



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

(11) PI 0719953-8 B1



(22) Data do Depósito: 02/10/2007

(45) Data de Concessão: 24/04/2019

(54) Título: ANTICORPOS HUMANOS DE ALTA AFINIDADE PARA RECEPTOR DE IL-4 HUMANO

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; C12N 15/13; C12N 5/12; A61K 39/395; A61P 37/00.

(30) Prioridade Unionista: 02/10/2006 US 60/848,694; 24/08/2007 US 60/957,738.

(73) Titular(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): SEAN STEVENS; TAMMY T. HUANG; JOEL H. MARTIN; JEANETTE L. FAIRHURST; ASHIQUE RAFIQUE; MARCELA TORRES; KEVIN J. POBURSKY; RAYMOND W. LEIDICH; JOAN A. WINDSOR; WARREN R. MIKULKA; DIANA M. AHRENS; ERGANG SHI; NICHOLAS J. PAPADOPOULOS.

(86) Pedido PCT: PCT US2007021210 de 02/10/2007

(87) Publicação PCT: WO 2008/054606 de 08/05/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/04/2009

(57) Resumo: ANTICORPOS HUMANOS DE ALTA AFINIDADE PARA RECEPTOR DE IL-4 HUMANO A presente invenção refere-se a um anticorpo humano isolado ou fragmento de anticorpo do mesmo que liga ao receptor de interleucina-4 humano alfa (hIL-4Ra) com uma constante de afinidade (K_D) de menos de 200 pM, quando medida por ressonância de plasmon de superfície.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANTICORPOS HUMANOS DE ALTA AFINIDADE PARA RECEPTOR DE IL-4 HUMANO"**.

Antecedentes

5 Interleucina-4 (IL-4, também conhecida como fator estimulante de células B ou BSF-1) foi originalmente caracterizada por sua habilidade para estimular a proliferação de células B em resposta às baixas concentrações de anticorpos direcionados para imunoglobulina de superfície. IL-4 foi mostrada possuir um espectro vasto de atividades biológicas, incluindo estimulação de crescimento de células T, mastócitos, granulócitos, megacariócitos e eritrócitos. IL-4 induz a expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal da classe II em células B em repouso, e intensifica a secreção dos isotipos de IgE e IgG1 através de células B estimuladas.

15 As atividades biológicas de IL-4 são mediadas por receptores específicos de superfície celular para IL-4. Receptor alfa de IL-4 humano (hIL-4R) (SEQ ID NO: 1) é descrito, por exemplo, na patente U.S. Nº 5.599.905, 5.767.065, e 5.840.869. Anticorpos para hIL-4R são descritos na patente U.S. Nº 5.717.072.

20 As atividades biológicas de IL-4 são mediadas por receptores específicos de superfície celular para IL-4. Receptor alfa de IL-4 humano (hIL-4R) (SEQ ID NO: 1) é descrito, por exemplo, na patente U.S. Nº 5.599.905, 5.767.065, e 5.840.869. Anticorpos para hIL-4R são descritos na patente U.S. Nº 5.717.072 e 7.186.809.

25 Métodos para produzir anticorpos úteis como terapêuticas humanas incluem gerar anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados (vide, por exemplo, US 6.949.245). Vide, por exemplo, WO 94/02602 (Abgenix) e US 6.596.541 (Regeneron Pharmaceuticals) (ambas destas publicações são aqui especificamente incorporadas por referência) descrevendo métodos de gerar camundongos transgênicos não-humanos capazes de produzir anticorpos humanos.

30 Métodos para usar anticorpos para hIL-4R são descritos nas patentes U.S. Nºs 5.714.146; 5.985.280; e 6.716.587.

Breve Sumário da Invenção

Em um primeiro aspecto, a invenção fornece anticorpos humanos, preferivelmente anticorpos humanos recombinantes que especificamente ligam o receptor de interleucina-4 humano (hIL-4R). Os anticorpos humanos são caracterizados ligando a hIL-4R com alta afinidade e pela habilidade para neutralizar a atividade de hIL-4. Em modalidades específicas, os anticorpos humanos são capazes de bloquear o complexo de hIL-13/hIL-13R1 ligando a hIL-4R e desse modo inibem sinalização por hIL-13. Os anticorpos podem ser de comprimento total (por exemplo, um anticorpo de IgG1 ou IgG4) ou podem compreender apenas uma porção de ligação de antígeno (por exemplo, um fragmento Fab, F(ab')₂ ou scFv), e podem ser modificados para afetar a funcionalidade, por exemplo, eliminar as funções efetoras residuais (Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925-1933).

Em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo, que especificamente liga hIL-4R (SEQ ID NO: 1) com uma K_D de cerca de 200 pM ou menos, quando medida por ressonância de plasmon de superfície. Em uma modalidade mais específica, o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo exibe uma K_D de menos que cerca de 150 pM, ou menos que cerca de 50 pM, ou menos que cerca de 20 pM. Em várias modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno bloqueia a atividade de hIL-4 com uma IC₅₀ de cerca de 200 pM ou menos, quando medida por bioensaio de STAT6 luciferase. Em modalidades mais específicas, o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno exibe uma IC₅₀ de cerca de 150 pM ou menos, ou cerca de 100 pM ou menos, ou até mesmo cerca de 50 pM ou menos quando medida por bioensaio de luciferase. Em várias modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno bloqueia a atividade de hIL-13 com uma IC₅₀ de cerca de 100 pM ou menos, quando medida por bioensaio de STAT6 luciferase. Em modalidades mais específicas, o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno exibe uma IC₅₀ de cerca de 75 pM ou menos, ou cerca de 50 pM ou menos, ou até mesmo cerca de 20 pM ou menos.

Em um segundo aspecto, o anticorpo da invenção compreende

uma região variável de cadeia pesada (HCVR) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291, 307, 323, 339, 355, 371, 387, 391, 395, 399, 403, 407, 411, 415, 419, 423, 427, 431, 435, 439, 443, 447, 451, 455, 5 459, 463, 467, 471, 475, 479, 483, 487, 491, 495, 499, 503, 507, 511, 515, 519, 523, 527, 531, 535, 539, 543, 547, 551, 555, 559, 563, 567, 571, 575, 579 e 581, ou uma sequência substancialmente similar das mesmas.

Em um terceiro aspecto, o anticorpo da invenção compreende uma região variável de cadeia leve (LCVR) selecionada do grupo que 10 consiste em SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 130, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299, 315, 331, 347, 363, 379, 389, 393, 397, 401, 405, 409, 413, 417, 421, 425, 429, 433, 437, 441, 445, 449, 453, 457, 461, 465, 469, 473, 477, 481, 485, 489, 493, 497, 501, 505, 509, 513, 517, 521, 625, 529, 533, 537, 541, 545, 549, 553, 557, 561, 565, 569, 573, e 15 577, ou uma sequência substancialmente similar das mesmas.

Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção compreende uma HCVR e uma LCVR (HCVR/LCVR) selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NO: 3/11, 19/27, 35/43, 51/59, 67/75, 83/91, 99/107, 115/123, 131/139, 147/155, 163/171, 179/187, 195/203, 20 211/219, 227/235, 243/251, 259/267, 275/283, 291/299, 307/315, 323/331, 339/347, 355/363, 371/379, 387/389, 391/393, 395/397, 399/401, 403/405, 407/409, 411/413, 415/417, 419/421, 423/425, 427/429, 431/433, 435/437, 439/441, 443/445, 447/449, 451/453, 455/457, 459/461, 463/465, 467/469, 471/473, 475/477, 479/481, 483/485, 487/489, 491/493, 495/497, 499/501, 25 503/505, 507/509, 511/513, 515/517, 519/521, 523/525, 527/529, 531/533, 535/537, 539/541, 543/545, 547/549, 551/553, 555/557, 559/561, 563/565, 567/569, 571/573, 575/577, 579/59 e 581/59. Em uma modalidade preferida, o anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende HCVR/LCVR selecionadas de SEQ ID NO: 51/59, 259/267, 275/283, 291/299, 579/59 ou 30 581/59.

Em um quarto aspecto, a invenção fornece moléculas de ácido nucleico que codificam uma HCVR, em que a molécula de ácido nucleico é

uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 390, 394, 398, 402, 406, 410, 414, 418, 422, 426, 430, 434, 438, 442, 446, 450, 454, 458, 462, 466, 470, 474, 478, 482, 486, 490, 494, 498, 502, 506, 510, 514, 518, 522, 526, 530, 534, 538, 542, 546, 550, 554, 558, 562, 566, 570, 574, 578 e 580, ou uma sequência substancialmente idêntica tendo pelo menos 95% de homologia das mesmas.

Em um quinto aspecto, a invenção fornece moléculas de ácido nucleico que codificam uma LCVR, em que a molécula de ácido nucleico é uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 129, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 388, 392, 396, 400, 404, 408, 412, 416, 420, 424, 428, 432, 436, 440, 444, 448, 452, 456, 460, 464, 468, 472, 476, 480, 484, 488, 492, 496, 500, 504, 508, 512, 516, 520, 524, 528, 532, 536, 540, 544, 548, 552, 556, 560, 564, 568, 572, e 576, ou uma sequência substancialmente idêntica tendo pelo menos 95% de homologia das mesmas.

Em uma modalidade, o anticorpo da invenção compreende uma HCVR e LCVR codificadas por uns pares de sequência de nucleotídeo selecionados do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/388, 390/392, 394/396, 398/400, 402/404, 406/408, 410/412, 414/416, 418/420, 422/424, 426/428, 430/432, 434/436, 438/440, 442/444, 446/448, 450/452, 454/456, 458/460, 462/464, 466/468, 470/472, 474/476, 478/480, 482/484, 486/488, 490/492, 494/496, 498/500, 502/504, 506/508, 510/512, 514/516, 518/520, 522/524, 526/528, 530/532, 534/536, 538/540, 542/544, 546/548, 550/552, 554/556, 558/560, 562/564, 566/568, 570/572, 574/576, 578/59 e 580/59. Em uma modalidade preferida, o anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende HCVR/LCVR codificadas por sequências de nucleotídeo selecionadas de SEQ ID NO:

50/58, 258/266, 274/282, 290/298, 578/58 ou 580/58.

Em um sexto aspecto, a invenção caracteriza um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo que especificamente liga hIL-4R, compreendendo três regiões de determinação de complementarida-

5 de de cadeia pesada e três de cadeia leve (CDR), em que

a CDR1 de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido da fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO: 582), em que $X^1 = \text{Gly}$; $X^2 = \text{Tyr}$ ou Phe ; $X^3 = \text{Thr}$ ou I ; $X^4 = \text{Phe}$; $X^5 = \text{Asn}$ ou Arg ; $X^6 = \text{Ser}$; $X^7 = \text{Tyr}$; e $X^8 = \text{Gly}$;

10 a CDR2 de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido da fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO: 583), em que $X^1 = \text{Ile}$, $X^2 = \text{Ser}$ ou Arg , $X^3 = \text{Thr}$ ou Tyr , $X^4 = \text{Tyr}$ ou Asp , $X^5 = \text{Asn}$ ou Gly , $X^6 = \text{Gly}$ ou Ser , $X^7 = \text{Lys}$ ou Asn , e $X^8 = \text{Thr}$;

a CDR3 de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido da fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17} - X^{18} - X^{19} - X^{20} - X^{21}$ (SEQ ID NO: 584) em que $X^1 = \text{Ala}$ ou Val , $X^2 = \text{Arg}$ ou Lys , $X^3 = \text{Asp}$ ou Glu , $X^4 = \text{Gly}$ ou Glu , $X^5 = \text{Ala}$ ou Arg , $X^6 = \text{Arg}$ ou Ser , $X^7 = \text{Ile}$ ou Gly , $X^8 = \text{Val}$ ou Ser , $X^9 = \text{Val}$ ou Trp , $X^{10} = \text{Ala}$ ou Phe , $X^{11} = \text{Gly}$ ou Asp , $X^{12} = \text{Thr}$ ou Pro , $X^{13} = \text{Thr}$ ou ausente, $X^{14} = \text{Pro}$ ou ausente, $X^{15} = \text{Tyr}$ ou ausente, $X^{16} = \text{Tyr}$ ou ausente, $X^{17} = \text{Tyr}$ ou ausente, $X^{18} = \text{Gly}$ ou ausente, $X^{19} = \text{Met}$ ou ausente, $X^{20} = \text{Asp}$ ou ausente, e $X^{21} = \text{Val}$ ou ausente;

a CDR1 de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido da fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6$ (SEQ ID NO: 585) em que $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Asp}$ ou Ala , $X^3 = \text{Ile}$, $X^4 = \text{Ser}$ ou Asn , $X^5 = \text{Asn}$ ou Ile , e $X^6 = \text{Trp}$ ou Phe ;

a CDR2 de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido da fórmula $X^1 - X^2 - X^3$ (SEQ ID NO: 586) em que $X^1 = \text{Ala}$ ou Val , $X^2 = \text{Ala}$ ou Thr , e $X^3 = \text{Ser}$; e

30 a CDR3 de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido da fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9$ (SEQ ID NO: 587) em que $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Gln}$, $X^3 = \text{Ala}$ ou Tyr , $X^4 = \text{Asn}$, $X^5 = \text{Ser}$, $X^6 = \text{Phe}$ ou His ,

$X^7 = \text{Pro}$, $X^8 = \text{Ile}$ ou Trp , e $X^9 = \text{Thr}$.

Em um sétimo aspecto, a invenção fornece um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno que compreende uma CDR3 de cadeia pesada e uma CDR3 de cadeia leve, em que o domínio de CDR3 de cadeia pesada selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297, 313, 329, 345, 361 e 377; e o domínio de CDR3 de cadeia leve selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289, 305, 321, 337, 353, 369 e 385.

10 Em uma modalidade preferida, as CDR3s de cadeia pesada e de cadeia leve são selecionadas dos pares de sequência SEQ ID NO: 57 e 65; 265 e 273; 281 e 289; e 297 e 305.

Em uma outra modalidade, a invenção caracteriza um anticorpo humano ou fragmento de anticorpo que compreende um domínio de CDR1 de cadeia pesada selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293, 309, 325, 341, 357 e 373, ou uma sequência substancialmente similar das mesmas; um domínio de CDR2 de cadeia pesada selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295, 311, 327, 343, 359 e 375, ou uma sequência substancialmente similar das mesmas; um domínio de CDR3 de cadeia pesada selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297, 313, 329, 345, 361 e 377, ou uma sequência substancialmente similar das mesmas; um domínio de CDR1 de cadeia leve selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, 285, 301, 317, 333, 349, 365 e 381, ou uma sequência substancialmente similar das mesmas; um domínio de CDR2 de cadeia leve selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303, 319, 335, 351, 367 e 383, ou uma sequência substancialmente similar das mesmas; e um domínio de CDR3 de cadeia leve selecionado do grupo que

consiste em SEQ ID NO: 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289, 305, 321, 337, 353, 369 e 385, ou umas sequências substancialmente similares das mesmas. Em uma modalidade

- 5 CDRs de cadeia pesada SEQ ID NO: 53, 55, 57 e CDRs de cadeia leve SEQ ID NO: 61, 63, 65; CDRs de cadeia pesada SEQ ID NO: 261, 263, 265 e CDRs de cadeia leve SEQ ID NO: 269, 271, 273; CDRs de cadeia pesada SEQ ID NO: 277, 279, 281 e CDRs de cadeia leve SEQ ID NO: 285, 287, 289; e CDRs de cadeia pesada SEQ ID NO: 293, 295, 297 e CDRs de cadeia leve SEQ ID NO: 301, 303, 305.

Em um oitavo aspecto, a invenção fornece um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo três CDRs de uma HCVR e três CDRs de uma LCVR, em que HCVR/LCVR são selecionadas do grupo que consiste em 51/59, 579/59, 581/59, 259/267, 275/283, e 291/299.

- 15 Em uma modalidade, a invenção caracteriza um anticorpo humano ou fragmento de anticorpo que compreende uma CDR3 de cadeia pesada e uma de cadeia leve, em que a CDR3 de cadeia pesada é codificada por uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360 e 376; e uma CDR3 de cadeia leve é codificada por uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368 e 384.

- 25 Em uma outra modalidade, a invenção caracteriza um anticorpo humano ou fragmento de anticorpo que compreende um domínio de CDR1 de cadeia pesada codificado por uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356 e 372, ou uma sequência substancialmente idêntica tendo pelo menos 95% de homologia das mesmas; um domínio de CDR2 de cadeia pesada codificado por uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214,
- 30

230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358 e 374, ou uma sequência substancialmente idêntica tendo pelo menos 95% de homologia das mesmas; um domínio de CDR3 de cadeia pesada codificado por uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360 e 376, ou uma sequência substancialmente similar tendo pelo menos 95% de homologia das mesmas; um domínio de CDR1 de cadeia leve codificado por uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, e 380, ou uma sequência substancialmente similar tendo pelo menos 95% de homologia das mesmas; um domínio de CDR2 de cadeia leve codificado por uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366 e 382, ou uma sequência substancialmente similar tendo pelo menos 95% de homologia das mesmas; e um domínio de CDR3 de cadeia leve codificado por uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368 e 384, ou uma sequência substancialmente similar tendo pelo menos 95% de homologia das mesmas. Em uma modalidade preferida, o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreende CDRs de cadeia pesada codificadas por sequências de nucleotídeo SEQ ID NO: 52, 54, 56 e CDRs de cadeia leve codificadas por sequências de nucleotídeo SEQ ID NO: 60, 62, 64; CDRs de cadeia pesada codificadas por sequências de nucleotídeo SEQ ID NO: 260, 262, 264 e CDRs de cadeia leve codificadas por sequências de nucleotídeo SEQ ID NO: 268, 270, 272; CDRs de cadeia pesada codificadas por sequências de nucleotídeo SEQ ID NO: 276, 278, 280 e CDRs de cadeia leve codificadas por sequências de nucleotídeo SEQ ID NO: 284, 286, 288; e CDRs de cadeia pesada codificadas por sequências de nucleotídeo SEQ ID NO: 292, 294, 296 e CDRs de cadeia leve codificadas por sequências de nucleotídeo SEQ ID NO: 300, 302, 304.

A invenção abrange anticorpos de anti-hIL-4R tendo um padrão de glicosilação modificado. Em algumas aplicações, a modificação para remover os sítios de glicosilação indesejáveis pode ser útil, ou um anticorpo desprovido da metade de fucose presente na cadeia de oligossacarídeo, por exemplo, para aumentar a função de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (vide Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Em outras aplicações, a modificação de uma galactosilação pode ser feita para modificar o citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

Em um nono aspecto, a invenção fornece vetores de expressão recombinantes carregando as moléculas de ácido nucleico da invenção, e células hospedeiras às quais tais vetores foram incluídos, como também métodos de fazer os anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno da invenção obtidos cultivando as células hospedeiras da invenção. A célula hospedeira pode ser uma célula procariótica ou eucariótica, preferivelmente a célula hospedeira é uma célula de *E. coli* ou uma célula mamífera, tal como uma célula CHO.

Em um décimo aspecto, a invenção caracteriza uma composição compreendendo um anticorpo humano recombinante que especificamente liga hIL-4R e um veículo aceitável.

Em um décimo primeiro aspecto, a invenção caracteriza métodos para inibir atividade de hIL-4 usando um anticorpo, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, da invenção. Em modalidades específicas, os anticorpos da invenção também bloqueiam complexo de hIL-13/hIL-13R1 ligando a hIL-4R. Em uma modalidade, o método compreende contatar hIL-4R com o anticorpo da invenção, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de modo que atividade de hIL-4 ou hIL-4/hIL-13 é inibida. Em outra modalidade, o método compreende administrar um anticorpo da invenção, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, para um sujeito humano sofrendo de um distúrbio que é melhorado mediante inibição da atividade de hIL-4 ou de hIL-4/hIL-13. O distúrbio tratado é qualquer doença ou condição que é melhorada, amenizada, inibida ou impedida por remoção, inibição ou redução da atividade de hIL-4 ou hIL-4/hIL-13.

Também abrangido pela invenção é o uso de um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 na fabricação de um medicamento para o uso para atenuar ou inibir uma doença ou distúrbio mediado por IL-4 em um ser humano.

Distúrbios mediados ou relacionados com IL-4, que são tratados pelos anticorpos ou fragmentos de anticorpo da invenção, incluem, por exemplo, artrite (incluindo artrite séptica), herpetiforme, urticária idiopática crônica, escleroderma, cicatrização hipertrófica, doença de Whipple, hiperplasia prostática benigna, distúrbios pulmonares, tais como asma branda, moderada ou severa, distúrbios inflamatórios tais como doença inflamatória do intestino, reações alérgicas, doença de Kawasaki, falcemia, síndrome de Churg-Strauss, doença de Grave, pré-eclampsia, síndrome de Sjogren, síndrome linfoproliferativa autoimune, anemia hemolítica autoimune, esôfago de Barrett, uveíte autoimune, tuberculose, e nefrose.

Outros objetivos e vantagens ficarão evidentes a partir de uma revisão da descrição detalhada seguinte.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1(A-C). Avaliação do perfil de ligação de anticorpo gerado com ensaios de ligação sequencial com base em OCTET®. A figura 1(A) é um gráfico de barras que mostra os resultados obtidos quando o primeiro anticorpo exposto ao antígeno ligado for o anticorpo de controle. Figura 1 (B) o primeiro anticorpo exposto ao antígeno ligado for VAB16F3-1. Figura 1 (C) o primeiro anticorpo exposto ao antígeno ligado for VAK5H4-4. Segundo anticorpo: 1 = controle; 2 = VX4E7-9; 3 = VX3F7-6; 4 = VAB16G-1; 5 = VAB16F3-1; 6 = VAB15C8-17; 7 = VAB11G8-1; 8 = VAB10C1-5; 9 = VAB10G8-19; 10 = VAB8G10-1; 11 = VAB7B9-3; 12 = VAB6C10-14; 13 = VAB5C5-11; 14 = VAB3B4-10; 15 = VAB4D5-3; 16 = VAB1H1-2; 17 = VAK5H4-4; 18 = VAK7G8-5; 19 = VAK8G11-13; 20 = VAK9C6-11; 21 = VAK10G6-7; 22 = VAK11D4-1; 23 = VAK12B11-9; e 24 = VAK10G12-5. Barras vazias mostram o nível de ligação do primeiro anticorpo, barras cheias mostram a ligação adicional por um segundo anticorpo.

Descrição Detalhada

Antes de os métodos presentes serem descritos, é para ser entendido que esta invenção não é limitada aos métodos particulares, e condições experimentais descritas, tais como métodos e condições, podem variar.

- 5 É também para ser entendido que a terminologia aqui usada é para o propósito de descrever as modalidades particulares apenas, e não é intencionada ser limitativa, uma vez que o escopo da presente invenção será limitado apenas pelas reivindicações em anexo.

10 A menos que do contrário definido, todos termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado que comumente entendido por alguém de habilidade usual na técnica ao qual esta invenção pertence. Embora qualquer método e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são agora descritos. DEFINIÇÕES

- 15 O termo "IL4R humano" (hIL-4R), como aqui usado, é intencionado referir-se a um receptor de citocina humano que especificamente liga interleucina-4 (IL-4), IL-4R α (SEQ ID NO: 1). O termo "interleucina-13 humana" (hIL-13) refere-se a uma citocina que especificamente liga o receptor de IL-13, e o "complexo de hIL-13/hIL-13R1" refere-se ao complexo formado por hIL-13 ligando ao complexo de hIL-13R1, cujo complexo liga o receptor de hIL-4 para iniciar a atividade biológica.

- 20 O termo "anticorpo", como aqui usado, é intencionado a referir-se às moléculas de imunoglobulina compreendendo quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto. Cada cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como HCVR ou V) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada compreende três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui como LCVR ou VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve compreende um domínio (CL1). As regiões de VH e VL podem ser também subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões de determina-
- 25
- 30

ção de complementaridade (CDR), entremeadas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de estrutura (FR). Cada VH e VL é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas do término amino ao termino carbóxi na ordem a seguir: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

5 O termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo" ou "fragmento de anticorpo"), como aqui usado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a habilidade para especificamente ligar a um antígeno (por exemplo, hIL-4R). Foi

10 mostrado que a função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser executada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos dentro do termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL1 e CH1; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos F(ab)' ligados por uma ligação em ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um

15 fragmento Fd que consiste nos domínios de VH e de CH1; (iv) um fragmento de Fv que consiste nos domínios de VL e de VH de um braço simples de um anticorpo, (v) um fragmento de dAb (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546) que consiste em um domínio de VH; e (vi) uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR). Além disso, embora os dois domínios do

20 fragmento Fv, VL e VH seja codificado através de genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligador sintético que os possibilita serem feitos como uma cadeia contígua simples em que as regiões de VL e VH emparelham para formar moléculas monovalentes

25 (conhecidas como Fv de cadeia simples (scFv); vide por exemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; e Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883. Tais anticorpos de cadeia simples são também intencionados ser abrangidos dentro do termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo. Outras formas de anticorpos de cadeia simples, tais como dia-

30 corpos, são também abrangidas (vide por exemplo, Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448).

Um anticorpo "neutralizante" ou "bloqueador", como aqui usado,

é intencionado referir-se a um anticorpo cuja ligação à hIL-4R resulta em inibição da atividade biológica de hIL-4 e/ou hIL-13. Esta inibição da atividade biológica de hIL-4 e/ou IL-13 pode ser avaliada medindo um ou mais indicadores da atividade biológica de hIL-4 e/ou hIL-13 conhecida à técnica, tais como ativação celular induzida por hIL-4 e/ou ligando IL-13 a hIL-4R (vide exemplos abaixo).

Uma "CDR" ou região de determinação de complementaridade é uma região de hipervariabilidade entremeada dentro de regiões que são mais conservadas, denominadas "regiões de estrutura" (FR). Em modalidades diferentes do anticorpo de anti-hIL-4R ou fragmento da invenção, as FRs podem ser idênticas às sequências de linhagem germinal humana, ou podem ser natural ou artificialmente modificadas.

O termo "ressonância de plasmon de superfície", como aqui usado, refere-se a um fenômeno óptico que permite a análise das interações de tempo real por detecção das alterações nas concentrações de proteína dentro de uma matriz de biossensor, por exemplo, usando o sistema de BIA-core® (Pharmacia Biossensor AB).

O termo "epítopo" é um determinante antigênico que interage com um sítio de ligação de antígeno específico na região variável de uma molécula de anticorpo conhecida como um parátopo. Um antígeno simples pode ter mais que um epítopo. Epítopos podem ser conformacionais ou lineares. Um epítopo conformacional é produzido através de aminoácidos espacialmente justapostos de segmentos diferentes da cadeia de polipeptídeo linear. Um epítopo linear é produzido por resíduos de aminoácido adjacentes em uma cadeia de polipeptídeo. Em certa circunstância, um epítopo pode incluir metades de sacarídeos, grupos fosforila, ou grupos sulfonila no antígeno.

O termo "identidade substancial" ou "substancialmente idêntico", quando referindo a um ácido nucleico ou fragmento do mesmo, indica que, quando otimamente alinhado com inserções ou deleções de nucleotídeo apropriadas com outro ácido nucleico (ou seu filamento complementar), há identidade de sequência de nucleotídeo em pelo menos cerca de 95%, e

mais preferivelmente pelo menos cerca de 96%, 97%, 98% ou 99% das bases de nucleotídeo, quando medida por qualquer algoritmo bem conhecido de identidade de sequência, tal como FASTA, BLAST ou Gap, como debatido abaixo.

- 5 Como aplicado aos polipeptídeos, o termo "similaridade substancial" ou "substancialmente similar" significa que duas sequências de peptídeo, quando otimamente alinhadas, tais como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de intervalo predefinidos, compartilham pelo menos 95% de identidade de sequência, até mesmo mais preferivelmente pelo menos 98% ou 99 % de identidade de sequência. Preferivelmente, posições dos resíduos que não são idênticas diferem por substituições de aminoácido conservadoras. Uma "substituição de aminoácido conservadora" é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácido conservadora não alterará substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Em casos onde duas ou mais sequências de aminoácido diferem umas das outras por substituições conservadoras, a porcentagem de identidade de sequência ou grau de similaridade pode ser ajustado para acima para corrigir a natureza conservadora da substituição. Meios por fazer este ajuste são bem conhecidos àqueles de habilidade na técnica. Vide, por exemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Exemplos de grupos aminoácidos tendo cadeias laterais com propriedades químicas similares incluem (1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadeias laterais de hidroxila alifáticas: serina e treonina; (3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; (4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina, e triptofano; (5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina, e histidina; (6) cadeias laterais acídicas: aspartato e glutamato, e (7) cadeias laterais contendo enxofre são cisteína e metionina.
- 30 Grupos de substituição conservadora de aminoácidos preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, e asparagina-glutamina. Alternativamente, uma substituição

conservadora é qualquer alteração tendo um valor positivo na matriz de probabilidade de log de PAM250 revelada em Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-45. Uma substituição "moderadamente conservadora" é qualquer alteração tendo um valor não-negativo na matriz de probabilidade de log de PAM250.

Similaridade de sequência para polipeptídeos, que é também referida como identidade de sequência, é tipicamente medida usando software de análise de sequência. Software de análise de proteína emparelha sequências similares usando medições de similaridade atribuída a várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições conservadoras de aminoácidos. Por exemplo, software de GCG contém programas tais como Gap e Bestfit que podem ser usados com parâmetros predefinidos para determinar homologia de sequência ou identidade de sequência entre polipeptídeos estritamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos de espécies diferentes de organismos ou entre uma proteína do tipo selvagem e uma muteína da mesma. Vide, por exemplo, GCG Versão 6.1. Sequências de polipeptídeo também podem ser comparadas usando FASTA usando parâmetros predefinidos ou recomendados, um programa em GCG Versão 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) fornece alinhamentos e porcentagem de identidade de sequência das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e de pesquisa (Pearson (2000) supra). Outro algoritmo preferido quando comparar uma sequência da invenção a uma base de dados contendo um número grande de sequências de organismos diferentes é o programa de computação BLAST, especialmente BLASTP ou TBLASTN, usando parâmetros predefinidos. Vide, por exemplo, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 e Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

Preparação de Anticorpos Humanos

Métodos para gerar anticorpos humanos incluem, por exemplo, Veloclmmune® (Regeneron Pharmaceuticals), tecnologia XenoMouse® (Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21; Abgenix), o método "minilocus", e exibição de fago (e vide, por exemplo, US 5.545.807, US 6.787.637). A tec-

nologia de Veloclmmune® (US 6.596.541) abrange um método de gerar um anticorpo humano completamente de especificidade alta para um antígeno seletivo.

5 Roedores podem ser imunizados por qualquer método conhecido na técnica (vide, por exemplo, Harlow e Lane (1988) supra; Malik e Lille-
hoj (1994) *Antibody Techniques*, Academic Press, CA). Em uma modalidade preferida, o antígeno de hIL-4R é administrado diretamente aos camundongos compreendendo *loci* de DNA que codificam tanto uma região variável de cadeia pesada de Ig humana e uma região variável de cadeia leve Capa
10 (Veloclmmune®, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.; US 6.596.541), com um adjuvante para estimular a resposta imune, por exemplo, adjuvante de Freund completo e incompleto, sistema de adjuvante MPL+TDM (Sigma), ou RIBI (dipeptídeos de muramila) (vide O'Hagan (2000) *Vaccine Adjuvant*, Human Press, NJ). Um adjuvante pode impedir dispersão rápida do polipeptídeo para sequestrar o antígeno em um depósito local, e pode conter fatores que podem estimular resposta imune do hospedeiro. Tecnologia de Veloclmmune® envolve gerar um camundongo transgênico tendo um genoma compreendendo as regiões variáveis humanas de cadeia pesada e cadeia leve operavelmente ligadas aos *loci* das regiões constantes de camundongo
15 endógeno de modo que o camundongo produz um anticorpo compreendendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo em resposta à estimulação antigênica. O DNA que codifica as regiões variáveis das cadeias pesada e leve do anticorpo é isolado e operavelmente ligado a DNA codificando as regiões constantes humanas de cadeia pesada e leve.
20 O DNA é depois expresso em uma célula capaz de expressar o anticorpo completamente humano. Em uma modalidade específica, a célula é uma célula CHO.

Anticorpos podem ser terapeuticamente úteis em bloquear uma interação de ligante-receptor ou em inibir a interação do componente de receptor, ao invés de matar as células através de fixação de complemento (citotoxicidade dependente de complemento) (CDC) e citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo de participação (ADCC). A região cons-
30

tante de um anticorpo é importante na habilidade de um anticorpo fixar complemento e mediar citotoxicidade célula-dependente. Desse modo, o isotipo de um anticorpo pode ser selecionado em base se é desejável para o anticorpo mediar citotoxicidade.

- 5 Imunoglobulinas humanas podem existir em duas formas que estão associadas à heterogeneidade da dobradiça. Em uma forma, uma molécula de imunoglobulina compreende uma construção de quatro cadeias estáveis de cerca de 150-160 KDa em que os dímeros são unidos por uma ligação de dissulfeto de cadeia pesada de intercadeia. Em uma segunda
- 10 forma, os dímeros não são ligados por meio de ligações de dissulfeto de intercadeia e uma molécula de cerca de 75-80 KDa é formada composta de uma cadeia leve e pesada covalentemente acoplada (meio-anticorpo). Estas formas foram extremamente difíceis de separar, até mesmo após purificação por afinidade. A frequência da aparência da segunda forma em vários isoti-
- 15 pos de IgG intactos é devido, mas não limitado, às diferenças estruturais associadas ao isotipo da região de dobradiça do anticorpo. De fato, uma substituição de aminoácido simples na região de dobradiça da dobradiça de IgG4 humana pode reduzir a aparência da segunda forma significativamente (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30: 105) para níveis tipicamente
- 20 observados usando uma dobradiça de IgG1 humana. A invenção imediata abrange anticorpos tendo uma ou mais mutações na região de dobradiça, CH2 ou de CH3 que podem ser desejáveis, por exemplo, na produção, para melhorar o rendimento da forma de anticorpo desejada.

- Anticorpos da invenção são preferivelmente preparados com o
- 25 uso de tecnologia de VelocImmune[®]. Um camundongo transgênico, em que as regiões variáveis de cadeia pesada e leve da imunoglobulina endógena são substituídas com as regiões variáveis humanas correspondentes, é desafiado com o antígeno de interesse, e células linfáticas (tais como células B) são restabelecidas dos camundongos que expressam os anticorpos. As
- 30 células linfáticas podem ser fundidas com uma linhagem celular de mieloma para preparar linhagens celulares de hibridoma imortais, e tais linhagens celulares de hibridoma são triadas e selecionadas para identificar linhagens

celulares de hibridoma que produzem anticorpos específicos para o antígeno de interesse. DNA que codifica as regiões variáveis da cadeia pesada e cadeia leve pode ser isolado e ligado às regiões constantes isotípicas desejáveis da cadeia pesada e cadeia leve. Uma tal proteína de anticorpo pode ser produzida em uma célula, tal como uma célula CHO. Alternativamente, DNA que codifica os anticorpos quiméricos antígeno-específicos ou as regiões variáveis das cadeias leve e pesada pode ser isolado diretamente de linfócitos antígeno-específicos.

Em uma modalidade, o camundongo transgênico compreende até 18 genes humanos funcionais de cadeia pesada variável e 12 genes humanos funcionais de cadeia leve variável capa. Em outra modalidade, o camundongo transgênico compreende até 39 genes humanos de cadeia pesada variável e 30 genes humanos de cadeia leve variável capa. Em ainda outra modalidade, o camundongo transgênico compreende até 80 genes humanos de cadeia pesada variável e 40 genes humanos de cadeia leve variável capa.

Em geral, os anticorpos da invenção imediata possuem afinidades muito altas, tipicamente possuindo K_D s de cerca de 10^{-9} a cerca de 10^{-12} M, quando medidos por ligação ao antígeno ou imobilizados em uma fase sólida ou medidos em solução.

Inicialmente, anticorpos quiméricos de alta afinidade são isolados tendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo. Como descrito abaixo, os anticorpos são caracterizados e selecionados para características desejáveis, incluindo afinidade de ligação para ML-4R, habilidade para bloquear hIL-4 que liga a hIL-4R, e/ou seletividade para a proteína humana. As regiões constantes de camundongo são substituídas com regiões constantes humanas desejadas para gerar anticorpos completamente humanos da invenção, por exemplo, IgG4 ou IgG1 do tipo selvagem ou modificada (por exemplo, SEQ ID NO: 588, 589, 590). Embora a região constante selecionada possa variar de acordo com o uso específico, características de ligação de antígeno de alta afinidade e de especificidade alvo residem na região variável.

Mapeamento de Epítopo e Tecnologias Relacionadas

Para triar por anticorpos que ligam a um epítopo particular, um ensaio de bloqueio cruzado rotineiro tal como aquele descrito em *Antibodies: A Laboratory Manual* 1988 Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow e Lane, eds. pode ser executado. Outros métodos incluem mutantes de varredura de alanina, manchas de peptídeo (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), ou análise de clivagem de peptídeo. Além disso, podem ser empregados métodos tais como excisão de epítopo, extração de epítopo e modificação química de antígenos (Tomer (2000) *Protein Science*: 9:487-496).

10 Perfilação assistida por modificação (MAP), também conhecida como Perfilação de Anticorpo com base em Estrutura de Antígeno (ASAP), é um método que categorizar vários anticorpos monoclonais (mAbs) direcionados contra o mesmo antígeno de acordo com as similaridades do perfil de ligação de cada anticorpo às superfícies de antígeno química ou enzimaticamente modificado (Publicação do Pedido de Patente US Nº 2004/0101920). Cada categoria pode refletir um epítopo único ou um distintamente diferente de, ou sobrepondo parcialmente com, um epítopo representado por outra categoria. Esta tecnologia permite filtração rápida de anticorpos geneticamente idênticos, de modo que caracterização pode ser foca-

15 lizada em anticorpos geneticamente distintos. Quando aplicado à triagem de hibridoma, MAP pode facilitar a identificação de clones de hibridoma raros com características desejadas. MAP pode ser usado para classificar os anticorpos de hIL-4R da invenção em grupos de anticorpos que ligam epítops diferentes.

25 Agentes úteis para alterar a estrutura do antígeno imobilizado são enzimas, tais como, por exemplo, enzimas proteolíticas e agentes químicos. A proteína de antígeno pode ser imobilizada em quaisquer superfícies de circuito de biossensor ou contas de poliestireno. O posterior pode ser processado, por exemplo, com um ensaio tal como um ensaio de detecção

30 Luminex® de multiplexação (Luminex Corp., TX). Por causa da capacidade de Luminex® para manipular análise de multiplexação com até 100 tipos diferentes de contas, Luminex® provê superfícies de antígeno quase ilimitadas

com várias modificações, resultando em resolução melhorada na perfilação do epítopo de anticorpo em um ensaio de biossensor.

Administração Terapêutica e Formulações

Administração de entidades terapêuticas de acordo com a invenção pode ser alcançada com veículos, excipientes, e outros agentes adequados que são incorporados nas formulações para fornecer transferência, liberação, tolerância melhoradas, e outros. Uma multidão de formulações apropriadas pode ser encontrada no formulário conhecido a todos os químicos farmacêuticos: Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003, 20º ed, Lippincott Williams & Wilkins). Estas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, unguentos, geléias, ceras, óleos, lipídios, vesículas contendo lipídios (catiônicos ou aniônicos) (tais como LIPOFECTIN®), conjugados de DNA, pastas de absorção anidras, emulsões de óleo-em-água e água-em-óleo, carbocera de emulsões (polietileno glicóis de vários pesos moleculares), géis semissólidos, e misturas semissólidas contendo carbocera. Qualquer uma das misturas anteriores pode ser apropriada em tratamentos e terapias de acordo com a presente invenção, contanto que o ingrediente ativo na formulação não seja inativado pela formulação e a formulação seja fisiologicamente compatível e tolerável com a rota de administração. Vide também Powell et al. "Compendium of excipientes for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol. 52:238-311 e as citações nele para informação adicional relacionada a excipientes e veículos bem conhecidos aos químicos farmacêuticos.

As moléculas terapêuticas da invenção podem ser administradas a um paciente de uma maneira apropriada à indicação, por exemplo, parenteral, topicamente, ou através de inalação. Se injetado, o antagonista pode ser administrado, por exemplo, por meio de rotas intra-articulares, intravenosas, intramusculares, intralesionais, intraperitoneais ou subcutâneas, através de injeção de bolo, ou infusão contínua. Administração localizada em um sítio da doença ou lesão é contemplada, como também liberação transdérmica e liberação contínua de implantes. Liberação através de inalação inclui, por exemplo, inalação nasal ou oral, uso de um nebulizador, inalação do an-

tagonista em forma de aerossol, e outros. Outras alternativas incluem colírio; preparações orais incluindo pílulas, xaropes, pastilhas ou chiclete; e preparações tópicas tais como loções, géis, pulverizações, e unguentos.

- Dosagens específicas e a frequência de administração podem
- 5 variar de acordo com tais fatores como a rota de administração, a natureza e severidade da doença a ser tratada, se a condição é aguda ou crônica, e o tamanho e condição geral do paciente. Dosagens apropriadas podem ser determinadas por procedimentos conhecidos na técnica pertinente, por exemplo, nas experimentações clínicas que podem envolver estudos de esca-
- 10 lação de dose. As moléculas terapêuticas da invenção podem ser uma vez, ou repetidamente. Em modalidades particulares, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é administrado em um período de pelo menos um mês ou mais, por exemplo, por um, dois, ou três meses ou mesmo indefinidamente. Para tratar condições crônicas, tratamento a longo prazo é em geral mais eficaz.
- 15 Porém, para tratar condições agudas, administração durante períodos mais curtos, por exemplo, de uma a seis semanas, pode ser suficiente. Em geral, o terapêutico é administrado até o paciente manifestar um grau de modo médico relevante da melhoria em linha base para o indicador ou indicadores escolhidos. O nível de IL-4 pode ser monitorado durante e/ou após o trata-
- 20 mento com a molécula terapêutica da invenção. Métodos para medir os níveis no soro de IL-4 são conhecidos na técnica, por exemplo, por ELISA, etc.

Uso Terapêutico e Terapias de Combinação

- Os anticorpos e fragmentos de anticorpo da invenção são úteis para tratar doenças e distúrbios que são melhorados, inibidos ou melhorados
- 25 reduzindo a atividade de IL-4. Estes distúrbios incluem aqueles caracterizados por expressão anormal ou em excesso de IL-4, ou por uma resposta de hospedeiro anormal para a produção de IL-4. Distúrbios relacionados a IL-4 que são tratados pelos anticorpos ou fragmentos de anticorpo incluem, por exemplo, artrite (incluindo artrite séptica), herpetiforme, urticária idiopática
- 30 crônica, escleroderma, cicatrização hipertrófica, doença de Whipple, hiperplasia prostática benigna, distúrbios pulmonares tais como asma (branda, moderada ou severa), distúrbios inflamatórios tais como doença inflamatória

do intestino, reações alérgicas, doença de Kawasaki, falcemia, síndrome de Churg-Strauss, doença de Grave, pré-eclampsia, síndrome de Sjogren, síndrome linfoproliferativa autoimune, anemia hemolítica autoimune, esôfago de Barrett, uveíte autoimune, tuberculose, dermatite atópica, colite ulcerativa, fibrose, e nefrose (vide U.S. 7.186.809).

A invenção abrange terapias de combinação em que o anticorpo de anti-IL-4R ou fragmento de anticorpo é administrado em combinação com um segundo agente terapêutico. Coadministração e terapia de combinação não são limitadas à administração simultânea, mas incluem regimes de tratamento em que um anticorpo de anti-IL-4R ou fragmento de anticorpo é administrado pelo menos uma vez durante um curso de tratamento que envolve administrar pelo menos um outro agente terapêutico ao paciente. Um segundo agente terapêutico pode ser outro antagonista de IL-4, tal como outro fragmento de anticorpo/anticorpo, ou um receptor de citocina solúvel, um antagonista de IgE, uma medicação de asma (corticosteróides, agentes não-esteroides, agonistas betas, antagonistas de leucotrieno, xantinas, fluticasona, salmeterol, albuterol) que podem ser liberados por inalação ou outros meios apropriados. Em uma modalidade específica, o anticorpo de anti-IL-4R ou fragmento de anticorpo da invenção pode ser administrado com um antagonista de IL-1, tal como rilonacept, ou um antagonista de IL-13. O segundo agente pode incluir um ou mais antagonistas de receptor de leucotrieno para tratar distúrbios tais como doenças inflamatórias alérgicas, por exemplo, asma e alergias. Exemplos de antagonistas de receptor de leucotrieno incluem mas não são limitados a montelukast, pranlukast, e zafirlukast. O segundo agente pode incluir um inibidor de citocina tal como um ou mais de um antagonista de TNF (etanercept, ENBREL[®]), IL-9, IL-5 ou IL-17.

Exemplos

Os exemplos a seguir são colocados para fornecer àqueles de habilidade usual na técnica uma revelação completa e descrição de como fazer e usar os métodos e composições da invenção, e não são intencionados a limitar o escopo do que os inventores consideram como sua invenção. Esforços foram feitos para assegurar precisão com respeito aos números

usados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.) mas alguns erros experimentais e desvios deveriam ser levados em conta. A menos que do contrário indicado, partes são partes em peso, peso molecular é peso molecular médio, temperatura está em graus centígrado, e pressão está na atmosférica ou quase.

Exemplo 1. Geração de Anticorpos Humanos para Receptor de IL-4 humano.

Camundongos compreendendo *loci* de DNA que codificam tanto uma região variável de cadeia pesada de Ig humana e uma região variável de cadeia leve capa (VelocImmune[®], Regeneron Pharmaceuticals, Inc.; Patente US Nº 6.596.541) foram imunizados com IL-4R humana (hIL-4R, SEQ ID NO: 1). A hIL-4R foi administrada por injeção direta de antígeno purificado em um adjuvante ou indiretamente fornecendo a sequência de DNA de hIL-4R em um plasmídeo de DNA que contém o gene de hIL-4R e expressa hIL-4R usando a maquinaria de expressão de proteína celular do hospedeiro para produzir polipeptídeo de antígeno *in vivo*. Para obter ótima resposta imune, os animais foram subsequentemente reforçados a cada 3-4 semanas e sangramentos obtidos 10 após cada reforço para avaliação da progressão da resposta de antiantígeno.

Quando os camundongos atingiram resposta imune máxima, células B expressando o anticorpo foram colhidas e fundidas com células de mieloma de camundongo para formar hibridomas. Anticorpos monoclonais funcionalmente desejáveis foram selecionados por meio de triagem de meios condicionados dos hibridomas ou células transfeccionadas para especificidade, afinidade de ligação de antígeno, e potência no bloqueio de ligação de hIL-4 a hIL-4R (descrito abaixo).

Anticorpos selecionados que exibiram afinidade de ligação de antígeno desejável, potência, e/ou habilidade para bloquear hIL-4 de ligar a hIL-4R incluíram (HCVR/LCVR): VX 4E7-9 (SEQ ID NO: 3/11; 387/389; 391/393); VX 3F7-6 (SEQ ID NO: 19/27; 395/397; 399/401); VAB 16G1-1 (SEQ ID NO: 35/43; 403/405; 407/409); VAB 16F3-1 (SEQ ID NO: 51/59, 411/413, 415/417, 579/59 e 581/59); VAB 15C8-17 (SEQ ID NO: 67/75, 419/421, 423/425); VAB 13A1-6 (SEQ ID NO: 83/91, 427/429, 431/433); VAB

11 G8-1 (SEQ ID NO: 99/107, 435/437, 439/441); VAB 10G8-19 (SEQ ID NO: 115/123, 443/445, 447/449); VAB 10C1-5 (SEQ ID NO: 131/139, 451/453, 455/457); VAB 8G10-1 (SEQ ID NO: 147/155, 459/461, 463/465); VAB 7B9-3 (SEQ ID NO: 163/171, 467/469, 471/473); VAB 6C10-14 (SEQ ID NO: 179/187, 475/477, 479/481); VAB 5C5-11 (SEQ ID NO: 195/203, 483/485, 487/489); VAB 3B4-10 (SEQ ID NO: 211/219, 491/493, 495/497); VAB 4D5-3 (SEQ ID NO: 227/235, 499/501, 503/505); VAB 1 H1-2 (SEQ ID NO: 243/251, 507/509, 511/513); VAK5H4-4 (SEQ ID NO: 259/267, 515/517, 519/521); VAK7G8-5 (SEQ ID NO: 275/283, 523/525, 527/529); VAK8G11-13 (SEQ ID NO: 291/299, 531/533, 535/537); VAK9C6-11 (SEQ ID NO: 307/315, 539/541, 543/545); VAK10G6-7 (SEQ ID NO: 323/331, 547/549, 551/553); VAK11 D4-1 (SEQ ID NO: 339/347, 555/557, 559/561); VAK12B11-9 (SEQ ID NO: 355/363, 563/565, 567/569); e VAK10G12-5 (SEQ ID NO: 371/379, 571/573, 575/577).

15 Exemplo 2. Determinação da Afinidade de Ligação de Antígeno.

Afinidade de ligação (K_D) dos anticorpos selecionados com respeito à hIL-4R foi determinada usando um ensaio de ressonância de plasmon de superfície de biossensor de tempo real (BIAcore® 2000). Brevemente, anticorpo foi capturado em uma superfície de anticorpo policlonal de IgG de antiamundongo de cabra (GAM) através de acoplamento químico da IgG de GAM em uma fatia de BIAcore® para formar uma superfície de anticorpo capturada. Várias concentrações (variando de 12,5 nM a 0,625 nM) de hIL-4R monomérico (R&D Systems) ou hIL-4R-hFc dimérico foram injetadas na superfície do anticorpo capturado. Ligação de antígeno ao anticorpo, e dissociação do complexo ligado, foi monitorada em tempo real. Constantes de dissociação de equilíbrio (K_D) e constantes de taxa de dissociação foram apuradas executando análise cinética usando o software de avaliação BIA. Software de avaliação BIA foi também usado para calcular a meia-vida do complexo de dissociação de antígeno/anticorpo ($T_{1/2}$). Os resultados estão mostrados na tabela I. Controle: um anticorpo de anti-IL-4R completamente humano (patente U.S. Nº 7.186.809; SEQ ID NOs: 10 e 12). Os resultados das análises cinéticas revelaram que os anticorpos selecionados incluíam

- anticorpos de alta afinidade que eram capazes de ligação ao receptor dimérico com K_D s abaixo de 1 nM. A afinidade de ligação dos anticorpos de anti-hIL-4R a IL-4R de camundongo ou macaco (*Macaca fascicularis*) foi também testada. Os anticorpos selecionados (1) não reagiram cruzado com IL-4R de camundongo; e (2) ou falharam em ligar a IL-4R de macaco ou ligaram a IL-4R de macaco com afinidade muito baixa.

Tabela 1

Anticorpo	K_D dimérica (pM)	$T_{1/2}$ dimérico (hr)	K_D monomérica (nM)	$T_{1/2}$ monomérico (min)
VX 4E7-9	111	19,1	1,43	48
VX 3F7-6	654	2,7	3,91	16
VAB 8G10-1	5.510	4,1	7,71	28
VAB 7B9-3	52	6,1	1,01	13
VAB 6C10-14	286	6,2	1,77	73
VAB 5C5-11	27	7,7	0,13	47
VAB 4D5-3	32	20,4	2,02	35
VAB 3B4-10	53	20,4	0,59	102
VAB 1H1-2	139	8,2	34,90	8
VAB 16G1-1	38	7,3	0,93	15
VAB 16F3-1	3	41	0,02	254
VAB 15C8-17	45	3,6	0,82	15
VAB 11G8-1	108	8,7	1,63	25
VAB 10G8-19	52	2	11,40	2
VAB 10C1-5	51	6,7	4,47	6
VAK8G11-13	2	63	0,03	840
VAK5H4-4	4	30	0,02	960
VAK10G6-7	11	24	0,23	144
VAK9C6-11	68	7	2,05	28
VAK7G8-5	9	25	0,06	480
VAK11D4-1	6	21	0,05	480
VAK12B11-9	36	12	0,41	120

Anticorpo	K _D dimérica (pM)	T _{1/2} dimé- rico (hr)	K _D mono- mérica (nM)	T _{1/2} monomé- rico (min)
VAK10G12-5	7	46	0,09	360
Controle	71	2,1	1,23	16

Afinidade de ligação de anticorpo-antígeno foi também avaliada usando um ensaio de competição de solução baseado em ELISA. Brevemente, anticorpos (proteínas purificadas a 1 ou 3,3 ng/ml) foram pré-misturados com diluições seriais de proteína de antígeno (monomérica ou dimérica) variando de 0 a 10 µg/ml. Soluções do anticorpo e mistura de antígeno foram depois incubadas durante duas a quatro horas em temperatura ambiente para alcançar equilíbrio de ligação. Anticorpo livre nas misturas foi depois medido usando um ELISA quantitativo intercalado. Brevemente, placas de 96 cavidades de Maxisorb® (VWR, Chester Ocidental, PA) foram revestidas com 2 µg/ml de proteína de hIL-4R-hFc em PBS durante a noite a 4°C seguido bloqueando a ligação não-específica com BSA. As soluções da mistura de anticorpo-antígeno foram depois transferidas para as placas de Maxisorb® revestidas seguido por uma incubação de uma hora. As placas foram depois lavadas com tampão de lavagem e os anticorpos ligados à placa foram detectados com um reagente de anticorpo policlonal de IgG anti-camundongo de cabra conjugado com HRP (Jackson ImmunoResearch) ou um reagente de anticorpo policlonal de IgG anti-humano de cabra conjugado com HRP (Jackson ImmunoResearch) para anticorpo de controle e desenvolvidos usando substratos colorimétricos tais como BD OptEIA® (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Após a reação ter sido interrompida com ácido fosfórico ou sulfúrica a 1M, as absorbâncias a 450 nm foram registradas e os dados foram analisados usando software GraphPad® Prism. A dependência dos sinais nas concentrações de antígeno na solução foi analisada com uma análise de ajuste de quatro parâmetros e relatada como IC₅₀, a concentração de antígeno requerida para alcançar 50% de redução do sinal das amostras de anticorpo sem a presença de antígeno na solução. As IC₅₀ foram determinadas como descritas acima e estão resumidas na tabela 2. Em uma modalidade preferida, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da

invenção apresenta uma IC_{50} para hIL-4R dimérico de cerca de 20 pM ou menos, e uma IC_{50} para hIL-4R monomérico de cerca de 150 pM ou menos, ou cerca de 100 pM ou menos, quando medida por ensaio de competição de solução de ELISA.

5

Tabela 2

Anticorpo	IC_{50} Dimérica hIL4R (pM)	IC_{50} Monomérica hIL4R (pM)
VX 4E7-9	94	175
VX 3F7-6	184	2,900
VAB 8G10-1	85	517
VAB 7B9-3	7	2,980
VAB 6C10-14	203	489
VAB 5C5-11	6	5,220
VAB 4D5-3	35	285
VAB 3B4-10	88	336
VAB 1H1-2	70	779
VAB 16G1-1	9	595
VAB 16F3-1	5	7
VAB 15C8-17	9	418
VAB 11G8-1	76	473
VAB 10G8-19	4	89
VAB 10C1-5	12	12,900
VAK 5H4-4	18	130
VAK 7G8-5	18	92
VAK 8G11-13	15	103
VAK 9C6-11	46	1,400
VAK 10G6-7	25	165
VAK 11D4-1	23	109
VAK 12B11-9	64	325
VAK 10G12-5	41	169
Controle	14	3,500

Exemplo 3. Inibição de hIL-4 e Interação de hIL-4R

A habilidade dos anticorpos selecionados para bloquear hIL-4 de ligar a hIL-4R foi triada por ensaio de bloqueio de hIL-4 de BIAcore® e a potência foi medida por um imunoensaio de bloqueio de hIL-4 quantitativo como descrito abaixo. Os resultados estão resumidos na tabela 3.

A habilidade dos anticorpos para bloquear hIL-4 de liga ao receptor de hIL-4R foi determinada usando ressonância de plasmon de superfície. Moléculas de hIL-4R-hFc purificadas foram capturadas por anticorpo policlonal de IgG anti-humano de cabra imobilizado em CM-5 para uma densidade de 260 RU, para preparar uma superfície revestida com receptor. IL-4 humana (0,25 ml a 50 nM) foi depois injetada na superfície revestida com receptor e a quantidade de hIL-4 ligada foi registrada (primeira injeção de hIL-4). A hIL-4 ligada foi depois removida com um pulso de $MgCl_2$ a 3 M seguido por tampão de condicionamento. Anticorpos de anti-hIL4R purificados foram depois injetados na superfície de receptor seguido por uma segunda injeção de hIL-4 na mesma concentração (segunda injeção de hIL-4). O percentual de redução na ligação de hIL-4 resultante do complexo de anticorpo e de receptor pré-formado está relatado na tabela 3.

Para também avaliar a habilidade para bloquear ligação de hIL-4 à hIL-4R, um imunoensaio quantitativo foi executado. Brevemente, soluções de hIL-4R-Fc a 25 pM foram pré-misturadas com proteína de anticorpo variando de ~ 50 nM a 0 nM em diluições seriais, seguido por uma incubação de hora em temperatura ambiente. Concentração de hIL-4R-Fc livre (nenhum anticorpo ligado) foi determinada usando um ELISA intercalado específico para hIL4R. Placas de detecção para hIL-4R foram preparadas ligando hIL-4 biotinilada (0,5 µg/ml) em placas de 96 cavidades revestidas com estreptavidina. As amostras de anticorpo-antígeno pré-ligadas foram transferidas para a placa de detecção revestida com hIL-4. Após uma incubação de uma hora em temperatura ambiente, a placa de detecção foi lavada e a placa ligada de hIL-4R-hFc foi detectada usando anticorpos policlonais de anti-hFc de cabra conjugado com HRP e desenvolvidas usando substratos colorimétrico tais como BD OptEIA® (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Após a

- reação ter sido interrompida com ácido fosfórico ou sulfúrica a 1 M, as absorbâncias a 450 nm foram registradas e os dados foram analisados usando software GraphPad® Prism. IC₅₀s foram determinadas como a quantidade de anticorpo requerida para reduzir 50% de IL-4R-hFc detectável para hIL-4
- 5 ligada à placa. Em uma modalidade preferida, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção apresenta uma IC₅₀ para bloquear hIL-4R a 25 pM de menos que cerca de 50 pM, ou menos que cerca de 40 pM, ou menos que cerca de 30 pM, ou menos que cerca de 20 pM, quando medida por ELISA.

Tabela 3

Anticorpo	% Inibição (BIAcore®)	IC ₅₀ (ELISA pM)
VX 4E7-9	79	118
VX 3F7-6	86	274
VAB 8G10-1	74	244
VAB 7B9-3	96	59
VAB 6C10-14	79	441
VAB 5C5-11	96	24
VAB 4D5-3	82	240
VAB 3B4-10	72	322
VAB 1H1-2	78	146
VAB 16G1-1	92	18
VAB 16F3-1	97	19
VAB 15C8-17	97	29
VAB 11G8-1	77	240
VAB 10G8-19	85	18
VAB 10C1-5	93	34
VAK 5H4-4	96	33
VAK 7G8-5	95	27
VAK 8G11-13	95	26
VAK 9C6-11	96	67
VAK 10G6-7	95	37
VAK 11D4-1	95	35

Anticorpo	% Inibição (BIAcore®)	IC ₅₀ (ELISA pM)
VAK 12B11-9	96	99
VAK 10G12-5	94	59

Exemplo 4. Neutralização do Efeito Biológico de hIL-4 *in vitro*

A via de transdução de sinal mediada por IL-4 foi extensivamente documentada na literatura (por exemplo, vide revisão de Hebenstreit et al. 2006 Cytokine Growth Factor Rev.17(3):173-88, 2006). IL-4 pode estimular dois complexos de receptor, tipo I e tipo II. Complexos de receptor do tipo I são formados pela ligação de IL-4 à IL-4R e heterodimerização subsequente com a cadeia de gama comum. Alternativamente, complexo de IL4/IL4R pode heterodimerizar-se com o receptor de IL-13 para formar complexos de receptor do tipo II. Ambos complexos do tipo I e tipo II sinalizam principalmente através de STAT6. Portanto, a habilidade dos anticorpos selecionados para bloquear sinalização através de STAT6 foi avaliada como descrito abaixo.

Uma linhagem celular com sensibilidade alta para hIL-4 e hIL-13 foi estabelecida. Células HEK293 foram estavelmente transfeccionadas com STAT6 humano e um plasmídeo repórter de STAT6 luciferase, e foram mantidas em meios de crescimento (DMEM, FBS a 10%, L-glutamina, penicilina, estreptomicina). Uma resposta mediada por receptor de IL-4 robusta foi alcançada quando hIL-4 a 10 pM foram adicionados ao meio de crescimento das células HEK293 transfeccionadas com STAT6. Para bioensaio da resposta de hIL-4, as células foram lavadas uma vez em meios de ensaio (Optimem I (Gibco) mais FBS a 0,1%) e banhadas a 1×10^4 células/poço (placa de 96 cavidades) em 80 µl de meios de ensaio. Anticorpos purificados foram serialmente diluídos em meios de ensaio (concentrações finais variando de 20 nM a 0) e 10 µl de cada um do anticorpo de teste foi adicionados às células juntamente com 10 µl de hIL-4 (10 pM de constante de concentração final). Células foram depois incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 6 h. A extensão da resposta celular foi medida em um ensaio de luciferase (Promega Biotech). Os resultados estão mostrados na tabela 4.

Inibição da atividade biológica IL-4-dependente *in vitro* foi tam-

bém confirmada usando uma linhagem celular de eritroblastos humana, TF1, ou uma linhagem celular de TF1 sobre-expressando IL-13R α modificada (TF1/A12). Neste bioensaio, 20.000 células foram semeadas em cada poço de uma placa de 96 cavidades em meio RPMI 1640 contendo FBS a 10%, L-glutamina a 2 mM, e penicilina e estreptomicina. Vinte e cinco μ l de anticorpos purificados variando de 0 a 50 nM (concentração final) foram adicionados juntamente com 25 μ l de proteína recombinante de hIL-4 para uma concentração final de 50 pM para linhagem celular TF1 ou 20 pM para linhagem celular TF1/A12. As células foram depois deixadas crescer durante 3 dias a 37°C e as contagens de células finais foram medidas usando um Kit de CCK8 (Dojindo, Japão). Habilidade de anticorpo para bloquear crescimento de célula de TF-1 está relatada na tabela 4 como a concentração de anticorpo requerida para alcançar 50% de redução de proliferação celular.

Tabela 4

Anticorpo	IC ₅₀ de Bioensaio de STAT6 (nM)	IC ₅₀ de Bioensaio de TF1 (nM)	IC ₅₀ de Bioensaio de TF1/A12 (nM)
VX 4E7-9	7,90		10
VX 3F7-6	>10		>50
VAB 8G10-1	>10		>50
VAB 7B9-3	3,40		8,20
VAB 6C10-14	>10		23
VAB 5C5-11	0,14	0,21	0,37
VAB 4D5-3	3,80		21
VAB 3B4-10	>10		>50
VAB 1H1-2	>10		>50
VAB 16G1-1	0,14	0,12	0,70
VAB 16F3-1	0,032	0,046	0,067
VAB 15C8-17	0,32	0,44	4,70
VAB 11G8-1	>10		>50
VAB 10G8-19	1,80		12,8
VAB 10C1-5	1,90		22,8

Anticorpo	IC₅₀ de Bioensaio de STAT6 (nM)	IC₅₀ de Bioensaio de TF1 (nM)	IC₅₀ de Bioensaio de TF1/A12 (nM)
VAK 5H4-4	0,132	0,150	0,182
VAK 7G8-5	0,06	0,13	
VAK 8G11-13	0,08	0,16	
VAK 9C6-11	0,48	0,31	
VAK 10G6-7	0,11	0,23	
VAK 11D4-1	0,20	0,20	
VAK 12B11-9	0,49	0,57	
VAK 10G12-5	0,36	0,58	

Exemplo 5. Neutralização do Efeito Biológico de hIL-13 *in vitro*

- Uma vez que IL-4R foi mostrado ser um modulador para atividade de IL-13 através de sua ligação ao complexo de IL-13/IL-13R, os anticorpos selecionados foram testados para sua habilidade para bloquear atividade de IL-13 em uma modificação do ensaio de STAT6 luciferase de HEK293 descrito acima, com a modificação sendo a substituição de IL-4 a 10 pM com hIL-13 a 40 pM. Os anticorpos foram também avaliados para potência em bloquear a atividade de hIL-13 no ensaio de linhagem celular de TF-1 descrito acima, com hIL-13 a 150 pM na presença de 0-50 nM anticorpos.
- Os resultados estão mostrados na tabela 5.

Tabela 5

Anticorpo	IC₅₀ de Bioensaio de STATE (nM)	IC₅₀ de Bioensaio de TF1 (nM)
VX 4E7-9	6,30	
VX 3F7-6	>10	
VAB 8G10-1	>10	
VAB 7B9-3	1,10	
VAB 6C10-14	>10	
VAB 5C5-11	0,06	0,82
VAB 4D5-3	3,30	
VAB 3B4-10	8,30	

Anticorpo	IC ₅₀ de Bioensaio de STATE (nM)	IC ₅₀ de Bioensaio de TF1 (nM)
VAB 1H1-2	>10	
VAB 16G1-1	0,09	0,44
VAB 16F3-1	0,018	0,079
VAB 15C8-17	0,20	2,60
VAB 11G8-1	8,80	
VAB 10G8-19	0,97	
VAB 10C1-5	1,00	
VAK 5H4-4	0,084	0,240
VAK 7G8-5	0,04	0,36
VAK 8G11-13	0,06	0,42
VAK 9C6-11	0,30	1,00
VAK 10G6-7	0,07	0,46
VAK 11D4-1	0,14	0,44
VAK 12B11-9	0,37	1,60
VAK 10G12-5	0,26	1,90

Exemplo 6. Avaliação do Perfil de Ligação de Anticorpo

Um perfil de ligação de anticorpo pode ser estabelecido determinando o efeito que um anticorpo (ligado a seu antígeno) pode ter na habilidade de um painel de anticorpos diferentes para ligação subsequente ao mesmo antígeno. Por exemplo, o antígeno pode ser imobilizado em um suporte para formar uma superfície revestida com antígeno, a superfície revestida com antígeno pode ser saturada com o anticorpo, e depois a superfície revestida com antígeno saturada com anticorpo pode ser exposta a um painel de outros anticorpos. A extensão de ligação do painel de outros anticorpos à superfície de antígeno saturada com anticorpo fornece um perfil de ligação de anticorpo. Ensaio de ligação sequencial com base em OCTET® foram empregados para gerar um perfil de ligação de anticorpo. Brevemente, um grupo de 24 Biossensores de FA de Ligação Alta de Estrepavidina (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA) foi incubado primeiro com antígeno, biotina-hIL-4R-hFc, a 2 µg/ml por 10 min a 30°C para alcançar saturação e a quantidade

de antígeno ligado foi medida como uma alteração em espessura (nm) da camada biológica devido à proteína ligada que é diretamente medida pelo deslocamento de comprimento de onda. Biossensores ligados à biotina-hIL-4R-hFc foram depois incubados com o primeiro anticorpo (anticorpo de controle) a 50 µg/ml por 15 min a 30°C para alcançar saturação e a quantidade de anticorpo de controle ligado foi medida como uma alteração em espessura (nm) da camada biológica. Cada sensor ligado ao anticorpo de controle foi depois incubado com um de um painel de 24 anticorpos de anti-hIL-4R diferentes (segundo anticorpo) a 50 µg/ml por 15 min a 30°C, e a quantidade do segundo anticorpo ligado foi medida como uma alteração em espessura da camada biológica. O mesmo ensaio foi repetido usando anticorpo de anti-hIL-4 de VAB16f3-1 ou VAK5H4-4 como o primeiro anticorpo. Os resultados estão mostrados na figura 1A-C

Anticorpos de anti-hIL-4R selecionados foram também avaliados através de western blot (dados não mostrados). Brevemente, o monômero de hIL-4R (200 ng por rota) e monômero marcado com His de mFIL-4R (200 ng por rota) foram submetidos à eletroforese em géis de SDS-PAGE usando tampão de amostra redutor e não-redutor. Quatro géis separados foram cada um transferidos para uma membrana de PVDF e cada membrana foi exposta a um de quatro anticorpos primários: anticorpo de mAb de anti-His (Qiagen), VAB 16F3-1, VAK 5H4-4, ou de anti-hIL-4R de controle, com anti-mIgG ou anti-hIgG de cabra conjugado com HRP (Pierce) como anticorpo secundário. Todos os três anticorpos de anti-hIL-4R reconheceram a forma não-reduzida de hIL-4R. Apenas VAB 16F3-1 e VAK 5H4-4 detectaram a forma reduzida de hIL-4R. Nenhum dos anticorpos de anti-hIL-4R detectaram IL-4R de macaco.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que especificamente liga hIL-4R (SEQ ID NO: 1) com uma K_D de cerca de 200 pM ou menos, quando medida por ressonância de plasmon de superfície, compreendendo CDRs de uma sequência variável de cadeia pesada (HCVR) e uma sequência variável de cadeia leve (LCVR), em que as sequências de HCVR/LCVR são selecionadas de HCVR da SEQ ID NO:579/ LCVR da SEQ ID NO:59 e HCVR da SEQ ID NO:581/ LCVR da SEQ ID NO:59.
5
2. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que exibe uma K_D para hIL-4R (SEQ ID NO: 1) de menos que 150 pM.
10
3. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que exibe uma K_D para hIL-4R (SEQ ID NO: 1) de menos que 50 pM.
15
4. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um anticorpo ou um fragmento de ligação de antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a sequência de ácido nucleico codifica o HCVR é selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 578 e 580, e em que a sequência de ácido nucleico que codifica o LCVR é SEQ ID NO:58.
20
5. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para atenuar ou inibir uma doença ou distúrbio mediado por IL-4 em um ser humano, em que a doença ou distúrbio é selecionado de artrite, herpetiforme, urticária idiopática crônica, escleroderma, cicatrização hipertrófica, doença de Whipple, hiperplasia prostática benigna, distúrbio pulmonar, distúrbio inflamatório, reações alérgicas, doença de Kawasaki, falcemia, síndrome de Churg-Strauss, doença de Grave, pré-eclampsia, síndrome de Sjogren, síndrome linfoproliferativa autoimune, anemia hemolítica autoimune, esôfago de Barrett, uveíte autoimune, tuberculose, dermatite atópica, colite ulcerativa,
25
30

fibrose e nefrose.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o dito distúrbio pulmonar é asma, o dito distúrbio inflamatório é doença inflamatória do intestino, ou a dita artrite é artrite séptica.

5 7. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Fig. 1A

Primeiro anticorpo: Controle

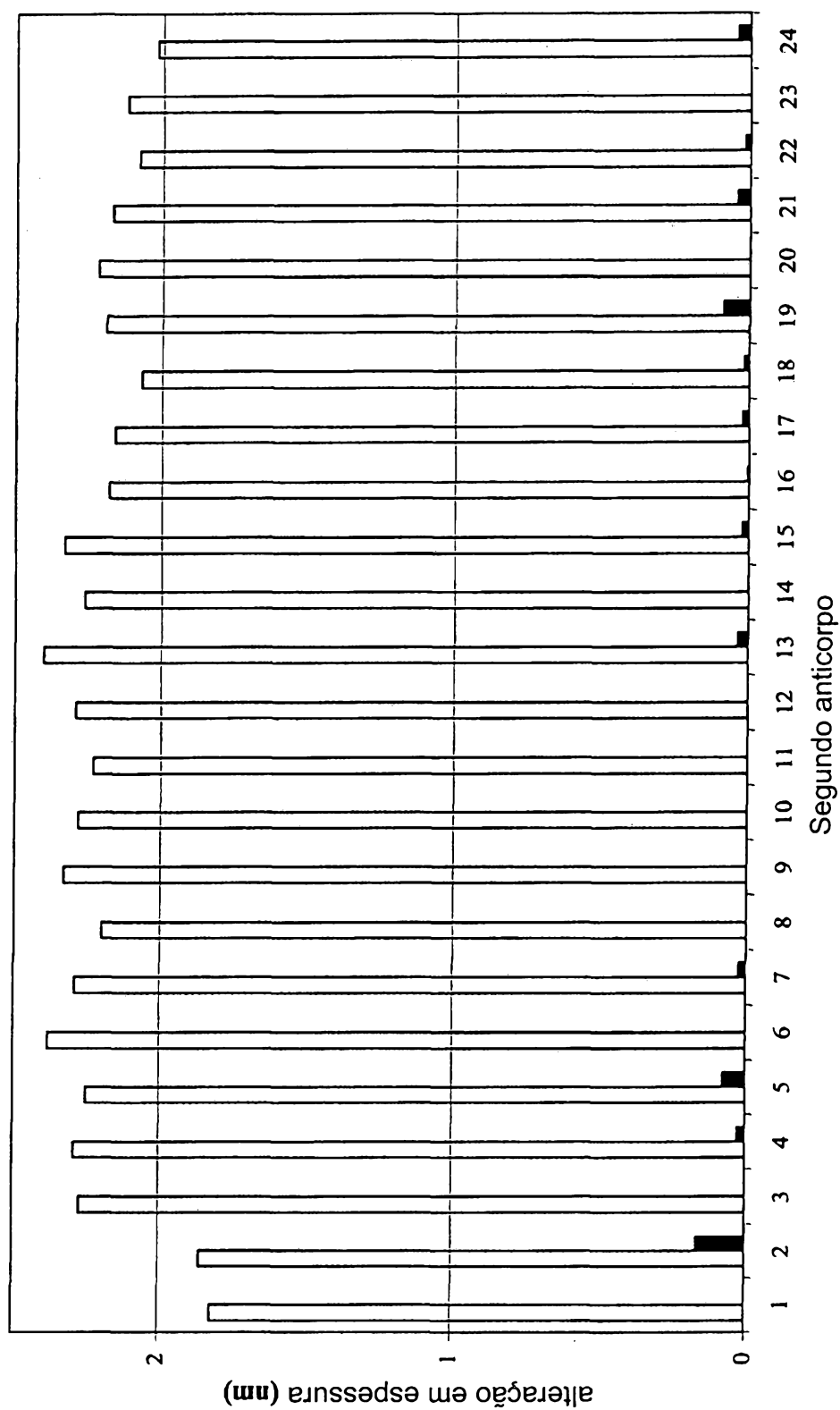


Fig. 1B

Primeiro anticorpo: VAB16F3-1

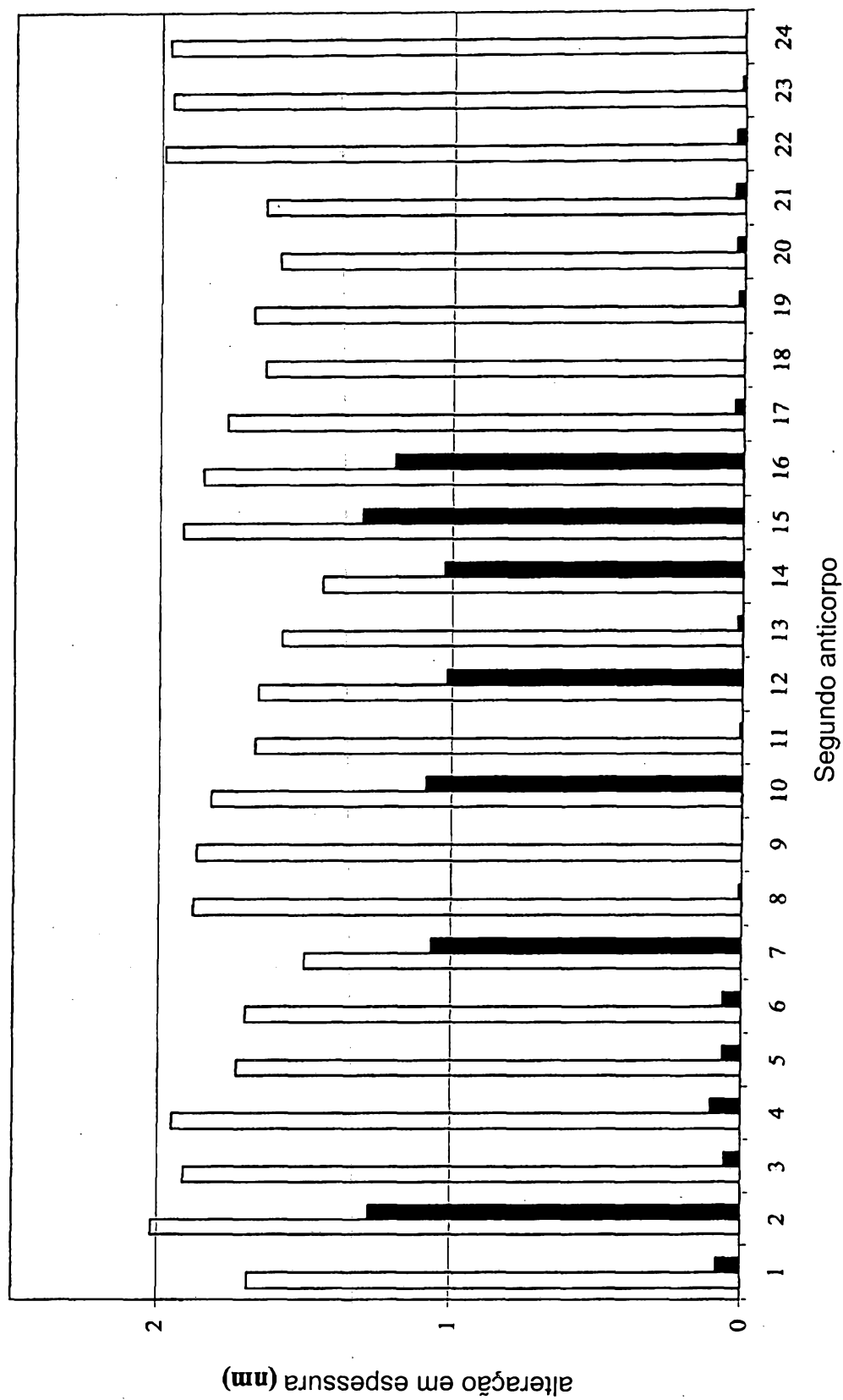


Fig. 1C

Primeiro anticorpo: VAK5H4-4

