



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) PI 0717512-4 A2**



(22) Data de Depósito: 25/09/2007  
(43) Data da Publicação: 19/11/2013  
(RPI 2237)

**(51) Int.Cl.:**  
C07K 16/28  
C12N 15/13  
A61K 39/395  
A61P 37/00  
A61P 31/18

---

**(54) Título:** ANTICORPOS CONTRA CCR5 E USOS DOS MESMOS **(57) Resumo:**

**(30) Prioridade Unionista:** 29/09/2006 EP 06 020646.3

**(73) Titular(es):** F. Hoffmann-La Roche AG

**(72) Inventor(es):** Johannes Auer, Michael Brandt, Monika Baehner

**(74) Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

**(86) Pedido Internacional:** PCT EP2007008312 de 25/09/2007

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/037419de 03/04/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTICORPOS CONTRA CCR5 E USOS DOS MESMOS**".

A presente invenção refere-se aos anticorpos contra CCR5, métodos para sua produção, composições farmacêuticas contendo os ditos anticorpos e usos dos mesmos.

Há alguns anos atrás, surgiu um entendimento crescente dos mecanismos específicos de que se utiliza o HIV-1 para entrar nas células-alvo. Isso facilitou os esforços no desenvolvimento de fármacos que se destinam às etapas separadas neste processo. O primeiro fármaco que alveja a entrada foi recentemente aprovado para uso clínico (enfuvirtide, T20; Lazzarin, A., e outros, N. Engl. J. Med. 348 (2003) 2186-2195). Enfuvirtide é um fármaco de peptídeo que bloqueia a fusão em um estágio subsequente à ligação do receptor de quimiocina.

A infecção por HIV-1 é iniciada por interações entre a glicoproteína do envoltório virótico (Env) e um complexo de receptor celular compreendido de CD4 mais um receptor de quimiocina (Pierson, T.C. e Doms, R. W., Immuno. Lett. 85 (2003) 113-118; Kilby, J.M. e Eron, JJ., N. Engl. J. Med. 348 (2003) 2228-2238). Env possui duas subunidades: a glicoproteína de superfície gp 120 que interage com o receptor CD4 celular e que se associa não-covalentemente à subunidade gp 41 da membrana do vírus. Gp 41 ancora gp 120 à membrana virótica e é também responsável pela fusão. A ligação da gp 120 ao CD4 nas células desencadeia uma alteração conformacional que expõe ou cria um sítio de ligação que permite que a gp 120 interaja com um receptor de quimiocina da superfície celular, o "correceptor". Os receptores de quimiocina são sete receptores acoplados à proteína g da membrana (7 TM GPCRs) que normalmente transmitem sinais em resposta às quimiocinas, pequenas citocinas com funções quimiotáticas, inflamatórias e outras.

Uma grande proporção de fármacos de uso clínico se dirige a outras 7 TM GPRs e assim o alvejamento dessas moléculas para bloquear a entrada do vírus em uma extensão do tipo de maior sucesso de programas de desenvolvimento de fármaco do passado. Os isolados de HIV-1 requerem

CD4 e um correceptor para entrar e infectar as células. O receptor da quimiocina CC humana, CCR5, é um correceptor para cepas de macrófago-trópico (R5) e desempenha um papel importante na transmissão sexual do HIV-1 (Berger, E.A., AIDS 11 (Suppl. A) (1997) 3-16; Bieniasz, P.D. and Cullen, B. R., Frontiers in Bioscience 3 (1998) d44-d58; Littman, D.R., Cell 93 (1998) 677-680).

O CCR5 humano (também denominado como "CCR5") é empregado pela maioria dos isolados primários de HIV-1 e é importante para o estabelecimento e manutenção da infecção. Além disso, a função de CCR5 é dispensável para saúde humana. Um alelo de CCR5 mutante, "CCR5  $\Delta$  32", codifica uma proteína não funcional, truncada (Samson, M., e outros, Nature 382 (1996) 722-725; Dean, M., e outros, Science 273 (1996) 1856-1862). Indivíduos homozigotos para a mutação não possuem expressão de CCR5 e são fortemente protegidos da infecção por HIV-1. Eles não demonstram não consequência de fenótipo e são altamente resistentes à infecção por HIV trópico M, considerando-se que os indivíduos heterozigotos apresentam progressão retardada da doença (Schwarz, M. K. e Wells, T.N., Nat. Rev. Drug Discov. 1 (2002) 347-358). A falta de CCR5 não aparenta consequências adversas, provavelmente porque CCR5 faz parte de uma rede de quimiocina altamente redundante como receptor para as  $\alpha$  quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES, que compartilham muitas funções de sobreposição e a maior parte das mesmas possuem receptores alternativos (Rossi, D. e Zlotnik, A., Annu. Rev. Immunol. 18 (2000) 217-242). A identificação de CCR5 como um correceptor de HIV-1 teve como base a capacidade de seus ligantes, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES de bloquear a infecção por R5, porém os não-isolados R5X4 ou X4 (Cocchi, F., e outros, Science 270 (1995) 1811-1815).

CCR5 é também um receptor de quimiocinas "em grupo" que são produzidas primariamente durante as respostas inflamatórias e controlam o recrutamento dos neutrófilos, macrófagos e subconjuntos de células T (células T auxiliares, Th1 e Th2). As respostas de Th1 são tipicamente aquelas envolvendo imunidade mediada por célula eficaz contra vírus e tumores,

por exemplo, considerando-se que se acredita que as respostas de Th2 estejam envolvidas em alergias. Portanto, os inibidores desses receptores de quimiocina podem ser úteis como imunomoduladores. Para respostas de Th1, as respostas superativas são amortecidas, por exemplo, na autoimunidade incluindo artrite reumatóide ou para respostas de Th2, ataques de asma ou respostas alérgicas incluindo dermatite atópica são diminuídos (vide, por exemplo, Schols, D., *Curr. Top. Med. Chem.* 4 (2004) 883-893; Mueller, A. e Strange, P.G., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 35-38; Kazmierski, W.M., e outros, *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2 (2002) 265-278; Lehner, T., *Trends Immunol.* 23 (2002) 347-351).

Anticorpos contra CCR5 são, por exemplo, PRO 140 (Olson, W.C., e outros, *J. Virol.* 73 (1999) 4145-4155) e 2D7 (Samson, M., e outros, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24934-24941). Anticorpos adicionais são mencionados na WO 2006/103100, US 2004/0043033, US 6.610.834, US 2003/0228306, US 2003/0195348, US 2003/0166870, US 2003/0166024, US 2003/0165988, US 2003/0152913, US 2003/0100058, US 2003/0099645, US 2003/0049251, US 2003/0044411, US 2003/0003440, US 6.528.625, US 2002/0147147, US 2002/0146415, US 2002/0106374, US 2002/0061834, US 2002/0048786, US 2001/0000241, EP 1 322 332, EP 1 263 791, EP 1 207 202, EP 1 161 456, EP 1 144 006, WO 2003/072766, WO 2003/066830, WO 2003/033666, WO 2002/083172, WO 02/22077, WO 01/58916, WO 01/58915, WO 01/43779, WO 01/42308.

O objetivo da invenção é prover novos anticorpos contra CCR5 que são usados primariamente como um agente terapêutico para AIDS.

## 25 Sumário da Invenção

A invenção compreende um anticorpo que se liga ao CCR5, caracterizado pelo fato de que o domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido de fórmula:

30 Gln-Val-Gln-Leu-X01-X02-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-X03-Pro-Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Ile-Thr-Cys-Thr-Val-Ser-Gly-Phe-Pro-Leu-Gly-Ala-Phe-Gly-Val-His-Trp-Val-Arg-Gln-Ser-Pro-Gly-Lys-Gly-X04-Glu-Trp-Leu-Gly-Val-Ile-Trp-Lys-Gly-Gly-Asn-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-X05-Ser-Arg-Leu-Arg-

Ile-Thr-Lys-Asp-Asn-Ser-Lys-Ser-Gln-Val-Phe-Phe-Arg-Met-Asn-Ser-Leu-  
Gln-Thr-Asp-Asp-Thr-Ala-X06-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Lys-Val-Asn-Leu-Ala-Asp-  
Ala-Met-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-X07-Val-X08-Val-Ser-Ser,

em que:

- 5 X01 é Lys ou Gln,  
X02 é Gln ou Glu,  
X03 é Arg ou Lys,  
X04 é Leu ou Pro,  
X05 é Met ou Lys,  
10 X06 é He ou Thr,  
X07 é Ser ou Thr,  
X08 é He ou Thr  
(SEQ ID NO:1).

- 15 Preferivelmente o anticorpo é caracterizado pelo fato de que o  
domínio variável de cadeia leve do dito anticorpo, compreende uma sequên-  
cia de aminoácido de fórmula:

Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val-  
Gly-Glu-Thr-Val- Thr-Ile-Thr-Cys-Arg-Ala-Ser-Gly-Asn-X10-His-Gly-Tyr-Leu-  
Ala-Trp-X11-Gln-Gln-Lys-X12-Gly-Lys-X13-Pro-X14-Leu-Leu-X15-Tyr-Asn-Thr-  
20 Lys-Thr-Leu-Ala-Glu-Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-  
X16-Phe-X17-X18-X19-Ile-X20-Ser-X21-Gln-Pro-Glu-Asp-Phe-X22-X23-Tyr-  
Tyr-Cys-Gln-His-His-Tyr-Asp-Leu-Pro-Arg-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Ls-X24-  
Glu-Ile-Lys,

em que:

- 25 X10 é Ile ou Ala,  
X11 é Phe ou Tyr,  
X12 é Gln ou Pro,  
X13 is Ser ou Ala,  
X14 é Gln ou Lys,  
30 X15 é Val ou Ile,  
X16 é Gln ou Asp,  
X17 é Ser ou Thr,

X18 é Leu ou Ala,  
X19 é Lys ou Thr,  
X20 é Asn ou Ser,  
X21 é Leu ou Ala,  
5 X22 é Gly ou Ala,  
X23 é Asn ou Thr,  
X24 é Leu ou Val  
(SEQ ID NO: 2).

Preferivelmente o anticorpo é caracterizado por ser do isotipo  
10 IgG4 humano ou do isotipo IgG1 humano, dito isotipo IgG1 sendo opcional-  
mente modificado na região de articulação na posição 216-240 do aminoáci-  
do entre C<sub>H</sub>1 e C<sub>H</sub>2 e/ou na segunda região de interdomínio, na posição 327-  
331 do aminoácido entre C<sub>H</sub>2 e C<sub>H</sub>3.

Uma modalidade preferida da invenção é uma composição far-  
15 macêutica compreendendo um anticorpo de acordo com a invenção.

Uma modalidade preferida da invenção é o uso de um anticorpo  
de acordo com a invenção para a fabricação de uma composição farmacêu-  
tica.

Uma modalidade preferida da invenção é um método para a fa-  
20 bricação de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo de  
acordo com a invenção.

Uma modalidade preferida da invenção é um ácido nucleico co-  
dificando um polipeptídeo capaz de se reunir com um segundo polipeptídeo,  
pelo que o dito segundo polipeptídeo compreende um polipeptídeo selecio-  
25 nado do grupo de polipeptídeos das SEQ ID NO: 2, 5 e considerando-se que  
o dito polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID  
NO: 1, 6, 7 ou 8.

Uma modalidade preferida da invenção é um método para o tra-  
tamento de um paciente que sofre de uma doença imunossupressora, carac-  
30 terizada pela administração ao paciente de uma quantidade terapêutica-  
mente eficaz de um anticorpo de acordo com a invenção.

O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente carac-

terizado pelo fato de que o dito anticorpo se liga ao CCR5 e compreende um domínio de cadeia pesada ou leve variável selecionado do grupo de domínios variáveis compreendendo domínios variáveis de cadeia pesada das SEQ ID NOs: 6, 7, 8, domínios variáveis de cadeia leve das SEQ ID NO: 9, 10 ou um fragmento de ligação de CCR5 do mesmo.

O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente caracterizado por conter como domínio variável de cadeia pesada, um domínio variável de cadeia pesada selecionado do grupo de domínios variáveis de cadeia pesada da SEQ ID NO: 6, 7 ou 8, ou um fragmento de ligação de CCR5 do mesmo e por conter como domínio variável de cadeia leve um domínio variável de cadeia leve selecionado do grupo de domínios variáveis de cadeia leve da SEQ ID NO: 9 ou 10, ou um fragmento de ligação de CCR5 do mesmo, onde os ditos domínios variáveis de cadeia pesada e leve são selecionados independentemente.

O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente caracterizado pelo fato de que o domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada das SEQ ID NOs: 6, 7, 8, para sermos mais precisos o anticorpo compreende uma sequência de aminoácido selecionada dos domínios variáveis de cadeia pesada da SEQ ID NO: 6, 7 ou 8, ou um fragmento de ligação de CCR5 do mesmo.

O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente caracterizado pelo fato de que o domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácido do domínio variável de cadeia leve das SEQ ID NOs: 9, 10, para sermos mais precisos, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácido selecionada dos domínios variáveis de cadeia leve da SEQ ID NO: 9 ou 10, ou um fragmento de ligação de CCR5 do mesmo.

O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente caracterizado pelo fato de que as regiões constantes (cadeias leves ou pesadas) são de origem humana. Tais regiões constantes (cadeias) são bem-

conhecidas no estado da técnica e são descritas, por exemplo, por Kabat (vide, por exemplo, Johnson, G. e Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218). Por exemplo, uma região constante de cadeia pesada humana útil compreende uma sequência de aminoácido independentemente selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 3, 4. Por exemplo, uma região constante de cadeia leve humana útil compreende uma sequência de aminoácido de uma região constante de cadeia leve capa da SEQ ID NO: 5. É adicionalmente preferido que o anticorpo seja originário de camundongo e compreenda um quadro de sequência variável de anticorpo de um anticorpo de camundongo de acordo com Kabat (vide, por exemplo, Johnson, G. e Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218).

Os anticorpos inibem uma ou mais funções do CCR5 humano, tais como, ligante unindo ao CCR5, atividade de sinalização (por exemplo, ativação de uma proteína G de mamífero, indução de um aumento rápido e transitório na concentração de  $Ca^{2+}$  livre citossólico e/ou estímulo de uma resposta celular (por exemplo, estimulação da quimiotaxia, excitose ou liberação de mediador inflamatório por leucócitos, ativação da integrina)). Os anticorpos inibem a ligação de RANTES, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, e/ou HIV ao CCR5 humano e inibem funções mediadas por CCR5 humano, tais como, tráfego de leucócito, entrada de HIV na célula, ativação da célula T, liberação do mediador inflamatório e/ou desgranulação de leucócito.

O anticorpo de acordo com a invenção se liga especificamente ao CCR5 humano e inibe a fusão de HIV com uma célula-alvo em um ensaio compreendendo contato das ditas células-alvo com o anticorpo, na presença do vírus com uma concentração de anticorpos eficaz para inibir fusão da membrana entre o vírus e a dita célula com um valor de  $IC_{50}$  de 4,0  $\mu\text{g/mL}$  ou menor.

O anticorpo de acordo com a invenção se liga especificamente ao CCR5 e inibe a fusão da membrana entre uma primeira célula coexpressando CCR5 e polipeptídeos CD4 e uma segunda célula expressando uma proteína ENV do HIV com um valor de  $IC_{50}$  de 1,5  $\mu\text{g/mL}$  ou menor, preferivelmente 0,3  $\mu\text{g/mL}$  ou menor.

O anticorpo de acordo com a invenção se liga especificamente ao CCR5 e inibe a estimulação de uma resposta celular em uma célula-alvo, preferivelmente inibe a migração, em um ensaio compreendendo contato da dita célula-alvo com o anticorpo na presença de RANTES, MIP-1 alfa, e/ou  
5 MIP-1 beta com um valor de IC50 de 1,5 µg/mL ou menor.

Um anticorpo de acordo com a invenção preferivelmente não inibe a ligação da quimiocina em um ensaio de ligação ao CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR6 e CXCR4 em uma concentração de anticorpos de até 100 µg/mL.

10 Um anticorpo de acordo com a invenção preferivelmente não estimula o aumento intracelular de Ca<sup>2+</sup>, detectado nas células CHO expressando CCR5 e Galfa 16 em uma concentração de anticorpos de até 50 µg/mL.

O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente do isótipo IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4 humano, pelo que IgG1 ou IgG4 são os preferidos.  
15

O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente do isótipo IgG4. O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente do isótipo IgG1. O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente do isótipo IgG4 com mutação S228P. O anticorpo de acordo com a invenção, isto é, a região constante de cadeia pesada e leve, é do isótipo IgG1 ou IgG4 modificado na região de articulação por volta da posição 216-240 do aminoácido, preferivelmente por volta da posição 220-240 do aminoácido entre C<sub>H</sub>1 e C<sub>H</sub>2 (Angal, S., e outros, Mol. Immunol. 30 (1993) 105-108), e/ou na segunda região de interdomínio por volta da posição 327-331 do aminoácido entre C<sub>H</sub>2 e C<sub>H</sub>3 (numeração de acordo com Kabat, vide, por exemplo, Johnson, G. e Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218). Tais modificações reduzem ou evitam a função efetora (ADCC e/ou CDC). A comutação da classe de IgG pode ser realizada por troca da região constante de cadeia pesada e domínio constante de cadeia leve do anticorpo por aqueles de um anticorpo da classe desejada, tal como, mutantes de IgG1 ou IgG4. Tais métodos são bem-conhecidos no estado da técnica.  
20  
25  
30

O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente caracterizado por ser da subclasse IgG1 humana, contendo pelo menos uma mutação em L234 (leucina na posição 234 do aminoácido), L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, e/ou P329 (numeração de acordo com o índice EU). Preferivelmente o anticorpo é do isotipo IgG1 humano compreendendo mutações L234A (alanina ao invés de leucina na posição 234 do aminoácido) e L235A. O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente caracterizado por ser do isotipo IgG4 humano contendo uma mutação na posição S228.

10 A invenção se refere, portanto, em um aspecto, aos anticorpos, caracterizada pelo fato de que o ditos anticorpos que se ligam ao CCR5, contêm uma parte Fc de origem humana e não se ligam ao fator de complemento humano C1q e/ou fator de complemento ativo C3. Preferivelmente os anticorpos mostram uma ligação reduzida ou não se ligam ao receptor Fcγ humano.

15 A invenção compreende, adicionalmente, uma molécula de ácido nucleico codificando uma cadeia de anticorpo, um domínio variável ou uma CDR do mesmo, de acordo com a invenção. Os polipeptídeos codificados são capazes de se reunir com outra respectiva cadeia de anticorpos para resultar em uma molécula de anticorpo contra CCR5 de acordo com a invenção.

20 A invenção provê, adicionalmente, vetores de expressão contendo o dito ácido nucleico de acordo com a invenção capazes de expressar o dito ácido nucleico em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica e células hospedeiras contendo tais vetores para a produção recombinante de tal anticorpo.

25 A invenção compreende, adicionalmente, uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica compreendendo um vetor de acordo com a invenção.

30 A invenção compreende, adicionalmente, um método para a produção de um anticorpo humano ou humanizado recombinante de acordo com a invenção, caracterizado por expressar um ácido nucleico de acordo

com a invenção em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica e recuperação do dito anticorpo da dita célula ou sobrenadante de cultura de célula. A invenção compreende, adicionalmente, o anticorpo obtido de tal método recombinante.

5 Os anticorpos de acordo com a invenção mostram benefícios para os pacientes que precisam da terapia de alvejamento de CCR5. Os anticorpos de acordo com a invenção possuem propriedades novas e inventivas que causam benefício ao paciente que sofre de tal doença, especialmente que sofrem de imunossupressão, especialmente de infecção por HIV.

10 A invenção provê, adicionalmente, um método para tratamento de um paciente que sofre de imunossupressão, especialmente de infecção por HIV, compreendendo administração a um paciente diagnosticado como sofrendo de tal doença (e, portanto, necessitando de tal terapia) de uma quantidade eficaz de um anticorpo que se liga ao CCR5 de acordo com a  
15 invenção. O anticorpo é administrado preferivelmente em uma composição farmacêutica.

A invenção compreende, adicionalmente, o emprego de um anticorpo de acordo com a invenção como um fármaco, para o tratamento de uma doença imunossupressora, preferivelmente para o tratamento de infecção por HIV, para o tratamento de um paciente que sofre de imunossupressão e para a fabricação de uma composição farmacêutica de acordo com a  
20 invenção. Além disso, a invenção compreende um método para a fabricação de uma composição farmacêutica de acordo com a invenção.

A invenção compreende, adicionalmente, uma composição farmacêutica contendo um anticorpo de acordo com a invenção em uma quantidade farmacêuticamente eficaz, opcionalmente em conjunto com um tampão e/ou um adjuvante útil para a formulação de anticorpos para fins farmacêuticos.  
25

A invenção provê, adicionalmente, composições farmacêuticas compreendendo tais anticorpos em um veículo farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade, a composição farmacêutica pode estar incluída em um artigo de fabricação ou kit.  
30

Portanto, um aspecto da presente invenção é um anticorpo de acordo com a invenção para emprego como um fármaco. Outro aspecto da invenção é um anticorpo de acordo com a invenção para emprego no tratamento de uma doença imunossupressora. Também um aspecto é o uso de um anticorpo de acordo com a invenção para a fabricação de um fármaco para o tratamento de uma doença imunossupressora.

#### Descrição Detalhada da Invenção

O termo "anticorpo" engloba as várias formas das estruturas de anticorpo incluindo, porém não limitado aos anticorpos inteiros e fragmentos de anticorpo. O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente um anticorpo humanizado, anticorpo quimérico, ou adicionalmente anticorpo construído geneticamente, à medida que as propriedades características da invenção sejam mantidas.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo de comprimento pleno, preferivelmente o domínio variável do mesmo ou pelo menos o sítio de ligação de antígeno do mesmo. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem diácorpos, moléculas de anticorpo de cadeia simples, imunotoxinas e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo. Anticorpos scFv são descritos, por exemplo, em Huston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88. Além disso, os fragmentos de anticorpo compreendem polipeptídeos de cadeia simples possuindo as características de um domínio  $V_H$ , a saber, são capazes de se reunirem a um domínio  $V_L$  ou a um domínio  $V_L$  que se liga ao CCR5, a saber, são capazes de se reunirem a um domínio  $V_H$ , a um sítio de ligação de antígeno funcional e, pelo que, provendo a propriedade de inibição da fusão da membrana ou fusão de HIV com uma célula-alvo.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal" conforme usados aqui, se referem a uma preparação de moléculas de anticorpo de uma composição de aminoácido simples. O termo "anticorpo quimérico" se refere a um anticorpo monoclonal compreendendo um domínio variável, isto é, região de ligação de um camundongo e pelo menos uma porção de uma região constante derivada de uma fonte ou espécies

diferentes, geralmente preparadas por técnicas de DNA recombinante. Os anticorpos quiméricos compreendendo um domínio variável de camundongo e região constante humana são especificamente preferidos. Tais anticorpos quiméricos de camundongo/seres humanos são produtos dos genes da imunoglobulina expressos compreendendo segmentos de DNA codificando domínios variáveis de imunoglobulina de camundongo e segmentos de DNA codificando regiões constantes de imunoglobulina humana. Outras formas de "anticorpos quiméricos" englobadas pela presente invenção são aquelas nas quais a classe ou subclasse foi modificada ou alterada daquela do anticorpo original. Tais anticorpos "quiméricos" são também referidos como "anticorpos de classe comutada". Os métodos para produção dos anticorpos quiméricos envolvem técnicas convencionais de DNA recombinante e de transfecção genética bem-conhecidas na técnica. Vide, por exemplo, Morrison, S.L., e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; Patentes US números 5.202.238 e 5.204.244.

O termo "anticorpo humanizado" se refere aos anticorpos nos quais a estrutura e/ou "regiões de determinação de complementaridade" (CDR) foram modificadas para compreenderem a CDR de uma imunoglobulina de diferentes espécies em comparação aquelas da imunoglobulina de origem. Em uma modalidade preferida, uma CDR de camundongo é enxertada na região de estrutura de um anticorpo humano para preparar o "anticorpo humanizado". Vide, por exemplo, Riechmann, L, e outros, Nature 332 (1988) 323-327; e Neuberger, M.S., e outros, Nature 314 (1985) 268-270. CDRs especificamente preferidas correspondem aquelas representando sequências reconhecendo os antígenos observados acima para anticorpos quiméricos e bifuncionais.

O termo "que se liga ao CCR5" conforme usado aqui, significa ligação do anticorpo ao CCR5 em uma célula com base no ensaio ELISA *in vitro* (células expressando CCR5, por exemplo, células CHO transformadas, células L1.2). A ligação é obtida se o anticorpo causar uma taxa de S/N (sinal/transmissão) de 5 ou mais, preferivelmente de 10 ou mais, em uma concentração de anticorpos de 100 ng/mL.

O termo "estrutura de quimiocina de sete transmembranas" conforme empregado nesse documento se refere à estrutura natural que CCR5 mostra quando é posicionado na bicamada da membrana celular (vide, por exemplo, Oppermann, M., Cell. Sig. 16 (2004) 1201-1210). Como outros receptores acoplados à proteína G (por exemplo, receptor 1b acoplado à proteína G), CCR5 é composto de um domínio de terminal N extracelular, um domínio de transmembrana e um domínio de terminal C citoplasmático. O domínio de transmembrana consiste em sete segmentos de transmembrana hidrófobos, ligados por três segmentos citoplasmáticos e três segmentos extracelulares. O anticorpo de acordo com a invenção se liga ao CCR5 em sua estrutura de quimiocina de sete transmembranas.

O termo "epítopo" indica um determinante de proteína capaz de se ligar especificamente a um anticorpo. Os epítopos geralmente consistem em grupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas, tais como, aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e geralmente os epítopos possuem características de estrutura tridimensional, bem como características de carga específica. Epítopos conformacionais e não-conformacionais são distinguidos pelo fato de que a ligação ao anterior, porém não ao último se perde na presença de solventes desnaturantes. Preferivelmente, um anticorpo de acordo com a invenção se liga especificamente ao CCR5 nativo, porém não-desnaturado.

O termo "fusão de membrana" se refere à fusão entre uma primeira célula coexpressando CCR5 e polipeptídeos de CD4 e uma segunda célula expressando uma proteína ENV do HIV. A fusão da membrana é determinada por ensaio gênico de repórter de luciferase.

O termo "inibição de fusão de HIV com uma célula-alvo" se refere à inibição da fusão de HIV com uma célula-alvo medida em um ensaio compreendendo contato da célula-alvo com o anticorpo na presença do dito vírus com uma concentração de anticorpos eficazes para inibir a fusão da membrana entre o vírus e a dita célula e a medição da atividade gênica do repórter de luciferase.

O "domínio variável" (domino variável de uma cadeia leve ( $V_L$ ),

domínio variável de uma cadeia pesada ( $H_V$ ), conforme usado aqui, indica que cada par dos domínios de cadeia leve e pesada está envolvido diretamente na ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios de cadeia leve e pesada variáveis possuem a mesma estrutura geral e cada domínio compreende quatro regiões de estrutura (FR), cujas sequências são amplamente conservadas, conectadas por três "regiões hipervariáveis" (ou regiões de determinação de complementaridade, CDRs). As regiões de estrutura adotam uma conformação de folha- $\beta$  e as CDRs podem formar laços conectando à estrutura de folha- $\beta$ . As CDRs em cada cadeia são mantidas em sua estrutura tridimensional pelas regiões de estrutura e constituem, em conjunto com as CDRs da outra cadeia, o sítio de ligação de antígeno. As regiões de CDR3 de cadeia pesada e leve do anticorpo desempenham um papel especificamente importante na especificidade/afinidade de ligação dos anticorpos de acordo com a invenção e, portanto, fornecem um objetivo adicional da invenção.

O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo compreende um domínio variável de cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve selecionado do grupo de combinações consistindo em:

- a) o domínio variável de cadeia pesada definido pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 6 e o domínio variável de cadeia leve definido pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 9;
- b) o domínio variável de cadeia pesada definido pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 6 e o domínio variável de cadeia leve definido pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 10;
- c) o domínio variável de cadeia pesada definido pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 7 e o domínio variável de cadeia leve definido pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 9;
- d) o domínio variável de cadeia pesada definido pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 7 e o domínio variável de cadeia leve definido pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 10;
- e) o domínio variável de cadeia pesada definido pela sequência

de aminoácido da SEQ ID NO: 8 e o domínio variável de cadeia leve definido pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 9;

f) o domínio variável de cadeia pesada definido pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8 e o domínio variável de cadeia leve definido pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 10.

O termo "porção de ligação de antígeno de um anticorpo" quando usado nesse documento, se refere aos resíduos de aminoácido de um anticorpo que são sensíveis à ligação do antígeno. A porção de ligação de antígeno de um anticorpo compreende resíduos de aminoácido das "regiões de determinação de complementaridade" ou "CDRs". Regiões de "estrutura" ou "FR" são aquelas regiões de domínio variável que os resíduos de região hipervariável conforme definido aqui neste documento. Portanto, os domínios variáveis de cadeia leve e pesada de um anticorpo compreendem dos domínios de terminal N a C, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. Especificamente, CDR3 de cadeia leve é a região que contribui mais para a ligação do antígeno e define as propriedades do anticorpo. As regiões CDR e FR são determinadas de acordo com a definição padrão de Kabat e outros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Publicação número 91-3242 (1991) e/ou aqueles resíduos de um "laço hipervariável".

Os termos "ácido nucleico" ou "molécula de ácido nucleico" conforme empregados aqui se destinam a incluir moléculas de DNA e moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de filamento simples ou filamento duplo, porém preferivelmente é um DNA de filamento duplo.

O termo "aminoácido" conforme usado neste pedido indica o grupo de carbóxi  $\alpha$ -aminoácidos ocorrendo naturalmente compreendendo alanina (código de três letras: ala, código de uma letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutâmico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptofano (trp, W), tirosina (try, Y) e valina (Val, V).

Um ácido nucleico é "ligado operavelmente" quando ele é colocado em uma relação funcional com outro ácido nucleico. Por exemplo, DNA para uma pré-sequência ou líder secretor é operavelmente ligado ao DNA para um polipeptídeo, se este for expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipeptídeo; um promotor ou melhorador é operativamente ligado a uma sequência de codificação se este afetar a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação de ribossomo é operativamente ligado a uma sequência de codificação, se este for posicionado de modo a facilitar a tradução. Geralmente, "ligada operativamente" significa que as sequências de DNA sendo ligadas são colineares e, no caso de um líder secretor, contínuas e na leitura do quadro. Contudo, os melhoradores não precisam ser contínuos. A ligação é realizada por ligação em sítios de restrição convenientes. Caso esses sítios não existam, os adaptadores de oligonucleotídeos sintéticos ou ligantes são usados de acordo com a prática convencional.

Conforme usado aqui, as expressões "célula", "linhagem de célula" e "cultura de célula" são usadas intercambiavelmente e todas tais designações incluem progênie. Assim, as palavras "transformantes" e "células transformadas" incluem a célula primária do indivíduo e culturas derivadas da mesma, sem considerar o número de transferências. É também entendido que toda a progênie pode não ser precisamente idêntica ao teor de DNA, em razão das mutações deliberadas ou inadvertidas. São incluídas progênies variantes que possuem a mesma função ou atividade biológica conforme classificada na célula originalmente transformada.

A "parte Fc" de um anticorpo não está envolvida diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, porém exibe várias funções efetoras. Dependendo da sequência de aminoácido da região constante de suas cadeias pesadas, os anticorpos ou imunoglobulinas são divididos nas classes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e várias dessas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG em IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA em IgA1 e IgA2. De acordo com as regiões constantes de cadeia pesada, as diferentes classes de imunoglobulinas são denominadas,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  e  $\mu$ , respectivamente. Os anticorpos de acordo com a invenção são preferivelmente

do tipo IgG.

Conforme usado aqui, o termo "parte Fc derivada de origem humana" indica uma parte Fc que é tanto uma parte Fc de anticorpo humano da subclasse IgG4 ou uma parte Fc de um anticorpo humano da subclasse  
5 IgG1, IgG2, ou IgG3, incluindo as formas mutadas das mesmas. Preferivelmente, a parte Fc de um anticorpo humano da subclasse IgG1, IgG2 ou IgG3 é modificada, de modo que uma ligação reduzida ou sem receptor Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R, isto é, Fc $\gamma$ RIIIa) e/ou uma ligação reduzida ou sem-C1q conforme definida a seguir pode ser detectada com relação à parte Fc não-modificada.  
10 Uma "parte Fc de um anticorpo" é um termo bem-conhecido dos versados na técnica e definida com base na clivagem da papaína dos anticorpos. Os anticorpos de acordo com a invenção contêm como parte Fc uma parte Fc derivada de origem humana e preferivelmente todas as outras partes da região constante humana. Preferivelmente, a parte Fc é uma parte Fc humana  
15 e especialmente preferido tanto de subclasse IgG4 humana quanto subclasse IgG1 humana, ou uma parte Fc mutada da subclasse IgG1 humana. Mais preferidas são as partes Fc e região de constante de cadeia pesada mostrada nas SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 3 com mutações L234A e L235A, SEQ ID NO: 4 com mutação S228P.

20 Embora IgG4 mostre ligação de receptor de Fc $\gamma$  reduzida (Fc $\gamma$ RIIIa), os anticorpos de outra subclasse de IgG mostram ligações fortes. Contudo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (perda de carboidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435 são reduzidos que, se alterados, fornecem também  
25 ligação do receptor de Fc reduzida (Shields, R.L., e outros, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591- 6604; Lund, J., e outros, FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., e outros, Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434). Preferivelmente um anticorpo de acordo com a invenção é considerado para ligação do receptor Fc $\gamma$  da subclasse IgG4, ou uma subclasse IgG1 ou IgG2,  
30 com uma mutação em S228, L234A, L235A, L235E, e/ou D265 e/ou PVA236 (PVA236 significa que a sequência de aminoácido ELLG (fornecida em um código de aminoácido de uma letra) da posição 233 a 236 do aminoácido de

IgG1 ou EFLG de IgG4 sendo substituída por PVA). Especialmente preferidas são as mutações S228P de IgG4 e L234A, L235A de IgG1.

A parte Fc de um anticorpo está diretamente envolvida na ADCC (citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo) e CDC (citotoxicidade dependente de complemento). A ativação de complemento (CDC) é iniciada por ligação do fator de complemento C1q à parte Fc da maioria das subclasses de anticorpo IgG. A ligação de C1q a um anticorpo é causada por interações proteína-proteína definidas no assim chamado sítio de ligação. Tais sítios de ligação da parte Fc são conhecidos no estado da técnica e descritos por Lukas, T.J. , e outros, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R. and Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., e outros, Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., e outros, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., e outros, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., e outros, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., e outros, Immunology 86 (1995) 319-324; e EP 0 307 434. Tais sítios de ligação da parte Fc são, por exemplo, caracterizados pelos aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 e P329 (numeração de acordo com o índice EU de Kabat). Anticorpos das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 geralmente mostram ativação de complemento incluindo ligação de C1q e C3 considerando-se que IgG4 não ativa o sistema complemento e não liga C1q e C3.

Isto é, nos casos onde ADCC e/ou CDC é/são necessárias, uma parte Fc da subclasse IgG1 é preferida, nos casos onde ADCC reduzida ou nenhuma ADCC e/ou CDC é/são necessárias, uma parte Fc da subclasse IgG4 ou subclasse IgG1 modificada/mutada é preferida. A presente invenção se refere em um aspecto a um anticorpo que se liga ao CCR5 e mostra ligação reduzida ou não mostra ligação ao receptor de Fc $\gamma$  e/ou fator de complemento C1q. Um anticorpo anti-CCR5 que não se liga ao receptor de Fc e/ou fator de complemento C1q não promove a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC), considerando-se que, um anticorpo anti-CCR5, que mostra ligação reduzida ao receptor de Fc e/ou fator de complemento C1q, mostra uma

ADCC e/ou CDC reduzida. Preferivelmente, tal anticorpo é caracterizado pelo fato de que ele se liga ao CCR5, contém uma parte Fc derivada de origem humana e não se liga ou mostra uma ligação reduzida de receptores Fc e/ou fator de complemento C1q. Mais preferivelmente, esse anticorpo é um anticorpo humano ou humanizado ou um anticorpo isento de antígeno de célula T. A ligação C1q pode ser medida de acordo com Idusogie, E.E., e outros, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184. Nenhuma "ligação C1q" é encontrada se em tal ensaio a densidade óptica (OD) a 492-405 nm for para o anticorpo de teste inferior a 15% do valor da ligação de C1q humana da parte de Fc de anticorpo do tipo selvagem não modificado, a uma concentração de anticorpos de 8 µg/mL. "Ligação C1q" reduzida está na faixa de 15% a 30% do valor para ligação C19 humana da parte Fc de anticorpo do tipo selvagem não modificado nas mesmas condições. ADCC pode ser medida como ligação do anticorpo à FcγRIIIa humana nas células NK humanas. A ligação é determinada em uma concentração de anticorpos de 20 µg/mL. "Nenhuma ligação de receptor Fcγ" ou "nenhuma ADCC" significa uma ligação de até 30% ao FcγIIIa humano nas células NK humanas em uma concentração de anticorpos de 20 µg/mL em comparação à ligação do mesmo anticorpo com IgG1 humana (SEQ ID NO: 3). "Ligação de receptor Fcγ reduzida" ou "ADCC reduzida" significa uma ligação de 30% até 60% do FcγIIIa humano nas células NK humanas em comparação à ligação do mesmo anticorpo como IgG1 humana (SEQ ID NO:3).

Outro aspecto da presente invenção é um anticorpo que se liga a CCR5 e também se liga ao receptor Fcγ e/ou fator complemento C1q. Um anticorpo anti-CCR5 que se liga ao receptor de Fc e/ou fator de complemento C1q não promove citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Preferivelmente, esse anticorpo é caracterizado pelo fato de que ele se liga ao CCR5, contém uma parte Fc derivada de origem humana e também se liga aos receptores de Fc e/ou fator de complemento C1q. Mais preferivelmente, esse anticorpo é um anticorpo humano ou humanizado ou um antígeno isento de antígeno de célula T. A ligação de C1q pode ser medida de acordo com Idusogie,

E.E., e outros, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184. ADCC pode também ser medida como ligação do anticorpo ao FcγRIIIa humano nas células NK humanas. A libação é determinada em uma concentração de anticorpo de 20 µg/mL.

5 Os anticorpos de acordo com a invenção incluem, além disso, anticorpos possuindo "modificações de sequência conservadora" (anticorpos variantes), modificações de nucleotídeo e sequência de aminoácido, que não afetam ou alteram as características mencionadas acima do anticorpo de acordo com a invenção. As modificações podem ser introduzidas por técnicas-padrão conhecidas na técnica, tais como, mutagênese direcionada ao  
10 sítio e mutagênese mediada por PCR. Substituições de aminoácido conservadoras incluem aquelas nas quais o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido possuindo uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácido possuindo cadeias laterais similares foram  
15 definidas na técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas, (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não-carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (por exemplo,  
20 alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais ramificadas beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim um resíduo de aminoácido não-essencial previsto em um anticorpo anti-CCR5 humano pode ser preferivelmente substituído por outro resíduo  
25 de aminoácido a partir da mesma família de cadeia lateral. Um anticorpo anti-CCR5 "variante" se refere, nesse documento, a uma molécula que difere na sequência de aminoácido de uma sequência de aminoácido de anticorpo anti-CCR5 "de origem" em até dez, preferivelmente de cerca de duas a cerca de cinco, adições, deleções e/ou substituições em uma ou mais regiões  
30 variáveis do anticorpo de origem. Substituições de aminoácido podem ser realizadas por mutagênese com base na modelagem molecular, conforme descrito por Riechmann, L., e outros, Nature 332 (1988) 323-327 e Queen,

C, e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033.

Uma modalidade adicional da invenção é um método para a produção de um anticorpo contra CCR5 que não se liga ou mostra uma ligação reduzida ao receptor de Fc $\gamma$  e/ou C1q, caracterizado pelo fato de que a

5 sequência de um ácido nucleico codificando a cadeia pesada de um anticorpo do tipo IgG1 humano que se liga ao CCR5 é modificada de modo que o dito anticorpo modificado não se liga ou mostra uma ligação reduzida de C1q e/ou receptor Fc $\gamma$ , dito ácido nucleico modificado e o ácido nucleico codificando a cadeia leve do anticorpo sendo inseridos em um vetor de expres-

10 são, o vetor sendo inserido em uma célula hospedeira eucariótica, a proteína codificada é expressa e recuperada da célula hospedeira ou do sobrenadante. Preferivelmente, o anticorpo é modificado por "comutação de classe" isto é, alteração ou mutação da parte de Fc (por exemplo, mutação de IgG1 em IgG4, e/ou IgG1/IgG4) preferivelmente definida como IgG1v1 (PVA-236; GLPSS331), IgG1v2 (L234A; L235A), IgG1v3 (S228P; L235E), IgG1x (S228P), IgG4v1 (PVA- 236). GLPSS331 significa as mutações E233P, L234V, L235A, delta G236, A327G, A330S, P331S.

15

A identidade ou homologia com relação à sequência é definida nesse documento como a porcentagem dos resíduos de aminoácido na sequência candidata, que são idênticos à sequência de origem, após alinhamento das sequências e introdução de fendas, caso necessário, para obter a porcentagem máxima de identidade de sequência. Nenhuma das extensões de terminal N, terminal C ou extensões internas, deleções ou inserções na sequência de anticorpo devem ser tidas como afetando a identidade ou ho-

20 mologia da sequência. A variante mantém a capacidade de se ligar ao CCR5 humano e preferivelmente possui propriedades, que são superiores as do anticorpo de origem. Por exemplo, a variante pode ter efeitos colaterais reduzidos durante o tratamento.

25

O anticorpo "de origem" nesse documento é um que é codificado por uma sequência de aminoácido usada para a preparação da variante. Preferivelmente, o anticorpo de origem possui uma região de estrutura hu-

30 mana e, caso presente, possui uma região constante de anticorpo humano

ou domínios constantes de anticorpo humano. Por exemplo, o anticorpo de origem pode ser um anticorpo humanizado ou humano.

Os anticorpos de acordo com a invenção são produzidos, preferivelmente, por meios recombinantes. Tais métodos são amplamente conhecidos no estado da técnica e compreendem expressão de proteína nas células procarióticas e eucarióticas com isolamento subsequente do polipeptídeo de anticorpo e geralmente purificação a uma pureza farmacologicamente aceitável. Para a expressão da proteína, os ácidos nucleicos codificando cadeias leves e pesadas ou fragmentos das mesmas são inseridos nos vetores de expressão por métodos padrão. A expressão é realizada nas células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas apropriadas, tais como, células CHO, células BHK, células PER.C6<sup>®</sup>, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levedura ou células *E.coli* e o anticorpo é recuperado das células (a partir do sobrenadante ou após lise celular).

A produção recombinante dos anticorpos é bem-conhecida no estado da técnica e descrita, por exemplo, nos artigos revistos de Makrides, S. C, *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., e outros, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-160; Werner, R.G., *Arzneimittelforschung-Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

Os anticorpos podem estar presentes nas células integrais, em um lisado de células ou na forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. A purificação é realizada a fim de eliminar outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos celulares ou proteínas, por técnicas-padrão, incluindo tratamento com alcalino/SDS, associando CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese de gel agarose e outros bem-conhecidos na técnica. Vide, Ausubel, F., e outros, (ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

A expressão nas células NSO é descrita, por exemplo, em Barnes, L.M., e outros, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., e outros, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. A expressão transitória é descrita, por exemplo, em Durocher, Y., e outros, *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. A

clonagem de domínios variáveis é descrita por Orlandi, R., e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., e outros, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Um sistema de expressão transitória preferida  
5 (HEK 293) é descrito por Schlaeger, E.-J. e Christensen, K., em Cytotechnology 30 (1999) 71-83 e by Schlaeger, E.-J., em J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

Os anticorpos monoclonais são apropriadamente separados do meio de cultura por procedimentos de purificação de imunoglobulina con-  
10 vencionais, tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidróxiapatita, eletroforese de gel, diálise ou cromatografia de afinidade. DNA e RNA codificando os anticorpos monoclonais são prontamente isolados e sequenciados usando procedimentos convencionais. As células de hibridoma podem servir como uma fonte de tal DNA e RNA. Uma vez isola-  
15 do, o DNA pode ser inserido nos vetores de expressão, que são então transfectados para dentro das células hospedeiras, tais como, células HEK 293, células CHO ou células de mieloma que de outra forma não produzem a proteína da imunoglobulina, para obter a síntese dos anticorpos monoclonais recombinantes nas células hospedeiras.

20 As variantes da sequência de aminoácido do anticorpo CCR5 humano são preparadas por introdução de alterações de nucleotídeo apropriadas dentro do anticorpo codificando DNA ou por síntese de peptídeo. Tais modificações podem ser realizadas, contudo, apenas em uma faixa muito limitada, por exemplo, conforme descrito acima. Por exemplo, as modi-  
25 ficações não alteram as características do anticorpo mencionado anteriormente, tais como, ligação do isótipo e epítipo de IgG, porém podem aperfeiçoar o rendimento da produção recombinante, estabilidade da proteína ou facilitar a purificação.

Qualquer resíduo de cisteína não-envolvido na manutenção da  
30 conformação apropriada do anticorpo anti-CCR5 pode também ser substituído, geralmente com serina, para aperfeiçoar a estabilidade oxidativa da molécula e para impedir reticulação aberrante. De modo contrário, a(s) liga-

ção(ões) de cisteína pode(m) ser adicionada(s) ao anticorpo para aperfeiçoar sua estabilidade (especificamente quando o anticorpo for um fragmento de anticorpo, tal como um fragmento de Fc).

Outro tipo de variante de aminoácido do anticorpo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo. "Altera" significa a remoção de uma ou mais frações de carboidrato encontradas no anticorpo e/ou adição de um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no anticorpo. A glicosilação dos anticorpos é tipicamente ligada em N. O termo "ligado em N" se refere à anexação da fração de carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências de tripeptídeo asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido, exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para anexação enzimática da fração de carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Assim, a presença de cada uma dessas sequências de tripeptídeo em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação em potencial. A adição dos sítios de glicosilação ao anticorpo é convenientemente realizada por alteração da sequência de aminoácido, tal que ela contém uma ou mais das sequências de tripeptídeo descritas acima (para os sítios de glicosilação ligados em N).

Moléculas de ácido nucleico codificando variantes de sequência de aminoácido do anticorpo anti-CCR5 são preparadas por vários métodos conhecidos na técnica. Esses métodos incluem, porém não estão limitados ao isolamento de uma fonte natural (no caso de variantes da sequência de aminoácido ocorrendo naturalmente) ou preparação por mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou direcionada ao sítio), mutagênese de PCR e mutagênese de cassete de uma variante preparada anteriormente ou uma versão não-variante do anticorpo anti-CCR5 humanizado.

Outro tipo de modificação covalente envolve glicosídeos que se acoplam química ou enzimaticamente ao anticorpo. Esses procedimentos são vatanjosos pelo fato de que eles não requerem a produção do anticorpo em uma célula hospedeira que é capaz de glicosilação ligada em N ou O. Dependendo do modo de acoplamento usado, o(s) açúcar(es) pode(m) ser anexado(s) à (a) arginina e/ou histidina, (b) grupos carboxila livres, (c) gru-

pos sulfidrilas livres, tais como, aqueles da cisteína, (d) grupos hidroxila livres, tais como aqueles da serina, treonina ou hidroxiprolina, (e) resíduos aromáticos, tais como aqueles da fenilalanina, tirosina ou triptofano ou (f) o grupo amida da glutamina. Esses métodos são descritos na WO 87/05330 e em  
5 Aplin, J.D. e Wriston, J.C. Jr., *CRC Crit. Rev. Biochem.* 10 (1981) 259-306.

A remoção de quaisquer frações de carboidrato presentes no anticorpo podem ser realizadas química ou enzimaticamente. A desglicosilação química requer exposição do anticorpo ao composto ácido trifluor metanossulfônico ou um composto equivalente. Esse tratamento resulta na clivagem da maioria ou de todos os açúcares com exceção do açúcar de ligação  
10 (N-acetilglicosamina ou N-acetil galactosamina), enquanto deixando o anticorpo intacto. Desglicosilação química conforme descrito por Sojar, H.T. e Bahl, O.P., *Arch. Biochem. Biophys.* 259 (1987) 52-57; Edge, A.S., e outros *Anal. Biochem.* 118 (1981) 131-137. A clivagem enzimática das frações de  
15 carboidrato nos anticorpos pode ser obtida por emprego de uma variedade de endo e exoglicosidases, conforme descrito por Thotakura, N.R. e Bahl, O.P., *Meth. Enzymol.* 138 (1987) 350-359.

Outro tipo de modificação covalente do anticorpo compreende a ligação do anticorpo a um dos vários polímeros não-proteináceos, por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol ou polioxialquilenos, do modo estabelecido nas Patentes US números 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; 4.179.337.

Os domínios variáveis de cadeia pesada e leve de acordo com a invenção são combinados com sequências do promotor, início da tradução, região constante, região 3' não-traduzida, poliadenilação e terminação de  
25 transcrição para formar construções de vetor de expressão. As construções de expressão de cadeia leve e pesada podem ser combinadas em um vetor simples, cotransfectado, transfectado em série ou transfectado separadamente dentro das células hospedeiras que são então fundidas de modo a  
30 formar uma célula hospedeira simples expressando ambas as cadeias.

A invenção compreende, adicionalmente, o uso de um anticorpo de acordo com a invenção para o diagnóstico da suscetibilidade à AIDS *in*

*vitro*, preferivelmente por um ensaio imunológico determinando a ligação entre CCR5 solúvel de uma amostra de plasma humano (Tsimanis, T., Immunology Letters 96 (2005) 55-61) e o anticorpo de acordo com a invenção. A expressão de CCR5 possui uma correlação com a progressão da doença e pode ser usada para identificar indivíduos com risco alto ou baixo com relação à suscetibilidade à AIDS. Para fins de diagnóstico, os fragmentos de ligação dos anticorpos ou antígenos podem ser marcados ou não-marcados. Tipicamente, os ensaios de diagnóstico detectam a formação de um complexo resultante da ligação de um fragmento de anticorpo ou anticorpo ao C-  
5  
10 CR5.

Em outro aspecto, a presente invenção provê uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais ou a porção de ligação de antígeno dos mesmos, da presente invenção, formulada em conjunto com um veículo farmacologicamente aceitável.  
15

Conforme usado aqui, "veículo farmacologicamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de absorção/reabsorção e similares que são fisiologicamente compatíveis. Preferivelmente, o veículo é apropriado para injeção ou infusão.  
20

A composição da presente invenção pode ser administrada por vários métodos conhecidos na técnica. Conforme será apreciado pelos versados na técnica, a via e/ou modo de administração variará dependendo dos resultados desejados.  
25

Veículos farmacologicamente aceitáveis incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões e pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis ou dispersão. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacologicamente ativas é conhecido na técnica. Além da água, o veículo pode se, por exemplo, uma solução de salmoura tamponada isotônica.  
30

Independente da via de administração selecionada, os compostos da presente invenção que podem ser usados em uma forma hidratada apropriada e/ou as composições farmacêuticas da presente invenção são

formuladas em formas de dosagem farmacologicamente aceitáveis por métodos convencionais conhecidos dos versados na técnica.

Níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem variar de modo a se obter  
5 uma quantidade de ingrediente ativo que seja eficaz para obter a resposta terapêutica desejada para um paciente específico, composição e modo de administração, sem ser tóxicos ao paciente (quantidade eficaz). O nível de dosagem selecionado dependerá de vários fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições específicas da presente invenção empregadas,  
10 ou do éster, sal ou amida das mesmas, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto específico sendo empregado, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições específicas empregadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico anterior do paciente sendo tratado e fatores  
15 similares bem-conhecidos das técnicas médicas.

A invenção compreende o uso dos anticorpos de acordo com a invenção para o tratamento de um paciente que sofre de imunossupressão, tal como imunossupressão em um paciente com síndromes de imunodeficiência, tal como, AIDS, em um paciente sofrendo terapia por radiação, quimio-  
20 terapia, terapia para doença autoimune ou outra terapia medicamentosa (por exemplo, terapia com corticosteróide), que causa imunossupressão ou para o tratamento de um paciente que sofre de GvHD ou HvGD (por exemplo, após transplante). A invenção compreende também um método para o tratamento de um paciente que sofre de tal imunossupressão.

A invenção provê, adicionalmente, um método para a fabricação de uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de um anticorpo, de acordo com a invenção, em conjunto com um veículo farmacologicamente aceitável e o uso do anticorpo de acordo com a invenção para um tal método. A invenção também provê um anticorpo de acordo com  
25 a invenção para uso como um fármaco. Também é fornecido um anticorpo de acordo com a invenção para o tratamento de uma doença imunossupressora.  
30

A invenção provê, adicionalmente, o emprego de um anticorpo de acordo com a invenção em uma quantidade eficaz para a fabricação de um agente farmacêutico, preferivelmente em conjunto com um veículo farmacologicamente aceitável, para o tratamento de um paciente que sofre de imunossupressão.

A invenção também provê o emprego de um anticorpo de acordo com a invenção em uma quantidade eficaz para a fabricação de um agente farmacêutico, preferivelmente em conjunto com um veículo farmacologicamente aceitável, para o tratamento de um paciente que sofre de liberação de mediador inflamatório mediada por CCR5.

Os exemplos que se seguem e a listagem de sequências são fornecidos para auxiliar no entendimento da presente invenção, o escopo verdadeiro da mesma sendo estabelecido nas reivindicações apenas. Fica entendido que modificações podem ser feitas nos procedimentos estabelecidos, sem com isto fugir do espírito da invenção.

#### Descrição das Sequências

SEQ ID NO: 1 Fórmula I, cadeia pesada, domínio variável  
SEQ ID NO: 2 Fórmula II, cadeia pesada, domínio variável  
SEQ ID NO: 3  $\gamma 1$  região constante de cadeia pesada  
SEQ ID NO: 4  $\gamma 4$  região constante de cadeia pesada  
SEQ ID NO: 5  $\kappa$  região constante de cadeia leve  
SEQ ID NO: 6 domínio variável de cadeia pesada  
SEQ ID NO: 7 domínio variável de cadeia pesada  
SEQ ID NO: 8 domínio variável de cadeia pesada  
SEQ ID NO: 9 domínio variável de cadeia leve  
SEQ ID NO: 10 domínio variável de cadeia leve

#### Exemplo 1

##### Produção de anticorpos recombinantes

Vetores para a expressão de anticorpos de acordo com a invenção foram construídos como se segue. Um vetor de expressão de cadeia pesada foi construído por ligação de um domínio variável de cadeia pesada à região constante de IgG1 humano (SEQ ID NO: 3) no vetor de expressão

pSVgpt. Um vetor de expressão de cadeia pesada foi construído por ligação de um domínio variável de cadeia leve à região constante de cadeia leve capa humana (SEQ ID NO: 5) no vetor de expressão pSVhyg. A sequência de flanqueamento 5' incluindo o peptídeo de sinal líder, íntron líder e promotor de imunoglobulina de murino e a sequência de flanqueamento 3' incluindo o sítio de Splice e sequência de íntron foram introduzidas usando os vetores VH-PCR1 e VK-PCR1 como gabaritos. Os vetores de expressão de cadeia pesada e leve foram cotransfectados dentro das células NS0 (ECACC número 85110503, uma não-imunoglobulina que produz mieloma de camundongo). Clones de células transfectadas foram classificados quanto à produção de anticorpo humano por ELISA para IgG humana.

### Exemplo 2

#### Construção de plasmídeos de expressão para anticorpos anti-CCR5 mutantes (variantes)

Plasmídeos de expressão codificando cadeias leves e pesadas de anticorpo anti-CCR mutante foram criadas por mutagênese direcionada ao sítio dos plasmídeos de expressão empregando o kit de mutagênese direcionado ao sítio QuickChange<sup>®</sup> (Stratagene) e são descritos na tabela 1. Os aminoácidos são numerados de acordo com a numeração EU (Edelman, G.M., e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., e outros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD, Publicação número 91-3242 (1991)).

A tabela 1 mostra mutantes de cadeias constantes (Fc).

Tabela 1:

Isotipo	Abreviatura	Mutações	Descrição
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A	A sequência de aminoácido Leu <sub>234</sub> Leu <sub>235</sub> da cadeia pesada $\gamma$ 1 humana é substituída pela sequência de aminoácido Ala <sub>234</sub> Ala <sub>235</sub> .

Explicação das mutações: L234A significa que a leucina na posição 234 de Kabat do aminoácido é alterada para alanina.

### Exemplo 3

#### Ensaio de fusão célula-a-célula

No dia 1, células HeLa expressando gp160 ( $2 \times 10^4$  células/50  $\mu$ L/cavidade) foram semeadas em uma placa de microtitulação de 96 cavi-

dades branca em meio DMEM suplementado com FCS a 10% (v/v) e 2 µg/mL de doxiciclina. No dia 2, 100 µl de amostra de sobrenadante ou controle de anticorpo por cavidade foram adicionados em uma placa de microtitulação de 96 cavidades limpa. Então 100 µL contendo células de suspensão  $8 \times 10^4$  CEM-NKr-Luc em meio foram adicionados e incubados por 30 minutos a 37°C. O meio de cultura da célula HeLa foi aspirado da placa de 96 cavidades, 100 µL da mistura de 200 µl de anticorpo/CEM-NKr-Luc foram adicionados e incubados por toda a noite a 37°C. No dia 3, 100 µL/cavidade de substrato de ensaio de luciferase Bright-Glo® (1,4-ditiotreitol e ditionitrato de sódio; Promega Corp., USA) foram adicionados e a luminescência foi medida após um mínimo de 15 minutos de incubação a temperatura ambiente.

#### Materiais:

Células Hela-R5-16 (linhagem de célula para expressar HIV gp160 mediante indução de doxiciclina) são cultivadas em meio DMEM contendo nutrientes e FCS a 10% (v/v) com 400 µg/mL de G418 e 200 µg/mL de Higromicina B.

CEM.NKR-CCR5-Luc (número do catálogo: 5198) é uma linhagem de célula T disponível na NIH AIDS Research & Reference Reagent Program McKesson BioServices Corporation Germantown, MD 20874, USA. Tipo de célula: CEM.NKR-CCR5 (número cat. 4376) foi transfectada (eletroporação) para expressar o gene de luciferase sob o controle transcricional de HIV-2 LTR e propagada em RPMI 1640 contendo soro bovino fetal a 10%, 4 mM de glutamina, penicilina/estreptomicina e 0,8 mg/mL de sulfato de gentamicina (G418). Características de crescimento: células linfóides redondas, morfologia não muito variável. As células cresceram em suspensão como células simples, que podem formar pequenos grumos. Divisão 1:10 duas vezes por semana. Características especiais: expressão atividade de luciferase após transativação de HIV-2 LTR. Apropriadas para infecção com isolados de HIV primários, para ensaios de neutralização e sensibilidade ao fármaco (Spencehauer, C, e outros, Virology 280 (2001) 292-300; Trkola, A., e outros, J. Virol. 73 (1999) 8966- 8974). A linhagem de célula foi obtida a-

través do NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, NIAID, NIH pelos Drs. John Moore e Catherine Spenlehauer.

Tampão para ensaio de luciferase Bright-Glo<sup>®</sup> (Promega Corp., USA, número da peça E2264B)

5 Substrato para ensaio de luciferase Bright-Glo<sup>®</sup> (Promega Corp., USA, número da peça EE26B)

Resultados:

Os resultados são apresentados na tabela 2. Os valores IC<sub>50</sub> estão entre 46 e 399 ng/mL. A região constante do anticorpo é uma IgG1 mutada (IgG1v2).

Tabela 2:

Domínio Variável de Cadeia Pesada	Domínio Variável de Cadeia Leve	IC <sub>50</sub> [ng/mL]
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 9	108
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10	399
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	46
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	152
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	132
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 10	76

Exemplo 4

Ensaio antivirótico com vírus vivo

PBMCs foram preparadas de revestimento tamponado isolado por centrifugação de gradiente-densidade usando Lymphoprep<sup>®</sup> (Nycomed Pharma AG, Oslo, Noruega). As células de quatro doadores diferentes foram misturadas, estimuladas por 1 dia com PHA e subsequentemente cultivadas em meio RPMI contendo 1% (peso/volume) de penicilina/estreptomicina, GlutaMAX<sup>®</sup> a 1% (Invitrogen Corp., USA, Cat. número 35050-038), piruvato de sódio a 1%, aminoácidos não-essenciais a 1% (peso/volume) e FBS a 10%, para dois dias na presença de 5 U/mL IL-2 (interleucina-2).

100.000 PBMCs (células mononucleares de sangue periférico) em 50 µL foram adicionadas a 100 µL de uma solução de anticorpo (diluição em série entre 0,006-17,5 µg/mL, no meio RPMI suplementado e infectado com 250 TCID<sub>50</sub> (dose infecciosa em cultura de tecido mediana) de NLBa1 (cepa NL4.3 (Adachi, A., e outros, J. Virol. 59 (1986) 284- 291) com o envol-  
tório de BaL (gpl20)) ou alternativamente JRCSF (O'Brien, W.A., e outros, Nature 348 (1990) 69-73) em um volume de 50 µL. A mistura foi incubada

por 6 dias a 37°C em um incubador de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi colhido e subsequentemente diluído 1:50 5 U/mL de meio RPMI suplementado com IL-2.

A medição de p24 foi realizada por um ELISA HIV-1 p24 (Perkin-Elmer, USA). As amostras foram então neutralizadas e transferidas para as cavidades da microplaca que foram revestidas com um anticorpo monoclonal de camundongo altamente específico para HIV-1 p24. O anticorpo monoclonal imobilizado captura HIV-1 p24. As amostras de cultura de célula não requerem interrupção e foram adicionadas diretamente às cavidades da microplaca revestidas com anticorpo monoclonal. O antígeno capturado é complexado com anticorpo policlonal biotinilado para HIV-1 p24, seguido por um conjugado de estreptavidina-HRP (peroxidase de raiz forte). O complexo resultante foi detectado por incubação com orto-fenilenodiamina-HCl (OPD) que produz uma cor amarela que é diretamente proporcional à quantidade de HIV-1 p24 capturado. A absorvência de cada cavidade da microplaca foi determinada usando um leitor de microplaca e calibrada contra a absorvência de um antígeno de HIV-1 p24 padrão ou curva padrão.

#### Resultados:

Para a inibição do crescimento de HIV em PBMC humano, os valores de IC<sub>50</sub> na faixa de 2,27 ng/mL a 14,21 ng/mL para os anticorpos anti-CCR5 compreendendo as diferentes combinações de domínios variáveis de cadeia pesada (SEQ ID NO:6, 7, 8) e leve (SEQ ID NO:9, 10) e de um isotipo IgG1 foram determinados. Para essas combinações os valores de IC<sub>90</sub> estão na faixa de 9,77 ng/mL a 74,06 ng/mL.

Para anticorpos anti-CCR5 compreendendo uma região constante IgG1 mutada (IgG1v2), os valores de IC<sub>50</sub> das diferentes combinações de domínios variáveis de cadeia pesada e leve foram determinados como estando na faixa de 8,22 ng/mL a 43,11 ng/mL, considerando-se que os valores de IC<sub>90</sub> foram determinados como estando na faixa de 51,95 ng/mL a 311,38 ng/mL.

#### Exemplo 5

#### ELISA em Célula de CCR5

20.000 células CHO expressando CCR5 recombinantemente foram semeadas por placas de 96 cavidades e incubada por toda noite a 37°C. Após isso, o meio foi aspirado e 40 µL de meio fresco foram adicionados. 10 µL do primeiro anticorpo em meio diluído foram adicionados e incubados por duas horas a 4°C. O meio foi aspirado, 100 µL de glutardialdeído (c = 0,05% em salmoura tamponada em fosfato (PBS)) foram adicionados e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem três vezes com 200 µL de PBS, 50 µL de anticorpo de detecção (1:1.000 a 1:2.000 diluído em tampão de bloqueio de ELISA) foram adicionados e incubados por duas horas a temperatura ambiente. 50 µL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados e a reação foi parada após 7 minutos. A densidade óptica foi medida a 450 nm (versus 620 nm).

Primeiro anticorpo: anticorpo a ser examinado

Segundo anticorpo (de detecção): anticorpo conjugado de peroxidase específica de IgG-gama-anti-humano de carneiro (The Binding site cat número AP004) 1:2.000 (6 µl/12 mL) diluído em tampão de bloqueio de PBS a 10%.

Meio: HAM's F-12 ou GIBCO com GlutaMAX®, 10% FCS, 200 µg/mL Higromicina (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha)

Bloqueio de ELISA: Roche Diagnostics GmbH, Alemanha, número 1112589, solução em água a 10% (volume/volume). 1:10 diluída em PBS

TMB: Roche Diagnostics GmbH, Alemanha, número 1432559, solução para uso.

Resultados:

Os resultados do ELISA em célula de CCR5 mostra que a ligação ao CCR5 humano dos anticorpos anti-CCR5 compreendendo as diferentes combinações de domínios variáveis de cadeia pesada (SEQ ID NO: 6, 7, 8) e leve (SEQ ID NO:9, 10) está na faixa de 2,71 a 3,13 (OD 450/620) a uma concentração de 1.000 ng/mL.

Exemplo 6

Potencial dos MAbs de CCR5 em se ligarem ao FcγRIIIA nas células NK

Para determinar a capacidade dos anticorpos da invenção de se ligarem ao FcγRIIIa (CD16) nas células exterminadoras naturais (NK), células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) são isoladas e incubadas com 20 µg/mL de anticorpo e anticorpos de controle na presença ou ausência de 20 µg/mL de anticorpo de bloqueio de camundongo para FcγRIIIa (anti-CD16, clone 3G8, RDI, Flanders, NJ), para verificar a ligação via FcγRIIIa. São empregados, como controles negativos, IgG2 e IgG4 humanos (The Binding Site), que não se ligam ao FcγRIIIa. IgG1 e IgG3 humanos (The Binding Site) são incluídos como controles positivos para ligação ao FcγRIIIa. Os anticorpos ligados às células NK são detectados por análise FACS usando um anticorpo CD56 anti-humano de camundongo marcado com PE (marcador de superfície de célula NK) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) em combinação com um anticorpo IgG(Fc) anti-humano F(ab)2 de cabra marcado com FITC (Protos Immunoresearch, Burlingame, USA). Ligação máxima ( $B_{max}$ ) é determinada em uma concentração de anticorpo de 20 µg/mL. Anticorpo de controle (IgG4 humano) mostra até 30% de  $B_{max}$  em comparação a 100% de  $B_{max}$  para IgG1 humano. Portanto, "nenhuma ligação de FcγRIIIa ou nenhum ADCC" significa uma concentração de anticorpo de 20 µg/mL, um valor de  $B_{max}$  de até 30% em comparação ao IgG1 humano.

## 20 Exemplo 7

### Ensaio de quimiotaxia de CCR5

Células L1.2hCCR5 foram cultivadas em RPMI 1640 contendo soro fetal bovino a 10%, 1 x penicilina/estreptomicina, 1 x glutamina, 1 x piruvato de sódio, 1 x β-mercaptoetanol e 250 µg/mL de G418 (todos da Invitrogen Inc., USA). Imediatamente antes de estabelecer o ensaio de quimiotaxia, as células foram rotacionadas e ressuspensas no Tampão de Quimiotaxia (Solução de Salmoura Equilibrada de Hank's HBSS (Invitrogen) contendo BSA a 0,1% e 10 mM de HEPES). As células foram usadas no ensaio de quimiotaxia em uma concentração final de  $5 \times 10^6$  células/mL. Os ligantes de CCR5, MIP1α humano, MIP1β ou RANTES humanos (R&D Systems, USA) foram diluídos no Tampão de Quimiotaxia e usados em uma concentração final de 20 nM. Os anticorpos de teste ou os anticorpos de controle de

isotipo apropriados foram diluídos em HBSS. O ensaio de quimiotaxia foi estabelecido no sistema ChemoTx<sup>®</sup> de 96 cavidades com 0,5 µm de poro (Neuroprobe Inc., USA). Cada anticorpo foi misturado com um dos ligantes de CCR5 e 30 µL dessa mistura foram colocados no fundo da cavidade do sistema ChemoTx<sup>®</sup>. A tela de filtro foi colocada na parte superior do fundo das cavidades. Cada anticorpo foi misturado com as células L1.2hCCR5 e 20 µL dessa mistura foram colocadas no filtro. As placas foram então colocadas em uma câmara umidificada e incubadas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5% por três horas. Após incubação, as células foram raspadas do filtro e as placas foram giradas em uma centrífuga de bancada a 2.000 rpm por 10 minutos. O filtro foi então removido e a densidade das células que haviam migrado para o fundo das cavidades, foi detectada usando kit de ensaio de proliferação Cy-Quant<sup>®</sup> (Invitrogen) e o leitor de placa Spectra MAX GeminiXS (Molecular Devices, Wokingham, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados usando Prism 4 (GraphPad Inc., USA).

Os valores de IC<sub>50</sub> para MIP-1α humano, MIP-1β humano e RANTES humano para as diferentes combinações de domínios variáveis de cadeia pesada e domínios variáveis de cadeia leve com uma região constante de isotipo IgG1 estão na faixa de 0,80 nM a 0,91 nM, de 0,72 nM a 1,08 nM e de 0,85 nM a 2,69 nM, respectivamente.

No caso de um isotipo de IgG1 mutado (IgG1v2) os valores de IC<sub>50</sub> para MIP-1α humano, MIP-1β humano e RANTES humano estão na faixa de 2,21 nM a 6,28 nM, de 2,16 nM a 6,87 nM e de 3,59 nM a 5,03 nM, respectivamente.

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo que se liga ao CCR5 caracterizado pelo fato de que o domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1

5 Gln-Val-Gln-Leu-X01-X02-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-X03-Pro-Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Ile-Thr-Cys-Thr-Val-Ser-Gly-Phe-Pro-Leu-Gly-Ala-Phe-Gly-Val-His-Trp-Val-Arg-Gln-Ser-Pro-Gly-Lys-Gly-X04-Glu-Trp-Leu-Gly-Val-Ile-Trp-Lys-Gly-Gly-Asn-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-X05-Ser-Arg-Leu-Arg-Ile-Thr-Lys-Asp-Asn-Ser-Lys-Ser-Gln-Val-Phe-Phe-Arg-Met-Asn-Ser-Leu  
10 Gln-Thr-Asp-Asp-Thr-Ala-X06-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Lys-Val-Asn-Leu-Ala-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-X07-Val-X08-Val-Ser-Ser,

em que X01 é Lys ou Gln, X02 é Gln ou Glu, X03 é Arg ou Lys, X04 é Leu ou Pro, X05 é Met ou Lys, X06 é Ile ou Thr, X07 é Ser ou Thr, X08 é Ile ou Thr.

15 2. Anticorpo que se liga ao CCR5 de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2

Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Ile-Thr-Cys-Arg-Ala-Ser-Gly-Asn-X10-His-Gly-Tyr-Leu  
20 Ala-Trp-X11-Gln-Gln-Lys-X12-Gly-Lys-X13-Pro-X14-Leu-Leu-X15-Tyr-Asn-Thr-Lys-Thr-Leu-Ala-Glu-Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-X16-Phe-X17-X18-X19-Ile-X20-Ser-X21-Gln-Pro-Glu-Asp-Phe-X22-X23-Tyr-Tyr-Cys-Gln-His-His-Tyr-Asp-Leu-Pro-Arg-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-X24-Glu-Ile-Lys,

25 em que X10 é Ile ou Ala, X11 é Phe ou Tyr, X12 é Gln ou Pro, X13 é Ser ou Ala, X14 é Gln ou Lys, X15 é Val ou Ile, X16 é Gln ou Asp, X17 é Ser ou Thr, X18 é Leu ou Ala, X19 é Lys ou Thr, X20 é Asn ou Ser, X21 é Leu ou Ala, X22 é Gly ou Ala, X23 é Asn ou Thr, X24 é Leu ou Val.

30 3. Anticorpo que se liga ao CCR5 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo compreende um domínio variável de cadeia pesada selecionado dos domínios variáveis de cadeia pesada da SEQ ID NO: 6, 7 ou 8 ou um fragmento

de ligação de CCR5 dos mesmos.

4. Anticorpo que se liga ao CCR5 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo compreende um domínio variável de cadeia leve selecionado dos domínios variáveis de cadeia leve da SEQ ID NO: 9 ou 10, ou um fragmento de ligação de CCR5 dos mesmos.

5. Anticorpo que se liga ao CCR5 de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo compreende um domínio variável de cadeia pesada selecionado da SEQ ID NO: 6, 7 ou 8, ou um fragmento de ligação de CCR5 do mesmo e compreendendo um domínio variável de cadeia leve selecionado da SEQ ID NO: 9 ou 10, ou um fragmento de ligação de CCR5 do mesmo, onde os ditos domínios variáveis de cadeia pesada e leve são selecionados de modo independente.

6. Anticorpo que se liga ao CCR5 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo compreende regiões constantes de origem humana.

7. Anticorpo que se liga ao CCR5 de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a dita região constante de cadeia pesada é do isotipo IgG4 humano ou é do isotipo IgG1 humano modificado na região de articulação na posição 216-240 do aminoácido entre C<sub>H</sub>1 e C<sub>H</sub>2, e/ou na segunda região de interdomínio na posição 327-331 do aminoácido entre C<sub>H</sub>2 e C<sub>H</sub>3.

8. Anticorpo que se liga ao CCR5 de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada da SEQ ID NO: 3 ou 4 e compreende uma região constante de cadeia leve da SEQ ID NO: 5.

9. Anticorpo que se liga ao CCR5 de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é do isotipo IgG1 humano e compreende as mutações L234A e L235A ou o anticorpo é do isotipo IgG4 humano compreendendo a mutação S228P.

10. Composição farmacêutica compreendendo um anticorpo como definido na reivindicação 1 ou 2, em uma quantidade farmacêutica-

mente eficaz.

11. Método para a fabricação de uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade farmacêuticamente eficaz de um anticorpo como definido na reivindicação 1 ou 2.

5 12. Uso de um anticorpo como definido na reivindicação 1 ou 2, para a fabricação de uma composição farmacêutica.

13. Anticorpo como definido na reivindicação 1 ou 2, para uso como um fármaco.

10 14. Anticorpo como definido na reivindicação 1 ou 2, para uso no tratamento de uma doença imunossupressora.

15 15. Uso de um anticorpo como definido na reivindicação 1 ou 2, para a fabricação de um fármaco para o tratamento de uma doença imunossupressora.

16 16. Método para o tratamento de um paciente que sofre de uma doença imunossupressora, caracterizado pela administração ao paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo, como definido na reivindicação 1 ou 2.

17 17. Ácido nucleico codificando um polipeptídeo capaz de se reunir com um segundo polipeptídeo, pelo que dito segundo polipeptídeo compreende um polipeptídeo selecionado do grupo de polipeptídeos das SEQ ID NOs: 2, 5 e pelo que dito polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1, 6, 7 ou 8.

18 18. Ácido nucleico codificando uma cadeia de um anticorpo que se liga ao CCR5, caracterizado pelo fato de que a dita cadeia codificada é capaz de se reunir com outra respectiva cadeia de anticorpo, resultando em uma molécula de anticorpo se ligando ao CCR5 como definido na reivindicação 1 ou 2.

19 19. Ácido nucleico codificando um anticorpo que se liga ao CCR5 como definido na reivindicação 1 ou 2.

20 20. Célula eucariótica compreendendo um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 19.

21. Método para a produção de um anticorpo recombinante hu-



## RESUMO

Patente de Invenção: "**ANTICORPOS CONTRA CCR5 E USOS DOS MESMOS**".

5 A presente invenção refere-se a um anticorpo que se liga ao CCR5 caracterizado pelo fato de que o domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 e possui propriedades vantajosas para o tratamento de doenças imunossupressoras.