado monomérico do anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> foi confirmado por cromatografia analítica de exclusão de tamanho (Figura 12). As amostras caracterizadas foram consideradas para caracterização analítica e funcional proteica subsequente. A espectrometria de massa ESI confirmou a massa molecular teórica do anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> completamente desglicosilado.

EXEMPLO 1D

ANÁLISE DAS PROPRIEDADES DE LIGAÇÃO DE IGF-1R DO ANTICORPO DE TROCA CL-CH1 DE <IGF-1R> MONOESPECÍFICO, BIVALENTE EM UM ELISA DE LIGAÇÃO DE ECD DE IGF-1R E POR BIACORE

As propriedades de ligação de anticorpo de troca de CL-DH1 de CL-CH1 de <IGF-1R>, monoespecífico, bivalente, foram avaliadas em um ensaio de ELISA com o domínio extracelular de IGF-1R (ECD) como descrito acima. Por causa disto, o domínio extracelular de IGF-1R (resíduos 1 a 462) compreendendo a sequência condutora natural e os 12 domínios ricos em L-cisteína do ectodomínio IGF-1R humano da cadeia alfa (de acordo com McKern *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 2001) fundido a um rótulo peptídico de liga-

ção N-terminal His-Estreptavidina (His-SBP) foi clonado em um derivado do vetor pcDNA3 e transientemente expresso em células HEK293F. A sequência de proteínas do ECD de IGF-1R-His-SBP é dada acima. A curva de titulação obtida mostrou que o anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> foi

5 funcional e apresentou características e cinética de ligação comparáveis com o anticorpo de <IGF-1R> do tipo selvagem dentro do erro do método e, assim, pareceu completamente funcional (Figura 13).

Estas descobertas foram corroboradas pelos dados de Biacore com os respectivos anticorpos purificados, que mostraram que o anticorpo

10 de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> monoespecífico, bivalente com um valor de KD de 3,7 pM tinha uma afinidade e cinéticas de ligação comparáveis ao ECD de IGF-1R como o anticorpo de <IGF-1R> original do tipo selvagem com um valor de KD de 3,2 nM.

EXEMPLO 1G

15 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES DE LIGAÇÃO DE IGF-1R DO ANTICORPO DE TROCA DE CL-CH1 DE <IGF-1R> MONOESPECÍFICO POR FACS COM CÉLULAS I24 SUPER-EXPRESSANDO IGF-1R

De modo a confirmar, a atividade de ligação do anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> ao IGF-1R super-expresso sobre a superfície

20 das células I24 (células NIH3T3 expressando IGF-1R humano recombinante, Roche) é estudada por FACS. Resumidamente, células 5×10^5 I24 por tubo de FACS são incubadas com uma diluição de anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> purificada e anticorpo de <IGF-1R> do tipo selvagem como uma referência e incubada sobre gelo por 1 hora. O anticorpo não ligado é

25 removido por lavagem com 4 ml de PBS gelado (Gibco) + 2% de FCS (Gibco). Subsequentemente, as células são centrifugadas (5 minutos em 400 g) e o anticorpo ligado é detectado com o conjugado F(ab')₂ <hFcγ>PE (Dianova) sobre gelo por 1 hora protegido da luz. O anticorpo de detecção não ligado é removido por lavagem com 4 ml de PBS gelado + 2% de FCS. Sub-

30 sequentemente, as células são centrifugadas (5 minutos, 400 g), recolocadas em suspensão em 300 a 500 µl de PBS e o anticorpo de detecção ligado é quantificado sobre um FACSCalibur ou FACS Canto [BD (canal FL2,

10.000 células por aquisição). Durante a experiência, os controles do isótipo respectivo são incluídos para excluir quaisquer eventos de ligação não específicos. A ligação do anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> e do anticorpo de referência de <IGF-1R> do tipo selvagem, ao IGF-1R sobre as
 5 células I24 resulta em uma mudança comparável dependente da concentração da intensidade de fluorescência média.

EXEMPLOS 2

DESCRIÇÃO DE UM ANTICORPO DO TIPO SELVAGEM <ANGPT2> MONOESPECÍFICO, BIVALENTE

10 EXEMPLO 2A

PRODUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO PARA O ANTICORPO DO TIPO SELVAGEM <ANGPT2> MONOESPECÍFICO, BIVALENTE

As sequências para os domínios variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo do tipo selvagem de <ANGPT2> de ANGPT2 mono-
 15 específico bivalente incluindo as sequências condutoras respectivas descritas neste exemplo, são derivadas de uma cadeia pesada (SEQ ID NO: 6) e uma cadeia leve (SEQ ID NO: 7) de anticorpo <ANGPT2> humano descritas na WO 2006/045049, e os domínios constantes de cadeias pesada e leve são derivados de um anticorpo humano (C-capa e IgG1).

20 O anticorpo de <ANGPT2> do tipo selvagem foi clonado nos plasmídeos SB04-pUC-HC-ANGPT2 (SEQ ID NO: 6) e SB06-pUC-LC-ANGPT2 (SEQ ID NO: 7) que são análogos aos vetores descritos no Exemplo 1A anterior. Por razões de comparação e para experiências de coexpressão (ver o Exemplo 3) o anticorpo de <ANGPT2> do tipo selvagem foi
 25 transientemente (co-)expresso dos plasmídeos SB04-pUC-HC-ANGPT2 e SB06-pUC-LC-ANGPT2.

EXEMPLO 2B

PRODUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO DO ANTICORPO MONOESPECÍFICO, BIVALENTE TIPO SELVAGEM DE <ANGPT2>

30 As sequências de ácido nucleico codificando HC e LC de <ANGPT2> foram, cada uma, sintetizadas mediante síntese química e subsequentemente clonadas em um vetor de clonagem pGA4 com base no pP-

CRScript (Stratagene) em Geneart (Regensburg, Alemanha). O cassete de expressão codificando o HC <ANGPT2> foi clonado no respectivo plasmídeo de *E. coli*, resultando no vetor final SB04-pUC-HC-ANGPT2; o cassete de expressão codificando o respectivo LC de <ANGPT2> foi clonado no respectivo plasmídeo de *E. coli*, resultando no vetor final SB06-pUC-LC-ANGPT2. As sequências de ácido nucleico subclonadas foram verificadas por sequencição de DNA. Para transfecções transientes e estáveis, maiores quantidades dos plasmídeos foram preparadas pela preparação de plasmídeos das culturas de *E. coli* transformadas (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

10 EXEMPLO 3

EXPRESSÃO DO ANTICORPO <ANGPT2-IGF-1R> BIESPECÍFICO, BIVALENTE, EM QUE, NA LIGAÇÃO DA CADEIA PESADA E LEVE A IGF-1R, OS DOMÍNIOS CONSTANTES CL E CH1 SÃO SUBSTITUÍDOS ENTRE SI (ABREVIADO AQUI COMO ANTICORPO DE TROCA DE CL-CH1 DE <ANGPT2-IGF-1R>)

15 EXEMPLO 3A

COEXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO TRANSIENTE DO ANTICORPO DE TROCA DE CL-CH1 DE <IGF-1R> E ANTICORPO DO TIPO SELVAGEM DE <ANGPT2> NAS CÉLULAS HEK293 EBNA PARA PRODUIR ANTICORPO DE TROCA DE CL-CH1 DE <ANGPT2-IGF-1R> BIESPECÍFICO

De modo a gerar um anticorpo biespecífico funcional reconhecendo IGF-1R através de Fab do anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> de um lado, e da região de FAB do tipo selvagem de <ANGPT2>, do outro lado, os dois plasmídeos de expressão codificando para o anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> (Exemplo 1A) foram coexpressos com dois plasmídeos de expressão codificando para o anticorpo do tipo selvagem de <ANGPT2> (Exemplo 2A). Supondo-se uma associação estatística das cadeias pesadas do tipo selvagem HC e das cadeias pesadas de troca de CL-CH1, HC**, isto resulta na geração de anticorpo de troca biespecífico e bivalente de CL-CH1 de <IGF-1R-ANGPT2>. Supondo-se que ambos os anticorpos sejam igualmente bem expressos e sem levar em consideração produtos colaterais, isto deve resultar em uma relação de 1:2:1 dos três principais

produtos A) anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R>, B) anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R-ANGPT2>, e C) anticorpo do tipo selvagem de <ANGPT2>. Vários produtos colaterais podem ser esperados. No entanto, por causa da troca apenas de domínios de CL-CH1, a frequência dos produtos colaterais deve ser reduzida em comparação à interseção completa de FAB. Favor observar como o anticorpo do tipo selvagem de <ANGPT2> apresentou produções mais elevadas de expressão transiente do que os anticorpos de troca do tipo selvagem de <IGF-1R> e de CL-CH1 de <IGF-1R>, a relação dos plasmídeos de anticorpo do tipo selvagem de <ANGPT2> e dos plasmídeos de anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> foi deslocada em favor da expressão do anticorpo do tipo selvagem de <ANGPT2>.

Para gerar a mistura dos produtos principais A) anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R>, B) anticorpo de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R> biespecífico, e C) anticorpo do tipo selvagem de <ANGPT2>, os quatro plasmídeos pUC-HC**-IGF-1R e pUC-LC**-IGF-1R e os plasmídeos SB04-pUC-HC-ANGPT2 e SB06-pUC-LC-ANGPT2 foram transientemente cotransfectados nas células HEK293-F em suspensão como descrito acima. O sobrenadante colhido continha uma mistura dos produtos principais A) anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R>, B) anticorpo de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R> biespecífico, e C) anticorpo do tipo selvagem de <ANGPT2>, e é denotado como "mistura de troca de CL-CH1 biespecífica". Os sobrenadantes da cultura celular contendo a mistura de troca de CL-CH1 biespecífica foram colhidos por centrifugação e subsequentemente purificados como descrito acima. Figura 14.

A integridade da mistura de anticorpos foi analisada por SDS-PAGE na presença e na ausência de um agente redutor e subsequente manchamento com azul brilhante de Coomassie, como descrito. SDS-PAGE mostrou que existiam 2 diferentes cadeias pesada e leve presente na preparação, como esperado (gel reduzido). O estado monomérico da mistura de anticorpos foi confirmado por cromatografia analítica de exclusão de tamanho e mostrou que as espécies de anticorpos purificados estavam em um estado monomérico. Amostras caracterizadas foram consideradas para a

análise e caracterização funcional subsequentes das proteínas.

EXEMPLO 3B

DETECÇÃO DO ANTICORPO DE TROCA DE CL-CH1 DE <ANGPT2-IGF-1R> BIESPECÍFICO EM UM ENSAIO CELULAR EM PONTE FACS EM CÉLULAS EXPRESSANDO I24 IGF-1R

A fim de confirmar a presença de anticorpo de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R> biespecífico purificado na mistura de troca de CL-CH1 biespecífica purificada dos produtos principais A) anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R>, B) anticorpo de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R> biespecífico, e C) anticorpo do tipo selvagem de <ANGPT2> da coexpressão transiente descrita no Exemplo 3A, um ensaio em ponte de IGF-1R-ANGPT2 de FACS celular sobre células I24 (células NIH3T3 expressando IGF-1R humano recombinante, Roche) foi realizado. O princípio do ensaio é apresentado na Figura 10. Um anticorpo de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R> biespecífico que esteja presente na mistura de anticorpos purificada, é capaz de ligar-se a IGF-1R nas células I24 e a ANGPT2 simultaneamente; e assim ligará em ponte seus dois antígenos alvo com as duas regiões FAB opostas.

Resumidamente, 5×10^5 I24 células por tubo de FACS foram incubadas com a mistura total de anticorpo purificada e incubadas sobre gelo por 1 hora (mistura de titulação de 160 $\mu\text{g/ml}$). Os <IGF-1R> e <ANGPT2> do tipo selvagem dos anticorpos purificados respectivos foram aplicados às células I24 como controlos. O anticorpo não ligado foi removido por lavagem com 4 ml de PBS gelado (Gibco) + 2% de FCS (Gibco), as células foram centrifugadas (5 minutos em 400 g) e o anticorpo biespecífico ligado foi detectado com 50 μl , 2 $\mu\text{g/ml}$, de ANGPT2 humano (R&D Systems) por 1 hora sobre gelo. Subsequentemente, o ANGPT2 não ligado foi removido por lavagem uma vez ou duas vezes com 4 ml de PBS gelado (Gibco) + 2% de FCS (Gibco), as células foram centrifugadas (5 minutos em 400 g) e o ANGPT2 ligado foi detectado com 50 μl 5 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo de <ANGPT2>mIgG1-Biotina (BAM0981, R&D Systems) por 45 minutos sobre gelo; alternativamente, as células foram incubadas com 50 μl 5 mg/ml de

controle de Isótipo de mIgG1-Biotina (R&D Systems). O anticorpo de detecção não ligado foi removido por lavagem com 4 ml de PBS gelado (Gibco) + 2% de GCS (Gibco), as células foram centrifugadas (5 minutos em 400 g) e o anticorpo de detecção ligado foi detectado com 50 µl 1:400 de conjugado de Estreptavidina-PE (Invitrogen/Zymed) por 45 minutos sobre gelo, protegido da luz. O conjugado não ligado de Estreptavidina-PE foi removido por lavagem com 4 ml de PBS gelado + 2% de FCS. Subsequentemente, as células foram centrifugadas (5 minutos, 400 g), recolocadas em suspensão em 300 a 500 µl de PBS e o conjugado ligado de Estreptavidina-PE foi quantificado em um FACSCalibur [BD (canal FL2, 10.000 células por aquisição). Durante a experiência, os controles de isótipos respectivos foram incluídos para excluir quaisquer eventos de ligação não específicos. Além disso, os <IGF-1R> e <ANGPT2> dos anticorpos de IgG1 bivalentes foram incluídos como controles.

Os resultados na Figura 15 mostram que a incubação com a mistura de cruzamento de anticorpos purificada (anticorpo de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R>) da coexpressão de um anticorpo de cruzamento (anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R>) com anticorpo do tipo selvagem (anticorpo do tipo selvagem de <ANGPT2>) resultou em uma mudança significativa na fluorescência, indicando a presença de um anticorpo de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R> biespecífico funcional que tenha sido capaz de ligar-se a IGF-1R nas células I24 e a ANGPT2 simultaneamente; e assim liga em ponte seus dois antígenos alvo com as duas regiões FAB opostas. Ao contrário disto, os anticorpos de controle respectivos de <IGF-1R> e <Ang-2> não resultaram na alteração na fluorescência no ensaio de ligação em ponte de FACS.

Tomados juntos, estes dados mostram que, pela coexpressão dos respectivos plasmídeos do tipo selvagem e de cruzamento, os anticorpos biespecíficos funcionais podem ser gerados. As produções do anticorpo biespecífico correto podem ser aumentadas forçando-se a heterodimerização correta das cadeias pesadas do tipo selvagem e do cruzamento modificado, por exemplo com o uso da tecnologia saliências-em-orifícios, bem co-

mo da estabilização dissulfeto (Ver o Exemplo 4).

EXEMPLO 4

EXPRESSÃO DE ANTICORPO DE TROCA DE CL-CH1 DE <ANGPT2-IGF-1R> BIVALENTE, BIESPECÍFICO, COM DOMÍNIOS DE CH3 MODIFICADOS (SALIÊNCIAS-EM-ORIFÍCIOS)

Para melhorar ainda a produção do anticorpo de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R> biespecífico, a tecnologia saliências-em-orifícios é aplicada à coexpressão dos anticorpos de troca de CL-CH1 de <ANGPT2> e de <ANGPT2> do tipo selvagem para se obter uma preparação de anticorpos biespecífica homogênea e funcional. Com esta finalidade, o domínio de CH3 no HC* de cadeia* pesada do anticorpo de troca de CL-CH1 de <IGF-1R> é substituído pelo domínio de CH3 (Saliências) da SEQ ID NO: 8 com a troca de T366W e o domínio CH3 na cadeia pesada do anticorpo de <ANGPT2> do tipo selvagem é substituído pelo domínio CH3 (Orifício) da SEQ ID NO: 9 com uma troca de T366S, L368A, Y407V ou vice-versa. Além disso, um dissulfeto pode ser incluído para aumentar a estabilidade e os rendimentos, bem como os resíduos adicionais formando pontes iônicas e aumentando as produções de heterodimerização (EP 1870459 A1).

A coexpressão transiente, e a purificação do anticorpo de troca de CL-CH1 de <ANGPT2-IGF-1R> bivalente, biespecífico resultante com domínios CH3 modificados (saliências-em-orifícios) é realizada como descrito no Exemplo 3.

Deve-se observar que uma otimização da heterodimerização pode ser obtida, por exemplo, mediante o uso de diferentes tecnologias saliências-em-orifícios, tal como a introdução de uma ponte dissulfeto adicional no domínio CH3, por exemplo Y349C na "cadeia de saliências" e D356C na "cadeia orifício" e/ou combinados com o uso dos resíduos R409D; K370E (K409D) para os resíduos saliências e D399K; E357K para os resíduos orifício descritos pela EP 1870459 A1.

Analogamente ao exemplo 4 outros anticorpos de troca CH1-CL bivalentes biespecíficos com domínios de CH3 modificados (saliências-em-orifícios) direcionados contra ANGPT2 e outro antígeno alvo (usando a ca-

- deia pesada e leve de ANGPT2 descrita acima e a cadeia** leve e pesada de troca de CH1-CL HC** e LC** de um anticorpo direcionado contra dito outro alvo, por meio do qual ambas as cadeias pesadas são modificadas "saliências-em-orifícios"), ou direcionados contra IGF-1R e um outro alvo
- 5 (usando a cadeia pesada e leve de um anticorpo direcionado contra dito outro alvo e a cadeia** pesada e leve de troca de CH1-CL de IGF-1R descrita acima HC** e LC**, por meio da qual ambas as cadeias pesadas são modificadas por "saliências-em-orifícios"), podem ser preparados.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo bivalente biespecífico, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo humano recombinante e compreende:

5 a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno; e

b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que um dos domínios constantes CL e um domínio constante CH1 são substituídos um pelo outro.

10 2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que

o domínio de CH3 de uma cadeia pesada e o domínio de CH3 da outra cadeia pesada, cada um, encontram-se em uma interface que compreende uma interface original entre os domínios de CH3 do anticorpo;

15 em que dita interface é alterada para promover a formação do anticorpo bivalente biespecífico, em que a alteração é definida:

a) pela alteração do domínio de CH3 de uma cadeia pesada , de modo que dentro da interface original o domínio de CH3 de uma cadeia pesada se encontra com a interface original do domínio de CH3 da outra cadeia pesada dentro do anticorpo bivalente biespecífico,

20 um resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo um maior volume de cadeia lateral, gerando assim uma protuberância dentro da interface do domínio de CH3 de uma cadeia pesada que é posicionável em uma cavidade dentro da interface do domínio de CH3 da outra cadeia pesada,

25 e

b) pela alteração do domínio de CH3 da outra cadeia pesada, de modo que dentro da interface original do segundo domínio de CH3 que se encontra com a interface original do primeiro domínio de CH3 dentro do anticorpo bivalente biespecífico,

30 um resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo um menor volume de cadeia lateral, gerando assim uma cavidade dentro da interface do segundo domínio de CH3 dentro da qual

uma protuberância dentro da interface do primeiro domínio de CH3 é posicionável.

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o dito resíduo de aminoácido tendo um maior volume de cadeia lateral é selecionado do grupo consistindo em arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptofano (W).

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o dito resíduo de aminoácido tendo um menor volume de cadeia lateral é selecionado do grupo consistindo em alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

5. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizado pelo fato de que ambos os domínios de CH3 são ainda alterados pela introdução de cisteína (C) como aminoácido nas posições correspondentes de cada domínio de CH3.

6. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um dos domínios constantes de cadeia pesada CH3 de ambas as cadeias pesada é substituído por um domínio constante de cadeia pesada CH1; e o outro domínio constante de cadeia pesada CH3 é substituído por um domínio constante de cadeia leve CL.

7. Método para a preparação de um anticorpo bivalente biespecífico, como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) transformar uma célula hospedeira com
- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno,

- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno, em que um dos domínios constantes CL e um domínio constante CH1 são substituídos um pelo outro,

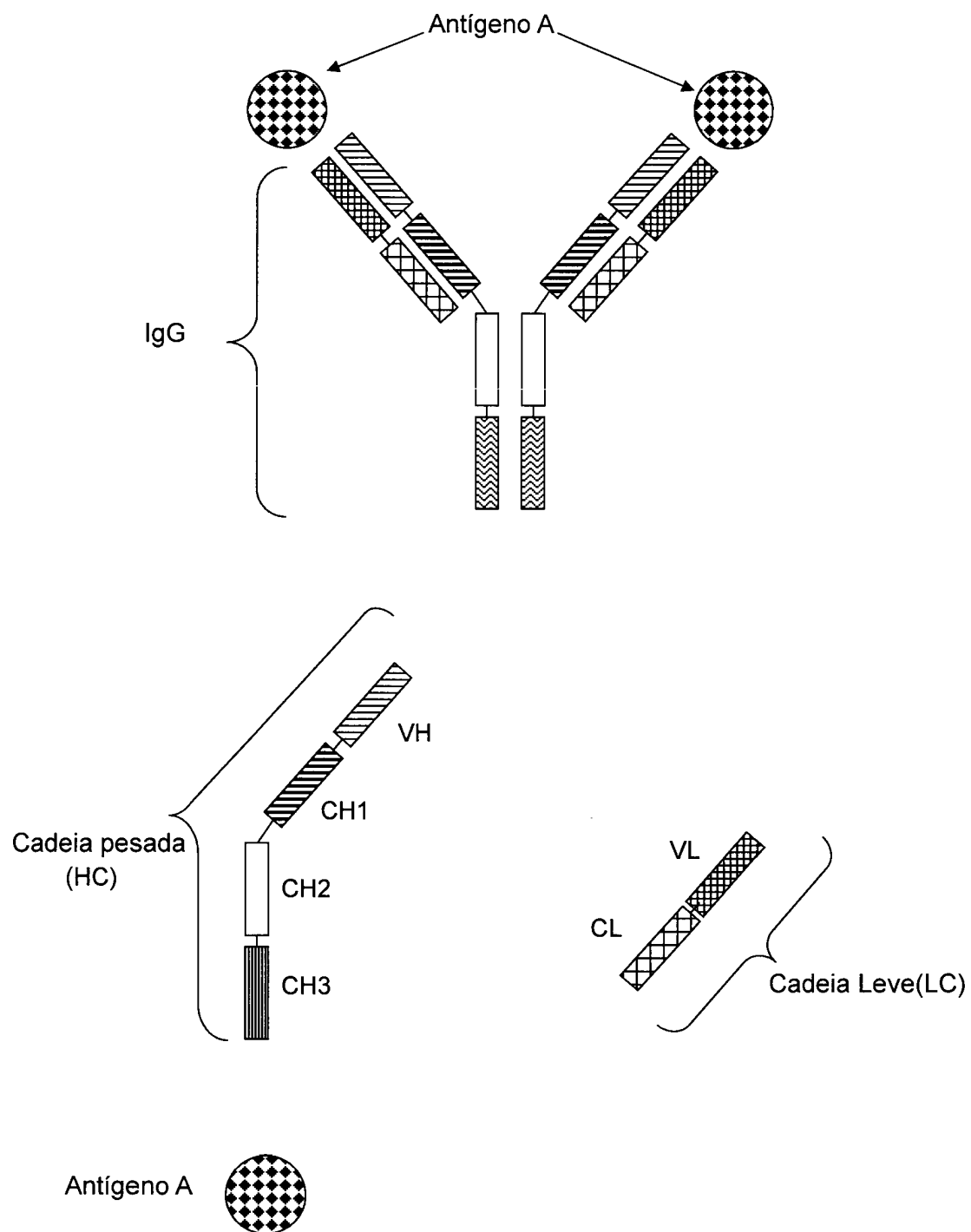
b) cultivar a célula hospedeira sob condições que permitam a síntese da referida molécula de anticorpo; e

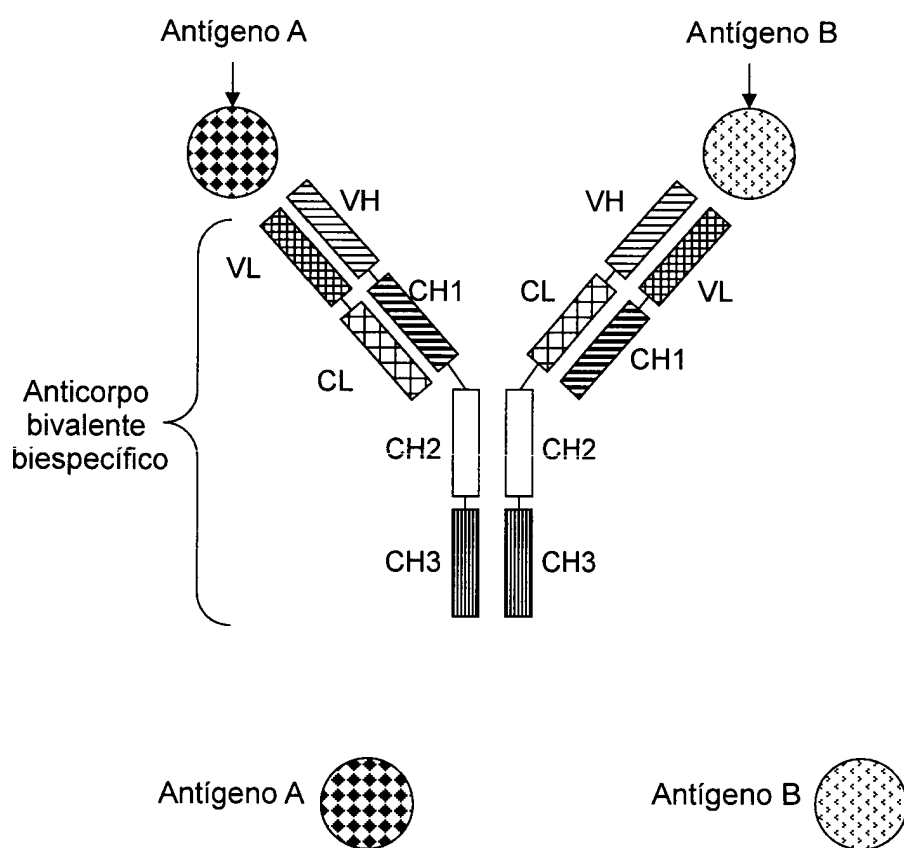
c) recuperar dita molécula de anticorpo de dita cultura.

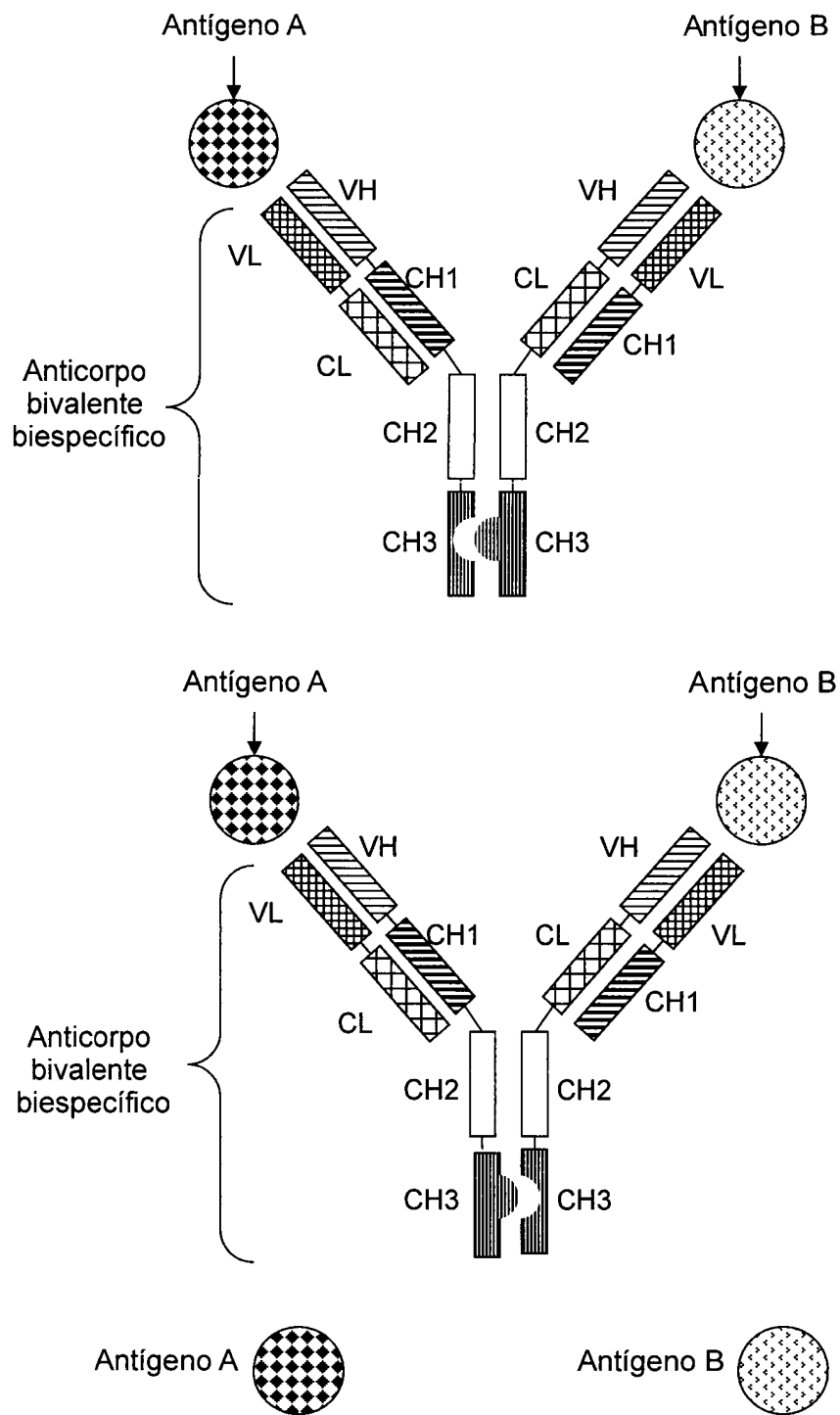
8. Composição, caracterizada pelo fato de ser do anticorpo bivalente biespecífico, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

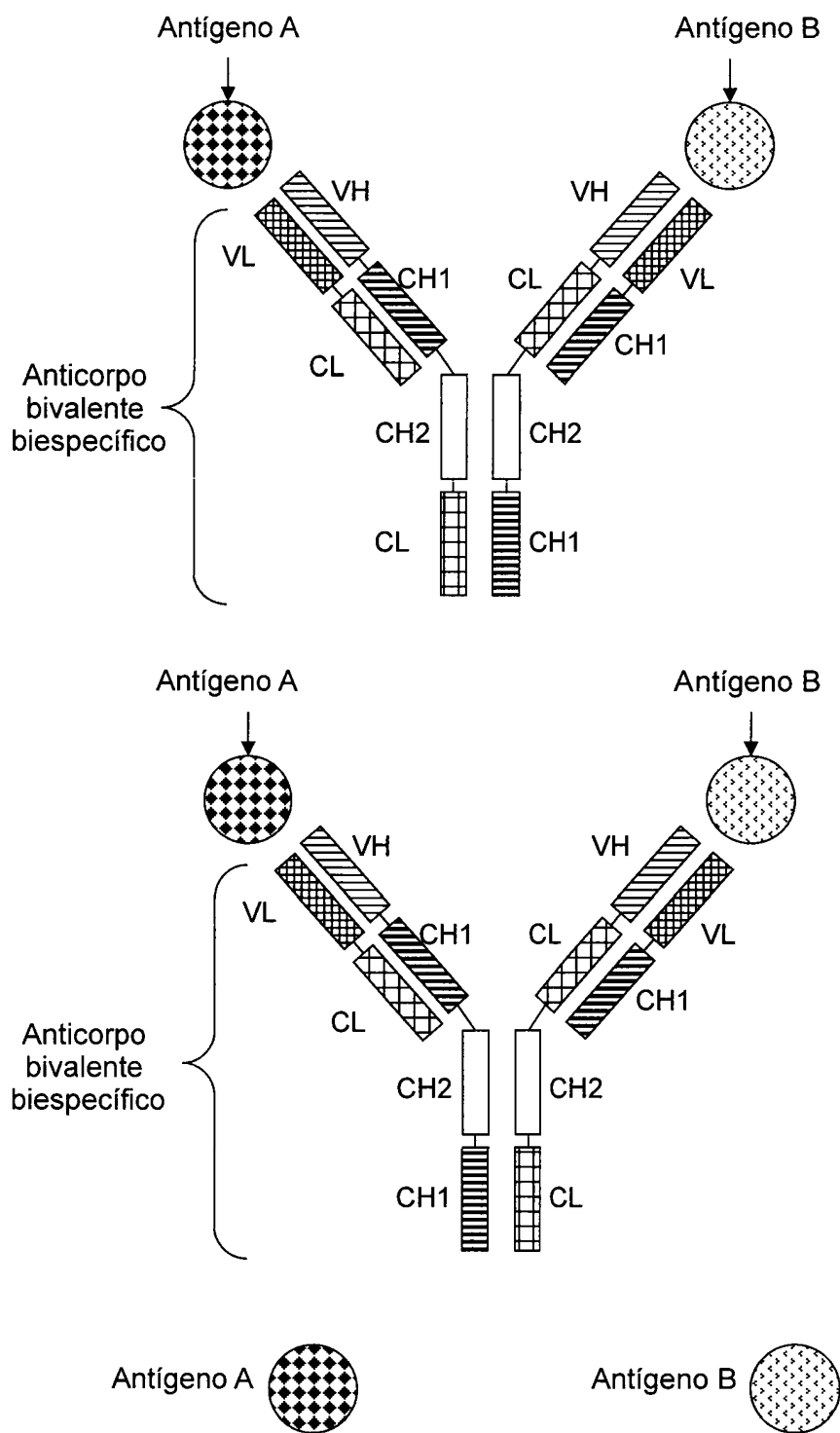
5 9. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo bivalente biespecífico, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Fig. 1



**Fig. 2**

**Fig. 3**

**Fig. 4**

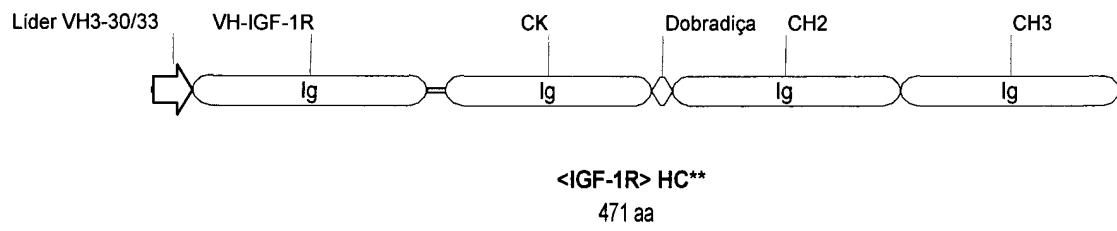


Fig. 5

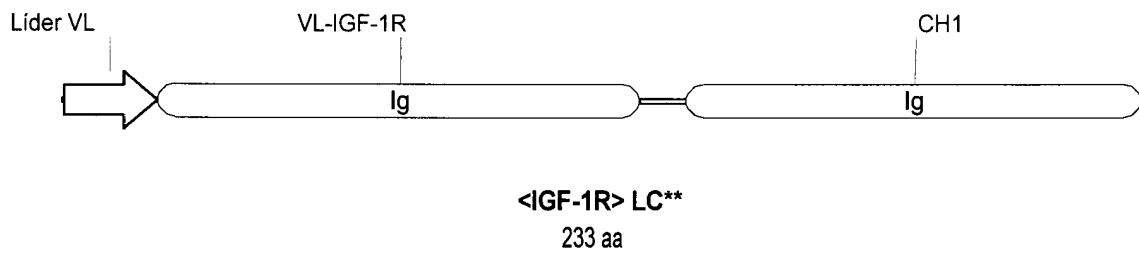


Fig. 6

6/10

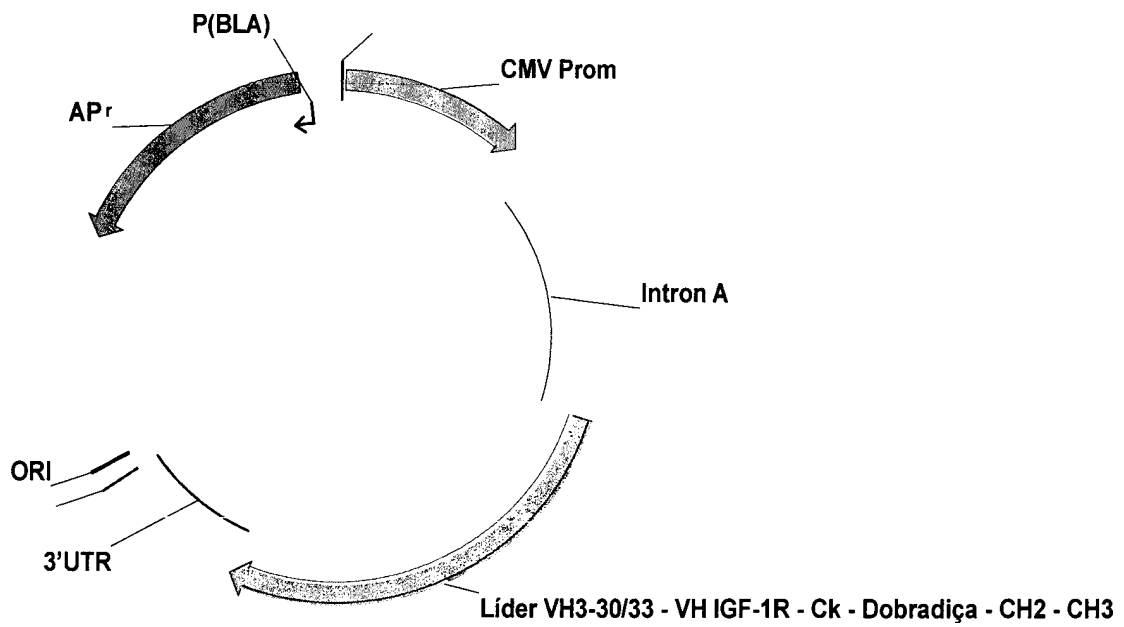


Fig. 7

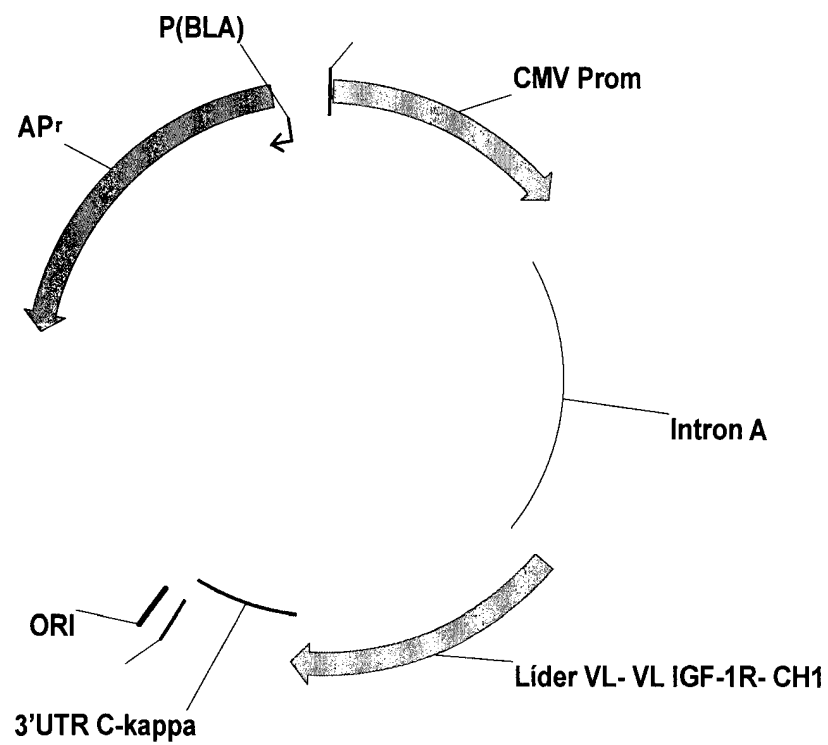


Fig. 8

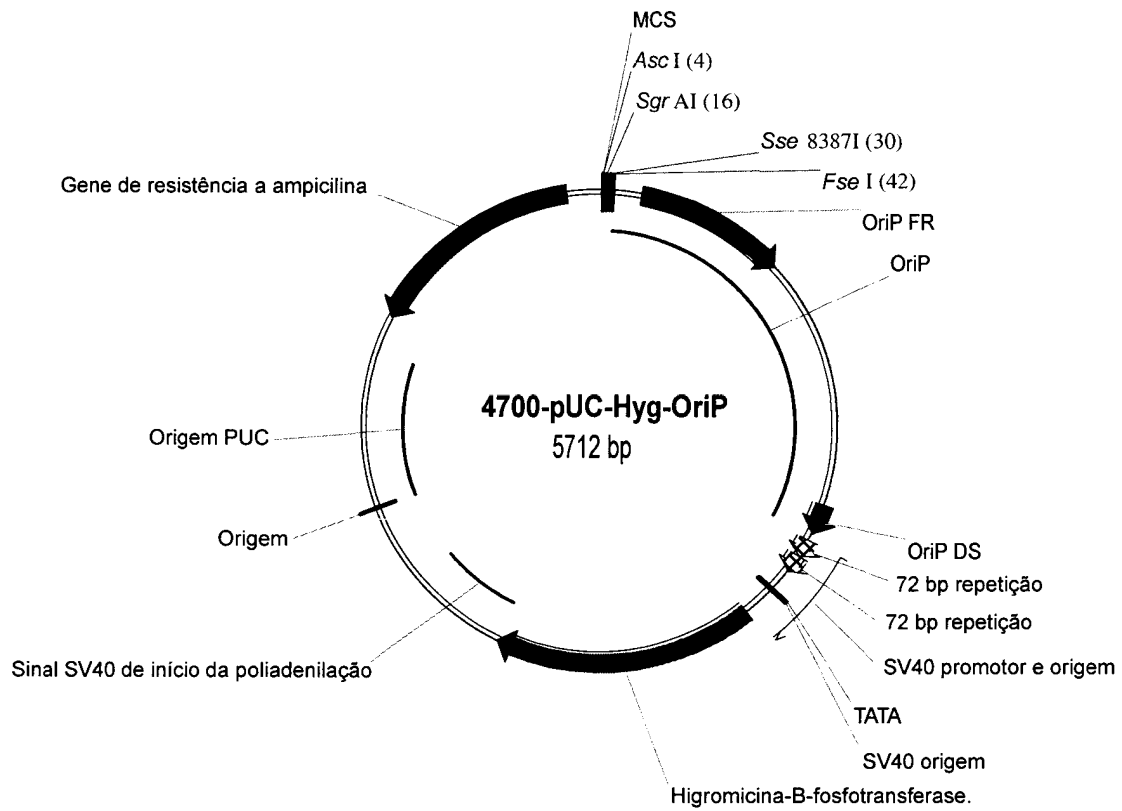


Fig. 9

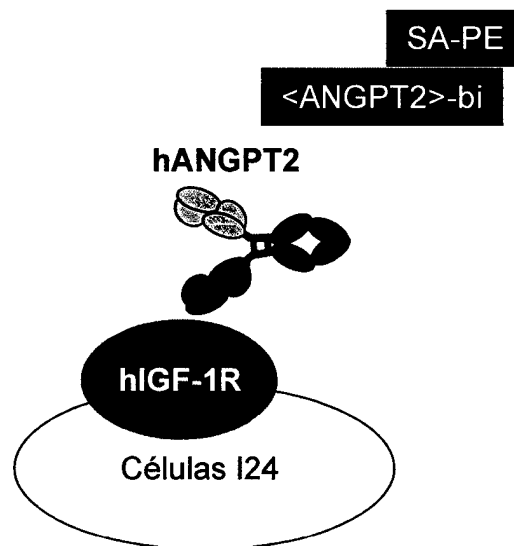


Fig. 10

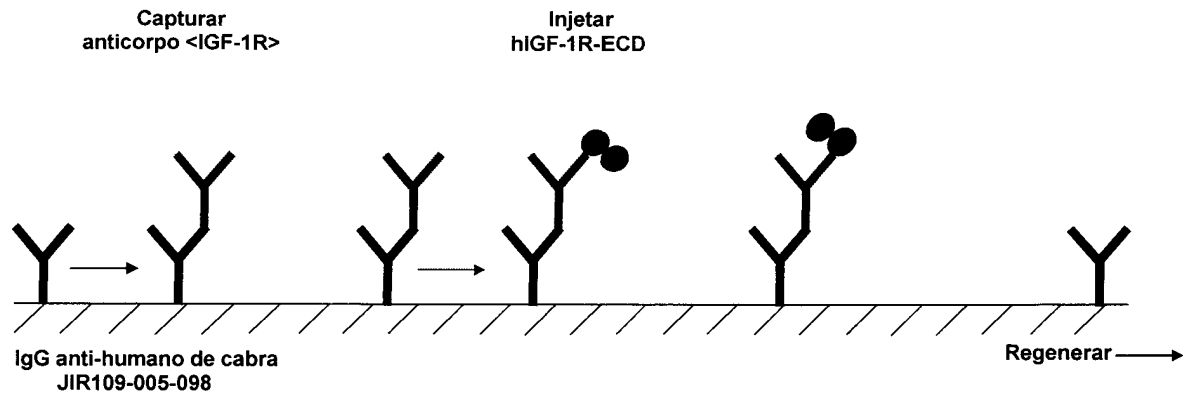


Fig. 11

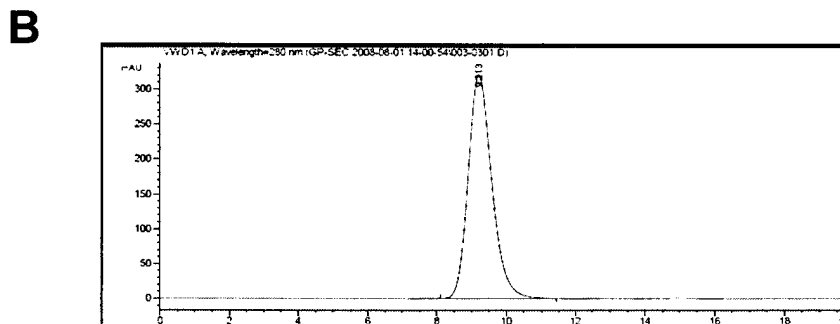
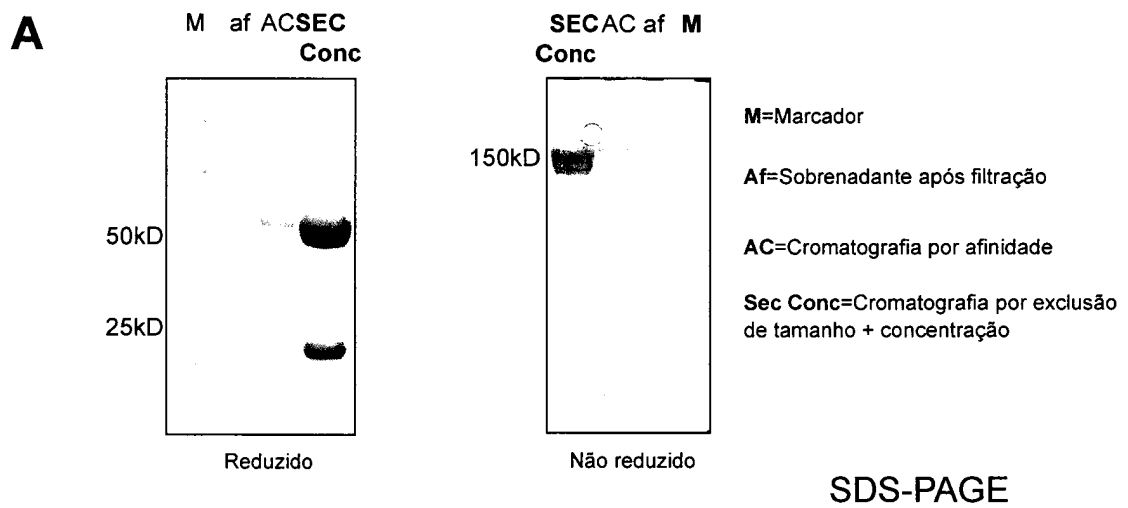
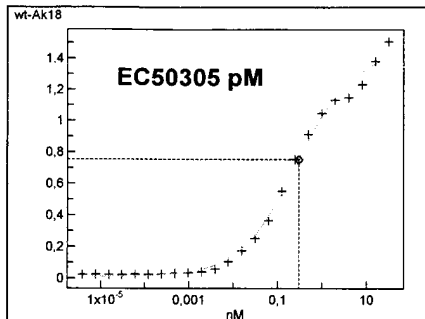
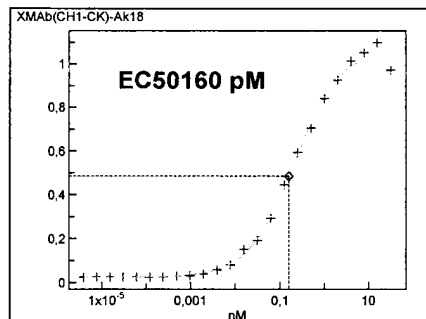


Fig. 12



Ligação de anticorpo de <IGF-1R>
tipo silvestre ao IGF-1R-ECD



Ligação de anticorpo de troca de
CL-CH1 de <IGF-1R> ao IGF-1R-ECD

Fig. 13

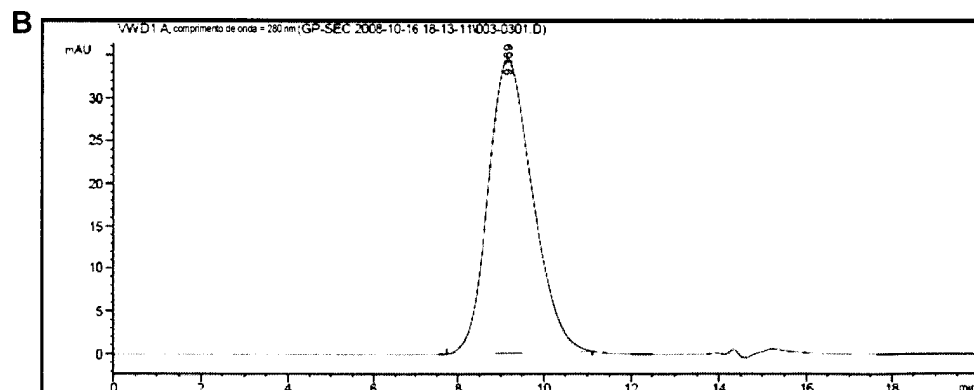
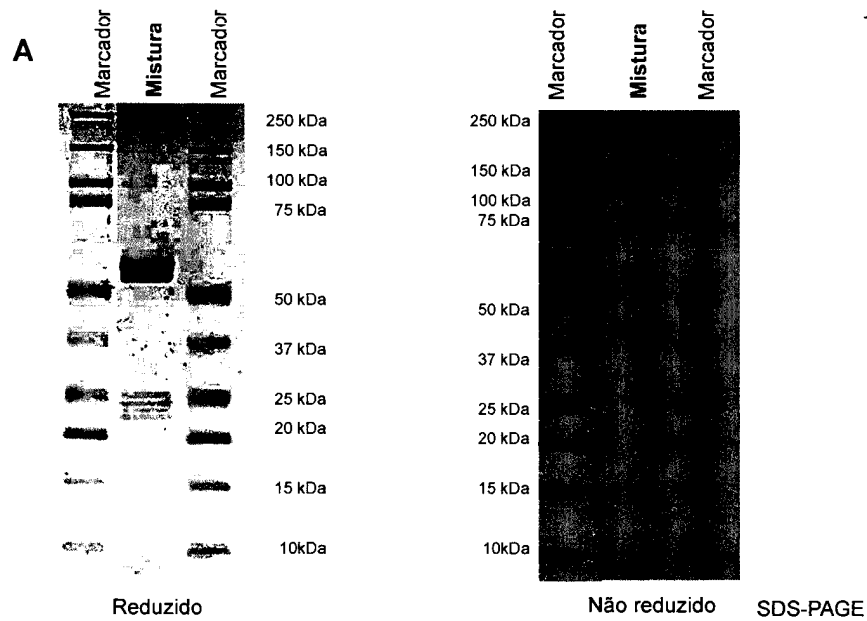


Fig. 14

10/10

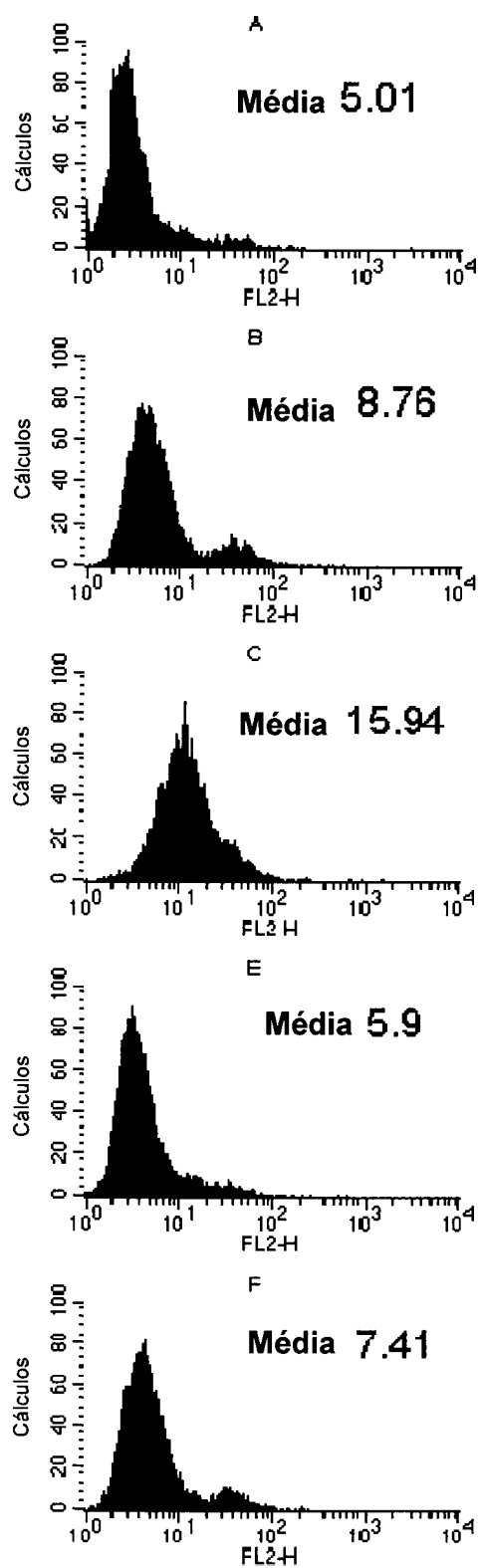


Fig. 15