



(11) Número de Publicação: **PT 1360208 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/30 (2007.10) **A61K 39/395** (2007.10)
A61P 35/00 (2007.10) **A61K 47/48** (2007.10)
A61K 51/10 (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **2000.11.08**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2003.11.12**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.05.07**
113/2008

(73) Titular(es):

ARIUS RESEARCH, INC.
55 YORK STREET, 16TH FLOOR TORONTOA,
ONTARIO M5J 1R7 **CA**

(72) Inventor(es):

DAVID S. F. YOUNG **CA**
MIYOKO TAKAHASHI **CA**

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI CANCERÍGENOS INDIVIDUALIZADOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"ANTICORPOS ANTI CANCERÍGENOS INDIVIDUALIZADOS"

A presente invenção diz respeito a um método de produção de anticorpos anti cancerígenos específicos para o doente utilizando um novo paradigma de rastreio. Segregando os anticorpos anti cancerígenos utilizando a citotoxicidade das células cancerígenas como ponto de chegada, o processo permite a produção de anticorpos anti cancerígenos adaptados ao doente individual que podem ser usados com propósitos terapêuticos e de diagnóstico. A invenção refere-se ainda ao processo através do qual os anticorpos são produzidos e aos seus métodos de utilização. Os anticorpos podem ser produzidos especificamente para um tumor derivado de um doente em particular e são seleccionados com base na sua citotoxicidade relativamente a células cancerígenas e em simultâneo com base na sua não toxicidade em relação a células não cancerígenas. Os anticorpos podem ser utilizados como auxiliares na avaliação e diagnóstico de um cancro, e podem ser utilizados para o tratamento de metástases cancerígenas. Os anticorpos anti cancerígenos podem ser conjugados com glóbulos vermelhos obtidos a partir desse doente e re-introduzidos para o tratamento de metástases com base no reconhecimento de que os cancros metastizados encontram-se geralmente bem vascularizados e que a entrega dos anticorpos anti cancerígenos por intermédio dos glóbulos vermelhos pode ter o efeito de concentrar os anticorpos no local do tumor.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS ANTI CANCERÍGENOS INDIVIDUALIZADOS

Campo da Invenção

Esta invenção refere-se à produção de anticorpos anti cancerígenos adaptados ao doente individual que podem ser usados para fins terapêuticos e de diagnóstico. A invenção refere-se ainda ao processo através do qual os anticorpos são produzidos e aos seus métodos de utilização.

Antecedentes da Invenção

Cada indivíduo que sofre de cancro é único e possui um cancro que é diferente de outros cancros, tal como a identidade do referido indivíduo. Apesar deste facto, as terapias correntes tratam todos os doentes com o mesmo tipo de cancro, no mesmo estágio, da mesma forma. Pelo menos para 30% destes doentes a terapia de primeira linha irá falhar, levando assim a novas rondas de tratamento e a um aumento da probabilidade que o tratamento falhe, ao aparecimento de metástases e, em último caso, à morte. Uma abordagem superior ao tratamento seria a adaptação da terapia ao indivíduo, em particular. A única terapia actual que permite a adaptação é a cirurgia. A quimioterapia e o tratamento com radiações não pode ser adaptado ao doente, e a cirurgia por si só, na maioria dos casos, não é adequada para obter a cura.

Com o surgimento dos anticorpos monoclonais, a possibilidade de desenvolver métodos para a terapia adaptada tornou-se mais realista já que cada anticorpo pode ser dirigido a um só epítopo. Além disso, é possível produzir uma combinação de anticorpos que são dirigidos à

constelação de epítomos que definem de forma única o tumor de um indivíduo em particular.

Sendo reconhecido que uma diferença significativa entre as células cancerosas e as células normais se baseia no facto de as células cancerosas conterem antigénios que são específicos para células transformadas, a comunidade científica há muito tempo defende que os anticorpos monoclonais podem ser concebidos para ter como alvo específico células transformadas ligando-se especificamente a estes antigénios cancerígenos; dando assim origem à crença de que os anticorpos monoclonais podem servir como “Balas Mágicas” para a eliminação de células cancerosas.

No entanto, actualmente, o doente de cancro tem geralmente poucas opções de tratamento. A abordagem regimentada à terapia do cancro tem produzido melhorias nas taxas de sobrevivência a nível global e morbilidade. No entanto, para o indivíduo em particular, estas estatísticas melhoradas não têm necessariamente uma correlação com uma melhoria na sua situação pessoal.

Assim, se for apresentada uma metodologia que permita ao médico tratar cada tumor de forma independente de outros doentes dentro do mesmo grupo, tal iria permitir a abordagem única de adaptar a terapia somente para aquele indivíduo. Tal orientação terapêutica iria, de um modo ideal, aumentar a taxa de cura, e produzir melhores resultados, satisfazendo assim uma necessidade há muito sentida.

Historicamente, a utilização de anticorpos policlonais tem sido efectuada com sucesso limitado no tratamento de

cancro em seres humanos. Foram tratados linfomas e leucemias com plasma humano, mas houve poucas remissões ou respostas prolongadas. Além disso, verificou-se uma falta de reprodutibilidade e não houve benefício adicional em comparação com a quimioterapia. Os tumores sólidos tais como o cancro da mama, os melanomas e os carcinomas das células renais foram também tratados com sangue humano, soro de chimpanzé, plasma humano e soro de cavalo com resultados correspondentemente imprevisíveis e ineficazes.

Têm sido realizados muitos ensaios clínicos com anticorpos monoclonais para tumores sólidos. Nos anos 80 houve pelo menos quatro ensaios clínicos para o cancro da mama em humanos que produziram apenas um tipo de resposta em pelo menos 47 doentes com a utilização de anticorpos contra antigénios específicos ou baseados na selectividade tecidual. Foi só em 1998 que houve um ensaio clínico com sucesso utilizando um anticorpo anti-her 2 humanizado em combinação com cisplatina. Neste ensaio foram avaliadas as respostas de 37 doentes dos quais cerca de um quarto apresentou uma resposta parcial e metade apresentou uma progressão da doença menor ou estável.

Os ensaios clínicos que investigam o cancro colorectal envolvem anticorpos contra alvos tanto glicoproteicos como glicolipídicos. Anticorpos tais como o 17-1A, que possuem alguma especificidade para os adenocarcinomas, foram utilizados em ensaios clínicos de Fase 2 em mais de 60 doentes com apenas um doente a apresentar uma resposta parcial. Em outros ensaios, a utilização do 17-1A produziu apenas uma resposta completa e duas respostas menores entre 52 doentes em protocolos que utilizam ciclofosfamida adicional. Outros ensaios que

envolvem 17-1A apresentaram resultados semelhantes. A utilização de um anticorpo monoclonal de murina humanizado inicialmente aprovado para imagiologia também não produziu a regressão do tumor. Até à data não existe um anticorpo efectivo para o cancro colo-rectal. Da mesma forma têm também havido resultados igualmente pobres para o cancro dos pulmões, cancro da próstata, e cancro do estômago. Tem havido algum sucesso limitado na utilização do anticorpo monoclonal anti-GD3 para o melanoma. Assim, pode ser verificado que apesar dos estudos com sucesso em pequenos animais que são o pré-requisito para os ensaios clínicos com humanos, os anticorpos que foram testados foram na sua maior parte ineficazes.

Patentes Anteriores

O documento U.S. 5,750,102 divulga um processo em que as células de um tumor de um doente são transfectadas com genes MHC que podem ser clonados a partir de células ou tecidos do doente. Estas células transfectadas são então utilizadas para vacinar o doente.

O documento U.S. 4,861,581 divulga um processo que compreende os passos para a obtenção de anticorpos monoclonais que são específicos para um componente celular interno de células neoplásicas e células normais do mamífero mas não para os componentes externos, marcando o anticorpo monoclonal, efectuando o contacto do anticorpo marcado com o tecido de um mamífero que tenha recebido terapia para a eliminação de células neoplásicas, e determinando a eficácia da terapia efectuando a medição da ligação do anticorpo marcado ao componente intracelular das células neoplásicas em degeneração. Na preparação de anticorpos direccionados aos antigénios humanos

intracelulares, o titular da patente reconheceu que as células malignas representam uma fonte conveniente de tais antigénios.

O documento U.S. 5,171,665 providencia um anticorpo novo e método para a sua produção. De um modo mais específico, a patente ensina a formação de um anticorpo monoclonal que tem a propriedade de se ligar fortemente a um antigénio proteico associado com os tumores humanos, por exemplo aqueles do cólon e dos pulmões, e que se liga a células normais em muito menor extensão.

O documento U.S. 5,484,598 providencia um método de terapia para o cancro que compreende a remoção cirúrgica de tecido tumoral de um doente humano com cancro, o tratamento do tecido tumoral para a obtenção de células tumorais, a irradiação das células tumorais para que sejam viáveis mas não tumorigénicas, e a utilização destas células para a preparação de uma vacina para o doente que seja capaz de inibir a recorrência do tumor primário e simultaneamente inibir as metástases. A patente ensina o desenvolvimento de anticorpos monoclonais que são reactivos com antigénios de superfície das células tumorais. Tal como apresentado na col. 4, linhas 45 e daí em diante, os titulares da patente utilizam células tumorais autóctones no desenvolvimento de anticorpos monoclonais que expressam imunoterapia específica activa nas neoplasias humanas.

O documento U.S. 5,693,763 ensina uma característica antigénica para uma glicoproteína dos carcinomas humanos e não dependentes do tecido epitelial de origem.

O documento U.S. 5,783,186 está direccionado para os anticorpos Anti-Her2 que induzem a apoptose em células que expressam Her2, linhas celulares de hibridomas que produzem os anticorpos, métodos para o tratamento do cancro utilizando os anticorpos e composições farmacêuticamente aceitáveis que incluem tais anticorpos.

O documento U.S. 5,849,876 descreve novas linhas celulares de hibridomas para a produção de anticorpos monoclonais para os antigénios de mucina purificados a partir de fontes de tecido tumorais e não tumorais.

O documento U.S. 5,869,268 está direccionado para um método de produção de um linfócito humano que produz um anticorpo específico para o antigénio pretendido, um método para a produção do anticorpo monoclonal, bem como os anticorpos monoclonais produzidos pelo método. A patente é direccionada de forma particular para a produção de um anticorpo monoclonal anti-HD humano, útil para o diagnóstico e tratamento de cancros.

O documento U.S. 5,869,045 refere-se a anticorpos, fragmentos de anticorpos, conjugados de anticorpos e imunotoxinas de cadeia simples, reactivos com células de carcinoma humano. O mecanismo através do qual estes anticorpos funcionam é duplo, em que as moléculas são reactivas com antigénios da membrana celular presentes na superfície dos carcinomas humanos, e ainda em que os anticorpos têm a possibilidade de se interiorizar nas células do carcinoma, posteriormente à sua ligação, tornando-as especialmente úteis para a formação de conjugados anticorpo-droga e anticorpo-toxina. No seu

estado não modificado os anticorpos manifestam também propriedades citotóxicas em determinadas concentrações.

O documento U.S. 5,780,033 apresenta a utilização de auto-anticorpos para a terapia e profilaxia de tumores. No entanto, este anticorpo é um auto-anticorpo antinuclear de um mamífero envelhecido. Neste caso, o auto-anticorpo é referido como sendo um tipo de anticorpo natural encontrado no sistema imunitário. Pelo facto de o auto-anticorpo ser proveniente de "um mamífero envelhecido", não existe a necessidade de que o auto-anticorpo seja de facto originário do doente a ser tratado. Além disso, a patente apresenta um auto-anticorpo antinuclear natural de um mamífero envelhecido, uma linha celular de hibridomas para a produção de auto-anticorpo antinuclear monoclonal.

Sumário da Invenção

Este pedido de patente ensina um método para a produção de anticorpos anti cancerígenos específicos para o doente utilizando um novo paradigma de rastreio. Estes anticorpos podem ser produzidos especificamente para um tumor, tornando-se assim possível a adaptação da terapia para o cancro. No contexto deste pedido, os anticorpos anti cancerígenos que possuam propriedades de matar células (citotóxicas) ou de inibição do crescimento celular (citoestáticas) serão doravante referidos como citotóxicos. Estes anticorpos podem ser utilizados como auxiliares da avaliação e diagnóstico de um cancro, e podem ser usados para o tratamento de metástases tumorais.

A perspectiva de um tratamento anti cancerígeno individualizado irá causar uma alteração na forma como o doente é tratado. Um cenário clínico provável é aquele em

que a amostra de tumor é obtida na altura da apresentação, e analisada. A partir desta amostra, o tumor pode ser tipificado a partir de um painel de anticorpos anti cancerígenos pré-existentes. O doente será avaliado quanto à fase da doença de um modo convencional, mas os anticorpos disponíveis podem ser úteis numa avaliação posterior do doente. O doente pode ser tratado imediatamente com os anticorpos existentes, e pode ser produzido um painel de anticorpos específicos para o tumor usando quer os métodos aqui descritos ou através da utilização de bibliotecas de disponibilização de fagos em conjugação com os métodos de rastreio aqui apresentados. Todos os anticorpos gerados serão adicionados à biblioteca de anticorpos anti cancerígenos já que existe a possibilidade de outros tumores poderem possuir alguns dos mesmos epítomos que aquele que está a ser tratado.

Além dos anticorpos anti cancerígenos, o doente pode optar por receber as terapias actualmente recomendadas como parte de um regime multi-modal de tratamento. O facto de os anticorpos isolados por intermédio da presente metodologia serem relativamente não tóxicos para células não cancerígenas permite combinações de anticorpos em doses elevadas a ser usadas, quer por si só, ou em conjunto com a terapia convencional. O elevado índice terapêutico permite também um re-tratamento num curto intervalo de tempo que deverá diminuir a probabilidade de emergência de células resistentes ao tratamento.

Se o doente for refractário à progressão inicial da terapia ou se houver desenvolvimento de metástases, o processo de geração de anticorpos específicos para o tumor pode ser repetido para o re-tratamento. Além disso, os

anticorpos anti cancerígenos podem ser conjugados com glóbulos vermelhos obtidos a partir desse doente e re-utilizados para o tratamento de metástases. Têm havido poucos tratamentos eficazes para o cancro metastásico e as metástases geralmente prenunciam um resultado pobre, que resulta na morte. No entanto, os cancros metastásicos estão geralmente bem vascularizados e a entrega dos anticorpos anti cancerígenos por intermédio dos glóbulos vermelhos pode ter o efeito de concentrar os anticorpos no local do tumor. Ainda anteriormente às metástases, a maioria das células cancerígenas dependem do fornecimento de sangue do hospedeiro para a sua sobrevivência e os glóbulos vermelhos conjugados com anticorpos anti cancerígenos podem ser eficazes também para os tumores *in situ*. De um modo alternativo, os anticorpos podem ser conjugados com outras células hematogéneas, por exemplo linfócitos, macrófagos, monócitos, células naturais assassinas, etc.

Existem cinco classes de anticorpos e cada uma é associada a uma função que é conferida pela sua cadeia pesada. É geralmente considerado que a morte de células cancerígenas pelos anticorpos nús é mediada ou por citotoxicidade celular dependente de anticorpos ou por citotoxicidade dependente do complemento. Por exemplo, os anticorpos IgM e IgG2 de murina podem activar o complemento humano ligando o componente C-1 do sistema do complemento activando assim a via clássica de activação do complemento que pode levar à lise do tumor. Para os anticorpos humanos, os anticorpos activadores de complemento mais eficazes são, de um modo geral, o IgM e IgG1. Os anticorpos de murina do isotipo IgG2a e IgG3 são eficazes no recrutamento de células citotóxicas que possuem receptores Fc que irão conduzir à morte das células pelos monócitos, macrófagos,

granulócitos e determinados linfócitos. Os anticorpos humanos tanto do isotipo IgG1 como IgG3 efectuam a mediação ADCC.

Outro mecanismo possível de morte do cancro mediada por anticorpos pode ser através da utilização de anticorpos que funcionam para catalizar a hidrólise de várias ligações químicas na membrana celular e nas suas glicoproteínas ou glicolípidos associados, os denominados anticorpos catalíticos.

Existem dois outros mecanismos adicionais de morte de células cancerígenas mediada por anticorpos que são mais largamente aceites. O primeiro consiste na utilização de anticorpos como uma vacina para induzir o corpo a produzir uma resposta imune contra o antigénio cancerígeno putativo que reside na célula tumoral. O segundo consiste na utilização de anticorpos para alvejar os receptores de crescimento e interferir com a sua função ou para efectuar uma regulação negativa nesse receptor de forma que a sua função seja efectivamente perdida.

De um modo concordante, é um objectivo da invenção ensinar um método para a produção de anticorpos anti cancerígenos, a partir de células obtidas de um indivíduo em particular, que são citotóxicos em relação às células cancerígenas, sendo em simultâneo relativamente não tóxicas para as células não cancerígenas.

Descrição Detalhada da Invenção

Um dos benefícios potenciais dos anticorpos monoclonais no que se refere ao tratamento do cancro é a sua capacidade para reconhecer de um modo específico

antigénios isolados. Pensava-se que em alguns casos as células cancerígenas possuíam antigénios que seriam específicos para esse tipo de célula transformada. Crê-se agora de forma mais frequente que as células cancerígenas possuem poucos antigénios únicos, em vez disso tendem a sobre-expressar um antigénio normal ou expressar antigénios fetais. No entanto, a utilização de anticorpos monoclonais providenciou um método de distribuição de doses reprodutíveis de anticorpos ao doente com a expectativa de melhores taxas de resposta do que com anticorpos policlonais.

De um modo tradicional, os anticorpos monoclonais foram preparados de acordo com os princípios fundamentais apresentados por Kohler e Milstein. Os ratinhos são imunizados com antigénios, com ou sem, adjuvantes. Os esplenócitos são colhidos do fígado para fusão com parceiros de hibridoma imortalizados. Estes são semeados em placas de microtitulação onde podem segregar anticorpos para o sobrenadante que é utilizado para cultura celular. Para seleccionar a partir dos hibridomas que foram plaqueados, aqueles que produzem anticorpos de interesse o sobrenadante dos hibridomas, são geralmente testados no que se refere à ligação dos anticorpos aos antigénios num ensaio ELISA (ensaio imunoabsorvente por ligação a enzima). A ideia é que os poços que contêm o hibridoma de interesse irão conter anticorpos que se ligarão de forma mais ávida ao antigénio de teste, geralmente o agente imunizante. Estes poços são então sub-clonados de um modo limitante na diluição para produzir hibridomas monoclonais. A selecção para os clones de interesse é repetida utilizando um ensaio ELISA para testar a ligação de anticorpo. Assim, o princípio que foi propagado é que na produção de anticorpos

monoclonais os hibridomas que produzem os anticorpos que se ligam de forma mais ávida são aqueles que são seleccionados de entre todos os hibridomas que foram inicialmente produzidos. Isto é o mesmo que dizer que o anticorpo preferido é aquele com a afinidade mais elevada para o antigénio de interesse.

Têm havido muitas modificações a este procedimento tais como a utilização de células completas para imunização. Neste método, no lugar da utilização dos antigénios purificados, são utilizadas células completas para a imunização. Outra modificação é a utilização do ELISA celular para o rastreio. Neste método, no lugar da utilização de antigénios purificados como alvo para o ELISA, são utilizadas células fixas. Em adição aos testes de ELISA, foram também usados ensaios de citotoxicidade mediada pelo complemento no processo de rastreio. No entanto, os ensaios de ligação do anticorpo foram utilizados em conjunção com testes de citotoxicidade. Assim, apesar das muitas modificações, o processo para a produção de anticorpos monoclonais baseia-se na ligação do anticorpo ao antigénio de teste como ponto de ligação.

A maioria dos anticorpos dirigidos contra as células cancerígenas foram produzidos utilizando os métodos tradicionais acima descritos. Estes anticorpos foram usados tanto terapêuticamente como para diagnóstico. De um modo geral, para ambas as aplicações, o anticorpo foi utilizado como o agente de alvejo que entrega a carga a atingir no local onde se encontra o cancro. Estes conjugados de anticorpo podem ser quer radioactivos, tóxicos, ou servir como um intermediário para uma posterior distribuição de um medicamento no corpo, tal como um enzima ou biotina. Além

disso, tem sido largamente defendido, até muito recentemente, que os anticorpos nus tinham um efeito reduzido *in vivo*. Tanto HERCEPTIN como RITUXIMAB são anticorpos de murinas monoclonais que foram recentemente aprovados pela FDA para utilização humana. No entanto, ambos os antibióticos foram inicialmente produzidos ensaiando para a ligação do anticorpo e a sua toxicidade directa não foi o objectivo principal durante a produção de hibridomas. Qualquer tendência destes antibióticos para produzir a morte de células tumorais é assim aleatória, e não devida ao seu desenho.

Ainda que a produção de anticorpos monoclonais tenha sido realizada utilizando a imunização de células completas para várias aplicações, o rastreio destes hibridomas baseou-se ou em antigénios alvo identificados ou putativos ou na selectividade destes hibridomas para tecidos específicos. É axiomático o facto de os melhores anticorpos são aqueles com as constantes de ligação mais elevadas. Este conceito originou no princípio bioquímico básico de que as enzimas com as constantes de ligação mais elevadas são aquelas que são mais eficientes para catalizar uma reacção. Este conceito é aplicável à ligação receptor-ligando em que a molécula do medicamento ligada ao receptor com a maior afinidade de um modo geral tem a maior probabilidade de iniciar ou inibir o sinal. No entanto, este pode nem sempre ser o caso já que é possível que em determinadas situações possam ocorrer casos em que a iniciação ou inibição de um sinal possam ser mediadas através de uma ligação que não ao receptor. A informação transmitida por uma alteração na conformação induzida pela ligação do ligando pode ter muitas consequências tais como a transdução de sinal, endocitose, entre outras. A

capacidade de produzir uma alteração da conformação numa molécula receptora pode não ser necessariamente devida ao preenchimento de um espaço ligando-receptor mas pode ocorrer através da ligação de outro domínio extracelular ou devido à aglomeração dos receptores induzida por um ligando multivalente.

A produção de anticorpos para efectuar a morte celular não necessita de ser prevista aquando do rastreio dos hibridomas para os anticorpos com melhor ligação. Por outro lado, ainda que não seja defendido por aqueles que produzem anticorpos monoclonais, o rastreio dos sobrenadantes dos hibridomas para morte celular ou de modo alternativo para a interrupção do crescimento das células cancerígenas pode ser seleccionado como um ponto terminal pretendido para a produção de anticorpos citotóxicos ou citoestáticos. É bem compreendido que os anticorpos *in-vivo* medeiam a sua função através das porções Fc e que a utilidade do anticorpo terapêutico é determinada pela funcionalidade da região constante ou dos meios associados. Neste caso a porção FAb do anticorpo, a porção que combina com o antigénio, irá conferir ao anticorpo a sua especificidade e a porção Fc a sua funcionalidade. O local do anticorpo que combina com o antigénio pode ser considerado como sendo o produto de uma biblioteca combinatória natural. O resultado do rearranjo da região variável do anticorpo pode ser considerado como uma biblioteca combinatória molecular em que o resultado é um péptido. Assim, a amostragem desta biblioteca combinatória pode ser baseada em qualquer parâmetro. Tal como a amostragem de uma biblioteca de compostos naturais para antibióticos, é possível efectuar uma amostragem de uma biblioteca de antibióticos para compostos citotóxicos ou citostáticos.

Os vários pontos de ligação num rastreio devem ser diferenciados uns dos outros. Por exemplo, a diferença entre anticorpo ligado à célula é distinta da morte celular. A morte celular (citotoxicidade) é distinta dos mecanismos de morte celular tal como a oncose ou apoptose. Existe uma especulação que afirma a existência de outros mecanismos de morte celular para além da oncose ou apoptose, mas independentemente de como a célula morre existem alguns pontos comuns na morte celular. Um deles é a ausência de metabolismo e outro é a desnaturação das enzimas. Em qualquer um dos casos, os corantes vitais não vão conseguir corar estas células. Estes pontos de ligação de morte celular há muito que são compreendidos e antevêm a compreensão actual dos mecanismos de morte celular. Além disso, existe a distinção entre efeitos citotóxicos em que as células são mortas e os efeitos citostáticos em que a proliferação das células é inibida.

Numa das formas de realização preferidas da presente invenção, o ensaio é conduzido com foco na actividade citotóxica em relação às células cancerígenas como um ponto de ligação. Numa forma de realização preferida, é utilizado um conjunto de ensaio vivo/morto, por exemplo LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Assay Conjunto (L-3224) por Molecular Probes. O conjunto da Molecular Probes providencia um ensaio de viabilidade celular por fluorescência de duas cores que é baseado na determinação simultânea de células vivas e mortas com duas sondas que medem dois parâmetros reconhecidos de viabilidade celular - a actividade da esterase intracelular e integridade da membrana plasmática. Os princípios do ensaio são gerais e aplicáveis à maioria dos tipos de células eucariotas,

incluindo células aderentes e determinados tecidos, mas não bactérias ou fungos. Este método de avaliar a viabilidade celular baseado na fluorescência é preferido no lugar de tais ensaios como a exclusão por azul de tripano, libertação de Cr e métodos semelhantes para a determinação da viabilidade celular e citotoxicidade.

Ao realizar o ensaio, as células vivas são distinguidas pela presença ubíqua de actividade da esterase intracelular, determinada pela conversão enzimática da CALCEIN AM de permeação celular que é virtualmente não fluorescente na calceína que é intensamente fluorescente. A tinta polianiónica calceína é bem retida no interior de células vivas, e produz uma intensa fluorescência verde uniforme em células vivas (ex/em ~495 nm / ~515 nm). O EthsD-1 entra em células com membranas danificadas e sofre um aumento de 40 vezes em termos de fluorescência ao ligar-se aos ácidos nucleicos, produzindo assim uma fluorescência vermelha brilhante em células mortas (ex/em ~495 nm / ~635 nm). O EthD-1 é excluído pela membrana plasmática intacta das células vivas. A determinação da viabilidade celular depende destas propriedades físicas e bioquímicas das células. Os eventos citotóxicos que não afectam estas propriedades celulares não podem ser correctamente avaliados utilizando este método. Os níveis de fluorescência de fundo são inerentemente baixos com esta técnica de ensaio devido ao facto de as tintas serem virtualmente não fluorescentes antes da sua interacção com as células.

Em adição aos vários pontos de ligação para o rastreio, existem duas outras características principais do processo de rastreio. A biblioteca de produtos de genes de

anticorpos não é uma biblioteca aleatória mas sim o produto de um procedimento de polarização. Nos exemplos abaixo, a polarização é produzida imunizando ratinhos com células fixas. Isto aumenta a proporção de anticorpos que possuem o potencial para se ligarem ao antígeno alvo. Ainda que a imunização seja vista como uma forma de produzir anticorpos de afinidade superior (maturação por afinidade) neste caso tal não se passa. De outra forma, pode ser considerado como uma forma de deslocar o conjunto de locais que combinam com os antígenos em direcção aos alvos. Isto é também distinto do conceito de troca de isotipo em que a funcionalidade, tal como ditado pela porção constante da cadeia pesada, é alterada do isotipo inicial IgM para outro isotipo tal como IgG.

A terceira característica chave que é crucial no processo de rastreio é a utilização de um rastreio multi-alvo. Até um certo ponto a especificidade está relacionada com a afinidade. Um exemplo deste facto é a situação em que um antígeno tem uma distribuição no tecido muito limitada e a afinidade do anticorpo é um determinante chave da especificidade do anticorpo - quanto maior for a afinidade mais o anticorpo será específico para aquele tecido e do mesmo modo um anticorpo com baixa afinidade pode ligar-se a outros tecidos que não o de interesse. Assim, para direccionar a questão da especificidade os anticorpos são rastreados simultaneamente contra uma variedade de células. Nos exemplos abaixo os sobrenadantes dos hibridomas (que representam os estágios iniciais do desenvolvimento dos anticorpos monoclonais), são testados contra um número de linhas celulares para estabelecer a especificidade bem como a sua actividade.

Os anticorpos são desenhados para o tratamento terapêutico do cancro em doentes. De um modo ideal, os anticorpos podem ser anticorpos nus. Eles também podem ser conjugados com toxinas. Eles podem ser utilizados para direccionar outras moléculas para o cancro, por exemplo, enzimas conjugadas com biotina. Os compostos radioactivos também podem ser utilizados para a conjugação.

É idealizada a utilização destes anticorpos para o diagnóstico, prognóstico e monitorização do cancro. Por exemplo, os doentes podem ter amostras de sangue concebidas para armazenar antigénios tumorais que podem ser detectados por estes anticorpos em diferentes formatos, tais como ensaios ELISA, formatos em placa de testes rápidos, etc. Os anticorpos podem ser utilizados para corar biopsias tumorais para efeitos de diagnóstico. Além disso, pode ser utilizado um painel de anticorpos terapêuticos para testar amostras de doentes no sentido de determinar se existem alguns anticorpos adequados para utilização terapêutica.

Exemplo Um

De modo a produzir anticorpos monoclonais específicos para uma amostra tumoral, o método de selecção dos poços de hibridoma apropriados é complicado pela probabilidade de seleccionar poços que produzam falsos sinais positivos. Isto é o mesmo que dizer que existe a probabilidade de produzir anticorpos que pode reagir contra células normais assim como as células de cancro. Para tornar mais óbvia esta possibilidade, uma estratégia possível passa por dissimular os anticorpos anti-antigénios normais do processo de selecção. Tal pode ser conseguido através da remoção dos anticorpos anti-normais no primeiro estágio do rastreio, revelando assim a presença dos anticorpos

desejados. A clonagem de diluição limitante subsequente pode delinear os clones que não irão produzir a morte de células de controlo mas produzirão a morte das células de cancro alvo.

Os espécimes de biopsia dos cancros de mama, melanoma e pulmão foram obtidos e armazenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem utilizados. Foram preparadas suspensões unicelulares e fixas com etanol a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 70%, lavadas com PBS e reconstituídas num volume apropriado para injeção. Os ratinhos Balb/c foram imunizados com $2,5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ células e foi feito um reforço a cada terceira semana até um reforço final pré-fusão, três dias antes da esplenectomia. Os hibridomas foram preparados por fusão dos esplénocitos isolados com parceiros Sp2/0 e NS1 de mieloma. Os sobrenadantes das fusões foram testados para subclonagem dos hibridomas.

As células (incluindo as células de melanoma A2058, fibroblastos CCD-12CoN, células de cancro da mama MCF-12A entre outras) foram obtidas na ATCC e cultivadas de acordo com as instruções que as acompanham. A linha de células HEY foi uma oferta do Dr. Inka Brockhausen. As células não cancerosas, por exemplo, os fibroblastos CCD-12CoN e as células do cancro da mama MCF-12A, foram plaqueadas em placas de microtitulação de 96 poços (NUNC), 1 a 2 semanas antes do rastreio. As células cancerosas, por exemplo, as células HEY, A2058, BT 483 e HS294t foram plaqueadas dois ou três dias antes do rastreio.

As células normais plaqueadas foram fixas antes da utilização. As placas foram lavadas com 100 microlitros de PBS durante 10 minutos à temperatura ambiente e depois

aspiradas a seco. Foram adicionados 75 microlitros de glutaraldeído a 0,01 por cento diluído em PBS a cada poço durante cinco minutos e depois aspirados. As placas foram lavadas com 100 microlitros de PBS três vezes, à temperatura ambiente. Os poços foram esvaziados e foram adicionados 100 microlitros de albumina do soro humano a um por cento em PBS a cada poço durante uma hora à temperatura ambiente. As placas foram então armazenadas a 4 graus Celsius.

Antes da transferência do sobrenadante das placas de hibridoma as células normais fixas foram lavadas três vezes com 100 microlitros de PBS à temperatura ambiente. Após a aspiração até aos microlitros da cultura primária de hibridomas os sobrenadantes foram transferidos para as placas com células fixas e incubados durante duas horas a 37 graus Celsius em um incubador a 8 por cento de CO₂. Os sobrenadantes dos hibridomas derivados de melanoma foram incubados com células CCD-12 CoN e aqueles derivados do cancro da mama foram incubados com células MCF-12a. Após a incubação o sobrenadante absorvido foi dividido em duas porções de 75 microlitros e transferido para placas com as células cancerígenas alvo. Antes da transferência as placas que contêm as células cancerígenas foram lavadas três vezes com 100 microlitros de PBS. O sobrenadantes das células CCD-12 CoN foram transferidos para as células A2058 e HS294t, enquanto os sobrenadantes das células MCF-12A foram transferidos para as células HEY e BT 483. As células cancerígenas foram incubadas com o sobrenadante dos hibridomas durante 18 horas a 37 graus Celsius em um incubador a 8 por cento de CO₂.

O ensaio de citotoxicidade Live/Dead foi obtido de Molecular Probes (Eu, OR). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante com as alterações descritas abaixo. As placas contendo as células foram lavadas uma vez com 100 microlitros de PBS a 37 °C. Foram transferidos 75 a 100 microlitros de sobrenadante das placas de microtitulação dos híbridos para as placas com células e incubados em um incubador a 8% de CO₂ durante 18-24 horas. Depois, os poços que serviram como controle de mortalidade total foram aspirados até ficarem vazios e foram adicionados 50 microlitros de etanol a 70%. A placa foi então esvaziada por inversão e seca por *blot*. Foram adicionados a cada poço 50 microlitros do corante fluorescente Live/Dead diluído em PBS e incubados a 37 °C numa incubadora de CO₂ a 5% durante uma hora. As placas foram lidas num leitor de fluorescência em placas Perkin Elmer HTS7000 e os dados foram analisados no Microsoft Excel.

Foram conduzidos quatro ensaios de rastreamento para produzir culturas de híbrido com clone isolado. Os sobrenadantes do híbrido foram testados em dois dos ensaios de rastreamento, apenas contra as células de cancro. No último ensaio de rastreamento, o sobrenadante foi testado contra algumas células sem ser de cancro, assim como as células-alvo indicadas na tabela 1. Os anticorpos foram sujeitos a isotipagem, utilizando um conjunto comercial de isotipagem.

Alguns anticorpos monoclonais foram produzidos de acordo com o método da presente invenção. Estes anticorpos, cujas características são resumidas na Tabela 1, são identificados como 3BD-13, 3BD-6, 3BD-8, 3BD-9, 3BD-15,

3BD-25, 3BD-26 e 3BD-27. Estes anticorpos são considerados monoclonais após quatro ensaios de clonagem de diluição limitante. Os anticorpos anti-melanoma não produziram morte celular do cancro suficiente. O painel de anticorpos anti-cancro da mama matou 32-87% das células alvo e <1-3% das células controlo. O isotipo predominante foi o IgG1 mesmo embora fosse esperado que a maioria dos anticorpos anti-tumor fossem direccionados contra os antigénios de hidratos de carbono e, assim, ser do tipo IgM. Há um elevado índice terapêutico pois a maioria dos anticorpos poupa as células controlo da morte celular.

Tabela 1 - Anticorpos Anti-Cancro da Mama.

Clones	% de Morte Celular			
	Alvo para Anticorpos Anti-Cancro da Mama (HEY e A2058)	Células de Fibroblasto Normais (CCD-12CoN)	Células de mama com doença fibroquística (MCF-12A)	Isotipo
3BD-3	74,9%	3,7%	<1%	$\gamma^{1,\lambda}$
3BD-6	68,5%	5,6%	<1%	$\gamma^{1,\lambda}$
3BD-8	81,9%	4,5%	2,6%	$\gamma^{1,\kappa}$
3BD-9	77,2%	7,9%	<1%	$\gamma^{1,\lambda}$
3BD-15	87,1%	<1%	<1%	$\gamma^{1,\lambda}$
3BD-26	54,8%	3,3%	<1%	$\mu^{1,\kappa}$
3BD-25	32,4%	3,6%	<1%	$\gamma^{1,\kappa}$
3BD-27	60,1%	8,3%	1,3%	$\gamma^{1,\kappa}$

Exemplo 2

Neste exemplo, os anticorpos anti-cancro adaptados são produzidos, primeiro obtendo amostras do tumor do doente. Normalmente estas provêm de um espécime de biopsia de um tumor sólido ou de uma amostra sanguínea de tumores hematogénicos. As amostras são preparadas em suspensões unicelulares e fixas para injeção em ratinhos. Após completar o horário de imunização os hibridomas são produzidos a partir dos esplenócitos. Os hibridomas são rastreados contra uma variedade de linhas de células de cancro e células normais em ensaios padrão de

citotoxicidade. Esses hibridomas que são reactivos contra as linhas de células de cancro mas não são reactivos contra as células normais não transformadas, são seleccionados para propagação adicional. Os clones que foram considerados positivos foram os que mataram selectivamente as células de cancro mas não mataram as células não transformadas. Os anticorpos são caracterizados relativamente a um grande número de parâmetros bioquímicos e depois humanizados para utilização terapêutica.

As células tumorais de melanoma isoladas e as linhas celulares foram cultivadas de acordo com o descrito no Exemplo 1. Os ratinhos Balb/c foram imunizados de acordo com o seguinte horário: 200.000 células s.c. e i.p. no dia 0, depois 200.000 células foram injectadas i.p. ao dia 21, depois 1.000.000 células foram injectadas ao dia 49, depois 1.250.000 células em adjuvante completo de Freund foram injectadas ao dia 107 i.p. e depois 200.000 células foram injectadas ao dia 120 i.p. e depois os ratinhos foram sacrificados ao dia 123. Os baços foram colhidos e os esplenócitos foram divididos em duas alíquotas para fusão com parceiros Sp2/0 (1LN) ou NS-1 (2LN) de mieloma, utilizando os métodos delineados no exemplo 1.

O rastreio foi levado a cabo 11 dias após a fusão contra as células de melanoma A2058 e fibroblastos CCD/12CoN. Cada par de placas foi lavado com 100 microlitros de PBS à temperatura ambiente e depois aspirada até secar completamente. Depois foram adicionados 50 microlitros de sobrenadante aos mesmos poços em cada uma das duas placas. O sobrenadante Sp2/0 dispendido foi adicionado aos poços de controlo ao mesmo volume e as placas foram incubadas durante cerca de 18 horas a 37 graus

Celsius num incubador com CO₂ a 8% e 98% de humidade relativa. Depois cada par de placas foi removido e nos poços de controlo positivo 50 microlitros de etanol a 70% foram substituídos pelo meio durante 4 segundos. As placas foram então invertidas e lavadas uma vez com PBS à temperatura ambiente e depois secas. Depois foram adicionados 50 µL de tinta fluorescente vivo/morto diluída em PBS (Molecular Probes Conjunto Live/Dead) durante uma hora e incubada a 37 graus Celsius. As placas foram então lidas num leitor de placas de fluorescência Perkin Elmer e a informação foi analisada usando o Microsoft Excel. Os poços que foram considerados positivos foram sub-clonados e o mesmo processo de rastreio foi repetido 13 dias depois e depois 33 dias mais tarde. Os resultados do último rastreio estão apresentados na Tabela 2 abaixo. Alguns anticorpos foram produzidos de acordo com o método da presente invenção. Estes anticorpos, cujas características estão resumidas na Tabela 2, são identificados como 1LN-1, 1LN-12, 1LN-14, 2LN-21, 2LN-28, 2LN-29, 2LN-31, 2LN-33, 2LN-34 e 2LN-35.

Tabela 2, Anticorpos Anti-Melanoma

Clones	% Morte Celular	
	Alvo para os Anticorpos Anti-Melanoma (A2068)	Fibroblastos Normais (CCD/1 2CoN)
1LN-1	59,4%	<1%
1LN-12	55,2%	1,4%
1LN/14	51,4%	<1%
2LN/21	72,0%	15,9%
2LN-28	66,6%	12,4%
2LN-29	78,2%	6,1%
2LN-31	100%	7,8%
2LN-33	94,2%	<1%
2LN-34	56,6%	11,2%
2LN-35	66,5%	6,6%

A tabela ilustra que os clones de ambas as fusões SP2/0 e NS-1 foram capazes de produzir anticorpos possuidores de uma taxa de indução de mortalidade para as células cancerígenas superior a 50% e ao mesmo tempo alguns dos clones foram capazes de produzir menos de um por cento de taxa de indução de mortalidade para os fibroblastos normais de controlo.

Os anti corpos anti-cancerígenos da invenção são úteis para tratar um paciente com uma doença de cancro quando administrados numa mistura com um adjuvante farmacêuticamente aceitável, por exemplo, solução salina normal, uma emulsão de lípidos, albumina, solução salina tamponada com fosfato ou semelhantes e são administrados numa quantidade efectiva para mediar o tratamento da doença cancerosa referida, por exemplo com um intervalo de cerca de 1 µg/mL a cerca de 1 g/mL.

O método para o tratamento de um doente que sofra de uma doença cancerosa pode incluir ainda a utilização de anticorpos anti-cancerígenos conjugados e tal iria incluir a conjugação de anticorpos anti-cancerígenos específicos para aquele doente com um membro seleccionado do grupo que consiste de toxinas, enzimas, compostos radioactivos e células hematogéneas; e a administração destes anticorpos conjugados ao paciente; em que tais anticorpos anti-cancerígenos são administrados em mistura com um adjuvante farmacêuticamente aceitável, por exemplo solução salina normal, uma emulsão de lípidos, albumina, solução salina tamponada com fosfato ou semelhantes e são administrados numa quantidade efectiva para mediar o tratamento da doença cancerosa referida, por exemplo com um intervalo de cerca de 1 µg/mL a cerca de 1 g/mL. Numa forma de realização

particular, os anticorpos anti-cancerígenos úteis em qualquer um dos métodos acima descritos pode ser um anticorpo humanizado.

Lisboa, 29 de Maio de 2008.

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para a produção de anticorpos anti-cancro utilizando uma amostra de tecido canceroso isolada a partir de um indivíduo em particular e que compreende: a produção de anticorpos utilizando a amostra de tecido como imunogéneo para a produção de hibridomas; sem efectuar ensaios prévios para ligação a células cancerígenas, sujeitar um sobrenadante dos hibridomas referidos a um ensaio que mede a citotoxicidade dos anticorpos produzidos em relação a células normais e a células cancerígenas; e

assim seleccionar um subgrupo de anticorpos que apresentem um grau de citotoxicidade aumentado direccionado para as células cancerígenas e que sejam relativamente benignos em relação às células normais.

2. O método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também o passo de remoção dos anticorpos anti-antígeno normal dos referidos anticorpos produzidos antes da realização do ensaio de citotoxicidade referido por pré-absorção do sobrenadante dos hibridomas com células normais.

3. (Nova) O método da reivindicação 1 ou da reivindicação 2, incluindo também o passo de humanização do referido subconjunto de anticorpos que apresentam um grau de citotoxicidade aumentado em direccionado para as células cancerígenas e que são relativamente benignos em relação às células normais.

Lisboa, 29 de Maio de 2008.