



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

**(11) PI 1008317-0 B1**



**(22) Data do Depósito:** 25/02/2010

**(45) Data de Concessão:** 03/05/2022

**(54) Título:** ANTICORPO CEMX-ESPECÍFICO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO, USO DO DITO ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO PARA TRATAR DOENÇAS MEDIADAS POR IGE E USO DE UM IMUNOGÊNICO OU UM ANÁLOGO COM PROPRIEDADE ANTIGÊNICA SIMILAR PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM PACIENTE

**(51) Int.Cl.:** C07K 16/28; A61K 39/395; A61K 38/10; A61P 37/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 25/02/2009 US 61/155,224.

**(73) Titular(es):** ACADEMIA SINICA.

**(72) Inventor(es):** TSEWEN CHANG; JIUN-BO CHEN; PHEIDIAS C. WU; ALFUR F. HUNG.

**(86) Pedido PCT:** PCT CN2010000232 de 25/02/2010

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/097012 de 02/09/2010

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 25/08/2011

**(57) Resumo:** ANTICORPO C<sub>2</sub>mX-ESPECÍFICO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO, USO DOS MESMOS e USO DE IMUNOGÊNICOS. A invenção está relacionada à geração e utilidade de anticorpos que podem eficazmente se ligar ao domínio C<sub>2</sub>mX em IgE ligado a membrana (mIgE) expressos na superfície de linfócitos B humanos. O domínio C<sub>2</sub>mX de 52 resíduos de aminoácidos, localizado entre o domínio CH4 e o peptídeo de ancoragem de membrana C-terminal na cadeia epsilon ligada à membrana humana. foi sugerido como um sítio antigênico para alvo imunológico de células B expressando mIgE. Anticorpos monoclonais anteriormente reportados, incluindo a20, que se liga ao peptídeo RADWPGPP no C-terminal de C<sub>2</sub>mX, foram verificados que se ligam fracamente a mIgE em células B humanas. Os presentes inventores verificaram agora que apenas anticorpos monoclonais específicos para certos segmentos, tais como GLAGGSAQSQRAPDRV L e HSGQQQLPRAAGGSVPHPR de C<sub>2</sub>mX podem se ligar eficazmente a mIgE sobre as células B humanas e, portanto, terem utilidade para atingir aquelas células B para o tratamento de doenças mediadas por IgE.

“ANTICORPO C<sub>em</sub>X-ESPECÍFICO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO, USO DO DITO ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO PARA TRATAR DOENÇAS MEDIADAS POR IgE E USO DE UM IMUNOGÊNICO OU UM ANÁLOGO COM PROPRIEDADE ANTIGÊNICA SIMILAR PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM PACIENTE”

#### Fundamentos da Invenção

[001]IgE tem um papel central na mediação reações de hipersensibilidade do tipo I, que são responsáveis por causar doenças alérgicas, incluindo asma alérgica, rinite alérgica, dermatite atópica, entre outros. Reações alérgicas são as respostas do sistema imunológico contra inofensivas substâncias ambientais, tais como ácaros da poeira de árvores, grama e pólen, certos alimentos e drogas, e abelhas e picadas de formiga. Em tais reações, a ligação de um alérgênio a IgE na superfície de células basófilas e mastócitos induz a ligação cruzada de IgE e a agregação dos receptores subjacentes de IgE. Fc, o tipo I dos receptores IgE.Fc, ou Fc $\epsilon$ RI. Esta agregação receptora subsequentemente, ativa a via de sinalização que leva à exocitose de grânulos e liberação de mediadores farmacológicos, como a histamina, leucotrienos, tripsase, citocinas e quimiocinas. A liberação dos mediadores dos mastócitos e basófilos induz as diversas manifestações patológicas da alergia.

[002]Anticorpos Anti-IgE que se ligam a IgE livre no sangue e no líquido intersticial e a mIgE sobre as células B, mas não a IgE ligados por Fc $\epsilon$ RI em basófilos e mastócitos, têm sido desenvolvidos para tratar doenças alérgicas mediadas por IgE. O tratamento com um anticorpo anti-IgE humanizado, omalizumab (nome comercial Xolair), mostrou vários efeitos farmacológicos na atenuação de hipersensibilidade do tipo I em várias indicações alérgicas. O anticorpo se liga a IgE com alta afinidade a um sítio no domínio CH3 de Fc que se sobrepõe com o sítio de ligação da Fc $\epsilon$ RI. Assim, a terapêutica é baseada na ligação do anticorpo a IgE livre e a mIgE em linfoblastos B e em células B de memória, o que leva à redução do nível de IgE total livre

no sangue e no líquido intersticial.

[003]A ligação do anti-IgE a IgE livre ainda impede ligação de IgE a FcεRI na superfície de basófilos e mastócitos. Como o FcεRI desocupado por IgE é instável e em seguida internalizado e degradado, o esgotamento de IgE livre com ligação anti-IgE também gradualmente sub-regula FcεRI em basófilos e mastócitos. Evidências quanto a outros efeitos da terapia de anticorpos foram encontradas, incluindo a neutralização das atividades citocinérgicas, a atenuação da atividade inflamatória em geral, e, possivelmente, a varredura de alergênicos através da acumulação de imuno-complexos IgE-anti-IgE.

[004]Um dos inventores (TW Chang) da presente invenção descobriu que, adicionalmente ao sítio antigênico em CH3 de IgE que o omalizumab se liga, um outro sítio antigênico, referido como CεmX, existe no mIgE humanos para ter por alvo linfócitos B expressando mIgE. CεmX é um segmento de 52 aminoácidos, situado entre o domínio CH4 e o segmento de ancoragem membrana C-terminal da cadeia ε de ligação à membrana humana (mε). Foi demonstrado que na maioria dos indivíduos humanos estudados mε sem CεmX (mεs) concorre para diminutas proporções, enquanto a cadeia mε com CεmX (mεL) é predominantemente expressa. Os mRNAs para a cadeia ε do IgE livre, secretada e para mεs e mεL de mIgE são todos derivados da junção alternativa do transcrito ε RNA. As sequências aminoácidos e nucleotídeos de CεmX são únicos nas proteínas completas e nas bases de dados do DNA. Portanto, CεmX fornece um sítio antigênico único para a segmentação mIgE e células B expressando-mIgE.

[005]O grupo de pesquisa de Chang relatou anteriormente o desenvolvimento de diversos anticorpos CεmX-específicos de camundongos, incluindo a20, que pode se ligar a proteínas recombinantes contendo segmento CεmX e a células da linhagem de células SKO-007, que era uma linha celular derivada de mieloma humano expressando mIgE humana, e a células de uma linhagem de células CHO, que foi

transfectada com o gene correspondente ao segmento proveniente do domínio CH2 através da terminação citoplasmática de mεL (mεL (CH2-CM); CM: citoplasma). O anticorpo monoclonal a20 e todos os anticorpos desenvolvidos anteriormente foram descobertos se ligarem a uma região 8-a. a. região peptídica, RADWPGPP, resíduos # 45-52, na extremidade C-terminal do domínio 52 a. a. CεmX.

#### Sumário da Invenção

[006]Essa invenção está relacionada ao desenvolvimento e a identificação de anticorpos que são específicos para domínio CεmX de mIgE humano e que pode se ligar ao mIgE nos linfócitos B humanos. Ele também pertence à utilidade destes anticorpos no tratamento de doenças alérgicas e outras que são mediadas por IgE.

[007]No estudo do anticorpo monoclonal anti-CεmX a20, que foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Chang, verificou-se que a20 tem boa ligação com a linhagem celular gene-transfectadas mεL (CH2-CM), tais como linhagens de células CHO ou NSO, que não expressam Igα (CD79a), Igβ (CD79b), CD21, CD 19, CD81, e outras proteínas associadas com receptores de células B (BCR). No entanto, a20 foi descoberta se ligar mal às linhagens genéticas transfectadas mεL (CH2-CM) que expressam Igα, Igβ, e outras proteínas BCR-associadas, tais como linhagens celulares Ramos. Temos por hipótese que o epítipo antigênico em CεmX reconhecido por a20 pode ser bloqueado por certas proteínas BCR-associadas. Portanto, um anticorpo monoclonal a20 e suas versões quiméricas ou humanizadas não seriam adequadas para uso em pacientes humanos in vivo com o propósito de atingir linfoblastos B expressando mIgE e células de memória.

[008]Se o epítipo peptídico, RADWPGPP, é o único epítipo a induzir resposta de anticorpos, anticorpos monoclonais gerados a partir de metodologia hibridoma usando camundongos que são imunizados com proteínas contendo CεmX humanas seriam todos específicos para esta região peptídica. No entanto, se esse epítipo é um epítipo dominante, mas não o único epítipo imunogênico, os anticorpos

monoclonais específicos para epítomos antigênicos outros C $\epsilon$ mX podem ser ainda desenvolvidos. É possível que exista um epítomo(s) em C $\epsilon$ mX que não esteja bloqueado por proteínas BCR-associadas para ligação anticorpo. Se assim for, um anticorpo que se liga a IgE em células B e que pode ser usado para alvejar as células B podem ainda ser desenvolvidos.

[009]Nos exemplos a seguir, foi demonstrado de forma bem sucedida que embora RADWPGPP seja um epítomo dominante, ele não é o único epítomo imunogênico e antigênico em C $\epsilon$ mX. Além disso, foi verificado que os anticorpos monoclonais, 4BI 2 e 26H2, que se ligam a C $\epsilon$ mX em epítomos antigênicos não situados na região de RADWPGPP. Esses anticorpos monoclonais não competem com o anticorpo a20 na ligação a C $\epsilon$ mX. Eles se ligam a mIgE nas células B muito mais fortemente do que a20 e são muito mais eficazes do que a20 em causar a citólise anticorpo-dependente e a apoptose de células que expressam-mIgE.

[0010]Os exemplos indicam que os anticorpos monoclonais, tais como 4BI 2 e 26H2, podem se ligar a mIgE nos linfócitos B humanos e são adequados para uso com o objetivo de atingir linfoblastos B expressando-mIgE e células B de memória para a sub-regulação da síntese de IgE. Os anticorpos quiméricos ou em formas humanizadas serão úteis para uso em pacientes afetados com Doenças alérgicas mediadas por IgE, como asma alérgica, rinite alérgica e dermatite atópica. Uma vez que a neutralização de IgE por anti-IgE foi demonstrado tratar eficazmente urticária induzida pelo frio, urticária crônica, urticária colinérgica, rinosinusite crônica, mastocitose sistêmica, mastocitose cutânea, aspergilose broncopulmonar alérgica, angioedema idiópática recorrente, e cistite intersticial, ou distúrbios gastrointestinais associados aos eosinófilos, os anticorpos, como 4BI 2 e 26H2, também pode ser aplicados para tratar essas doenças diversas.

[0011]Os exemplos sugerem ainda a utilidade potencial dos peptídeos reconhecidos por 4BI 2 e 26H2 na indução de resposta imune contra C $\epsilon$ mX e, portanto,

células B expressando mlgE. Os peptídeos e seus análogos com propriedades antigênicas semelhantes, ou seja, com atividade de ligação aos anticorpos anti-C $\epsilon$ mX, tais como 4BI 2 e 26H2, podem ser usados individualmente ou em combinação molecular em construções que também contêm frações que podem induzir ajuda por células-T. Tais construções podem induzir a imunização ativa contra a células B expressando mlgE e, assim, atingir os efeitos do sub-regulação da síntese de IgE total.

[0012]Exemplo 1: Novos anticorpos monoclonais anti-C $\epsilon$ mX ligantes a sítios antigênicos outros que RADWPGPP

[0013]Para induzir imuno respostas anti-C $\epsilon$ mX, camundongos BALB/c foram imunizados duas vezes por via subcutânea com 50 mg de proteínas mlgE.FcL recombinantes solubilizadas em n-undecila- $\beta$ -d-maltopiranosida (UDM; Anatrace) que foram emulsionadas em adjuvante TiterMax Gold (Sigma-Aldrich) de acordo com sugestões do fabricante em intervalos de 2 semanas. Evitamos o protocolo de hiper-imunização, tal que os camundongos não puderam produzir anticorpos somente no sentido do epítopo dominante RADWPGPP. Um reforço final foi dado intraperitonealmente com 0,1 mg de Proteínas recombinantes mlgE.FcL UDM-solubilizadas sem adjuvante. Um dia antes da fusão, as células NSO foram ressemeadas em meio DMEM fresco (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS; Invitrogen), e 1% de mistura penicilina-estreptomicina (100 $\times$  solução Pen-Strep; Invitrogen) em uma densidade celular de 5X10<sup>5</sup> células/mL. Três dias após o impulso final, as células do baço de dois camundongos imunizados foram colhidas e lavadas com meio DMEM livre de soro duas vezes. 5X10<sup>7</sup> células NSO foram colhidos e lavados com soro meio sem DMEM duas vezes. Após a lavagem, as células do baço e células NSO foram fundidas, adicionando 1 mL de polietilenoglicol 1500 pré-aquecido (PEG 1500, Roche Applied Science), enquanto agitando continuamente as células delicadamente com a ponta da pipeta por mais 1 min, agitando as células por mais 1 minuto, adicionando 2 mL de DMEM pré-aquecido sem soro por mais 2 min e, finalmente,

adicionando 8 mL de DMEM livre de soro por mais 2 min. Após centrifugação a 200 xg por 10 min, as células foram fundidas ressuspensas com 600 mL de meio HAT [meio DMEM suplementado com 2% mistura hipoxantina-aminopterin-timidina (solução HAT de 50 x; "Invitrogen), 10% BM-Condimed H1 (Roche Ciências Aplicadas), 10% FBS inativado pelo calor e 1% de mistura penicilina-estreptomicina], distribuídos em 30 placas de 96 cavas de cultura a 200 mL/cava. Nos dias 3, 100 µL do meio HAT foi adicionado a cada cava. Em dias 7 e 10, o meio era refrescado mediante aspiração da metade do volume de cada cava e substituição com meio HAT. Nos dias 14, os sobrenadantes hibridoma foram usados para triagem de mAbs anti-C $\epsilon$ mX quanto a ligação às proteínas mlgE.Fcs ou mlgE.FcL UDM-solubilizadas através de ensaio imunossorvente articulado por enzima (ELISA).

[0014] Para a triagem de hibridomas secretores de anti-C $\epsilon$ mX mAbs por ELISA, purificadas proteínas mlgE.FcL ou mlgE.Fcs UDM-solubilizadas foram revestidas em placas de 96 cavas Maxisorp (Nunc) a 50 ng/cava em 0,1 M NaCO<sub>3</sub> (pH 9,6) a 40 °C durante a noite. Cavidades foram bloqueadas por 200 µL/cava de 1% BSA% em PBS à temperatura ambiente por 1 hora. Placas foram lavadas três vezes com 200 µL/cava de PBS com 0,05% Tween-20, seguido pela adição de 100 µL de sobrenadante hibridoma às cavas. A incubação foi realizada à temperatura ambiente por 2 horas. Todos os cavas foram aspirados e lavados seis vezes com 200 µL/cava de PBS com 0,05% Tween-20. As placas foram incubadas com uma diluição de 1:10.000 do conjugado de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo HRP-conjugado (Chemicon) por 1 hora (100 µL/cava). Em seguida, todas as cavas foram aspiradas e lavadas seis vezes com 200 µL/cava de PBS com 0,05% Tween-20. Finalmente, as cavas foram desenvolvidas por 50 µL/cava de solução de substrato tetrametil benzidina (TMB) (SureBlue™, KPL) e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL/cava de HCl 1N. A absorbância foi medida em OD450 em um leitor de ELISA. Dos > de 4000 clones hibridoma ensaiados a partir de duas fusões, 17 clones apresentaram especificidade

para mlgE.FcL UDM-solubilizado em lugar de mlgE.Fcs conforme determinado por ELISA.

[0015] Para explorar a especificidade do anti-C $\epsilon$ mX mAbs relativamente a C $\epsilon$ mX, os diversos clones C $\epsilon$ mX-específicos foram então testados quanto a reatividade com três peptídeos sintéticos, o que representa três segmentos consecutivos de C $\epsilon$ mX, dividido por resíduo C localizado no resíduo # 18 e um segmento de CHC nos resíduos # 39-41. Especificamente, o peptídeo P1 contém os últimos quatro resíduos de aminoácidos de CH4 e de m $\epsilon$  e os primeiros 17 resíduos de aminoácidos (# 17/01), a saber, GLAGGSAQSQRAPDRV L, de C $\epsilon$ mX; peptídeo P2 contém 20 resíduos de aminoácidos # 19-38, ou seja, HSGQQQGLPRAAGGSVPHPR, de C $\epsilon$ mX; peptídeo P3 contém os 11 resíduos aminoácidos terminais (# 42-52), ou seja, GAGRAD WPGPP, de C $\epsilon$ mX e os 4 primeiros resíduos aminoácidos da região migis consecutivos, ou seja, a região extracelular N-terminal do peptídeo âncora da membrana da cadeia m $\epsilon$ . Todos os peptídeos foram sintetizados em Genomics Research Center, Academia Sinica (Taipei, Taiwan). Os peptídeos foram reconstituídos com PBS na concentração de 10 mg/mL. Todos os peptídeos foram revestidos em placas de 96 cavas Maxisorp a 500 ng/cava em 0,1 M NaCO<sub>3</sub> (pH 9,6) a 40 °C durante a noite. Cavidades foram bloqueados por 200 mL/cava de uma BSA% em PBS à temperatura ambiente por 1 hora. Placas foram lavadas três vezes com 200  $\mu$ L/cava de PBS com 0,05% Tween-20, seguido pela adição de 100  $\mu$ L de 1 mg/mL anti-C $\epsilon$ mX mAbs aos cavas. A incubação foi realizada à temperatura ambiente por 2 horas. Todas as cavas foram aspiradas e lavadas seis vezes com 200 mL/cava de PBS com 0,05% Tween-20. As placas foram incubadas com um 1:10.000 diluição de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo HRP-conjugado por 1 hora. Depois de seis vezes com 200  $\mu$ L/cava de PBS com 0,05% Tween-20, 50  $\mu$ L/cava de solução de substrato TMB foi adicionado nas cavas. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L/cava de HCl 1N. A absorbância foi medida em OD450 em um leitor ELISA. Dos muitos anticorpos



C $\epsilon$ mX-monoclonais específicos preparados em nossos experimentos, apenas 4BI 2 e 26H2 não reagem com RADWPGPP contendo peptídeo e o P3. 4BL dois reagiram com peptídeo P1, e 26H2 com peptídeo P2. Todos os demais anticorpos monoclonais C $\epsilon$ mX-específicos reagiram com P3 (Figura 1). Assim, RADWPGPP é realmente um epítopo imunogênico dominante. No entanto, ele não é o único epítopo imunogênico.

[0016]Exemplo 2: 4BI 2 e 26H2 se ligam a mlgE em células B que expressam mlgE

[0017]Foi ainda testada a capacidade dos diversos anticorpos C $\epsilon$ mX- monoclonais específicos para ligar às linhagens celulares de CHO e Ramos que foram transfectadas com DNA recombinante ou codificação m $\epsilon$ L(CH2-CM) ou m $\epsilon$ s(CH2-CM). As duas linhagens de células CHO transfectadas respectivamente produziram respectivamente mlgE.FcL ou mlgE.Fcs, ambas as quais não formam receptores células B com co-receptores tais como Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ , porque as células CHO não expressam essas proteínas. As duas transfectadas linhagens de células produziram respectivamente mlgE.FcL ou mlgE.Fcs, ambas as quais formam complexos com seus co-receptores naturais. Para investigar a ligação do anti-C $\epsilon$ mX mAbs aos nativos C $\epsilon$ mX, células CHO ou Ramos que expressam mlgE.FcL ou mlgE.Fcs foram ressuspensas em tampão FACS [PBS, 1% FBS, azida de sódio a 0,1%, e 2 mM EDTA (pH 8,0)] a uma densidade de células de 10<sup>7</sup> células/mL. 10<sup>6</sup> células foram então incubadas por 30 min no gelo com 100  $\mu$ L de sobrenadante hibridoma, seguido por lavagem com tampão FACS. Anticorpos ligados foram detectados por incubação por 30 minutos no gelo com fragmento F(ab')<sub>2</sub> FITC-marcado de coelho específico para IgG (ABD Serotec), seguido de lavagem por duas vezes com tampão FACS antes da análise. Experimentos de citometria de fluxo foram realizados usando um citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Bioscience) e analisados utilizando software FCSEXPRESS (Software De Novo). A Au dos anticorpos monoclonais C $\epsilon$ mX-específicos não foram encontrados para se ligar a células CHO e Ramos que expressam mlgE.Fcs. Todos os

anticorpos monoclonais C $\epsilon$ mX-específicos foram verificados se ligarem a células CHO expressando mlgEL. No entanto, apenas 4BI 2 e 26H2 puderam se ligar a células Ramos expressando mlgE.FcL, enquanto todos os outros anticorpos monoclonais C $\epsilon$ mX-específicos não puderam se ligar a células Ramos expressando mlgE.FcL (Figura 2).

[0018]Exemplo 3: 4BI 2 e 26H2 induzir anticorpos contra a citotoxicidade celular dependente células B expressando mlgE

[0019]Para investigar a atividade ADCC de anti-C $\epsilon$ mX mAbs quimérico, usamos células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) como células efetoras para atingir células mlgE.FcL que expressam Ramos. PBMCs foram purificados a partir de revestimentos de células brancas de doadores saudáveis (Banco de Sangue de Taiwan) por centrifugação em um gradiente de densidade em placa de Ficoll- Plus (GE Healthcare) e criopreservados em 90% FBS/10% DMSO (Hybri-Max <sup>TM</sup>; Sigma-Aldrich). Antes do uso, PBMCs foram descongeladas e cultivadas em  $2 \times 10^6$  células/mL durante a noite em meio IMDM (Invitrogen) suplementado com 10% inativado pelo calor FBS e 1% de mistura penicilina-estreptomicina. Para identificar as células-alvo em co-cultura com PBMCs, células mlgE.FcL expressando Ramos foram marcadas com 2,5  $\mu$ M diacetato de 5-(e -6)-carboxifluoresceína, éster de succinimidila (CFDA, SE; Invitrogen) em 0,1% BS A/PBS por 10 min a 37 °C. Após três lavagens com meio RPMI em água fria (Invitrogen), contendo 10% FBS, as células foram ajustadas a 105 células/mL. Para as efetivas titulações de relações (E/T), 20.000 células marcadas em 200  $\mu$ L de meio RPMI completo foram revestidas com anticorpos de 1  $\mu$ g/mL por 30 min a 37 °C, em seguida, combinados com um volume igual de PBMCs em várias relações E/T de 50 a 3,125. Para titulações de anticorpos, 20.000 células marcadas em 200  $\mu$ L em meio RPMI completo foram opsonizadas com anticorpos em várias concentrações (1.000-0,01 ng/mL) durante 30 minutos a 37 °C, e então combinados com PBMCs em uma relação E/T de 25:1. Para medir a morte independentemente de

anticorpos, as células-alvo marcadas também foram incubadas com PBMCs na ausência de anticorpos em dadas relações E/T. No final de 24 horas de incubação, as células mortas foram coradas com 2,5 mg/mL 7-amino actinomicina (7-AAD; Invitrogen) por 15 min no gelo. As células foram analisadas em um citômetro de fluxo FACS-Canto II Becton Dickinson. Células-alvo vivas foram definidas como a percentagem de células CFSE-positivas/7-AAD-negativa em análises do tipo “dot-plot”. A percentagem de células mortas em uma dada relação E/T foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:  $100 \times [(\% \text{ de células-alvo vivas no controle anticorpo-independente} - \% \text{ de células vivas alvo na amostra}) / \% \text{ das células alvo vivas no controle anticorpo-independente}]$ . A atividade de ADCC c4B12, c26H2 e omalizumab foi observada em várias relações E/T. Em uma relação E/T de 50, c4B12, c26H2 omalizumab e deu até 60% de lise específica, em contraste, CA20 foi menos ativo e deu apenas 10-20% de lise específica (Figura 3A). Além disso, uma significativa ADCC foi observada quando a concentração de c4B12 e c26H2 foi superior a 0,01 µg/mL. Na dose máxima de 10 µg/mL, a lise específica de células-alvo por c4B12 e c26H2 variou de 80% a 90%, enquanto CA20 deu até 50% de lise específica (Figura 3B). O controle positivo rituximab, que direcionou a CD20, e omalizumab efetivamente induziu a ADCC em várias relações E/T e em modo dose-resposta. Assim, concluímos que c4B12 e c26H2 são mAbs anti-C $\epsilon$ mX mais potentes que CA20 em mediar ADCC e podem recrutar de modo eficiente células efectoras para atingir células B que expressam mIgE *in vivo*.

[0020]Exemplo 4: Quimérico anti-C $\epsilon$ mX mAbs induzir a apoptose de ligada à membrana IgE. FcL células que expressam Ramos

[0021]Para detectar a exposição de fosfatidilserina (PS), células Ramos expressando mIgE. FcL (5x10<sup>5</sup> células/mL) foram incubadas com anti-C $\epsilon$ mX mAbs quimérico, os anticorpos omalizumab ou controle em concentrações indicadas em meio de cultura completo por uma hora a 37 °C. As células foram então tratadas com fragmento F(ab')<sub>2</sub> de cabra específico para o fragmento Fc da IgG humana (Jackson

ImmunoResearch Laboratories Inc.) na concentração de 10 µg/mL e incubadas por mais 24 horas a 37 °C. A detecção da exposição a fosfatidilserina (PS) foi avaliada pela coloração de células em 200 µL de tampão anexina [10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>] contendo fluoresceína isotiocianato (FITC) marcado com anexina V (Bio Vision), diluído 1/200 e 2,5 mg/mL de iodeto de propídio (PI, Sigma-Aldrich) por 15 min no escuro à temperatura ambiente. As células foram analisadas em um citômetro de fluxo FACSCanto II. Células apoptóticas foram definidas como a percentagem de células anexina V-positiva/PI-negativa em análises de marcação por pontos. Aproximadamente 80% das células Ramos que expressam mlgE.FcL foram mortas através da apoptose pelo aumento da concentração de c4B12, c26H2, ou omalizumab, mas não com CA20, com indução máxima em 1 µg/mL (Figura 4A).

[0022] Para a detecção de núcleos apoptóticos, células Ramos expressando mlgE.FcL (5x10<sup>5</sup> células/mL) foram incubadas com anti-C $\epsilon$ mX mAbs quimérico, os anticorpos omalizumab ou controle em uma concentração de 1 µg/mL em meio de cultura completo para uma hora a 37 °C. As células foram então tratadas com fragmento F(ab')<sub>2</sub> de cabra específico para o fragmento Fc de IgG humana em uma concentração final de 10 µg/mL e incubadas por mais 48 horas a 37 °C. 5X10<sup>5</sup> células foram incubadas em 0,5 mL de iodeto de propídio solução (PI)/Triton (citrato de sódio 0,1%, 0,1% Triton X-100, 15 mg/mL PI, e 100 mg/mL em PBS RNase A, todos da Sigma-Aldrich) por uma hora no escuro sobre o gelo. A fluorescência PI foi determinada em um citômetro de fluxo FACSCanto II. O conteúdo de DNA intacto dos núcleos foi registrado em uma escala linear. Núcleos apoptóticos contendo emissores hipodiploides de fluorescência de DNA nos canais abaixo do pico G0ZG1 foram enumerados como uma porcentagem da população total. Um aumento significativo na população de células com DNA hipodiploides foi observada em c4B12, c26H2, ou em células Ramos expressando mlgE.FcL tratadas com omalizumab (Figura 4B).

[0023] Para a detecção de caspase 3 e clivagem poli(ADP-ribose)polimerase (PARP), células Ramos expressando mlgE.FcL ( $5 \times 10^5$  células/mL) foram incubadas com anti-C $\epsilon$ mX mAbs quimérico, anticorpos omalizumab ou controle em uma concentração de 1  $\mu$ g/mL em meio de cultura completo por uma hora a 37 °C. As células foram então tratadas com fragmento F(ab')<sub>2</sub> de cabra específico para o fragmento Fc de IgG humana em uma concentração final de 10  $\mu$ g/mL e incubadas por mais 24 horas a 37 °C.  $5 \times 10^6$  células foram lavadas em PBS gelado e ressuspensas em 100  $\mu$ L de tampão de lise RIPA modificado resfriado em gelo [20 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% Triton-X 100, desoxicolato 0,5%, sulfato de sódio a 0,1% dodecil (SDS), 5 mM inibidor EDTA, e protease (Sigma-Aldrich)]. Os lisados foram incubados por 20 min no gelo. Amostras foram centrifugadas por 20 min em 16000xg e 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para um tubo de 1,5 mL fresco e armazenado a -80 °C. A quantidade de proteína em cada lisado clarificado foi quantificada usando o ensaio Protein DC (Bio-Rad Laboratories) de acordo com sugestões do fabricante. Cada amostra foi normalizada quanto ao teor de proteína total e foi submetido a SDS-eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), seguido de transferência para membranas PVDF (GE Healthcare). Anticorpos policlonais de coelho para caspase-3 e PARP foram obtidos a partir de Cell Signaling Technology e foram usados em 1:500 diluições. Anticorpos secundários de cabra anti-IgG de coelho HRP-conjugado (Sigma-Aldrich) foi usado em 1:10.000 diluições. Membranas foram desenvolvidas com um reagente ECL (Immobilon™ occidental; Millipore). A carga de proteína equivalente foi verificada examinando o borrão com um anticorpo para  $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich). 24 horas após mlgE.FcL células que expressam Ramos foram tratados por c4B12, c26H2 e omalizumab, ao invés de CA20, a clivagem da caspase-3 como fragmentos Mx 19- e 17-kDa ficou evidente. Além disso, a clivagem de PARP foi detectável em c4B12, c26H2, e tratados com células Ramos expressando mlgE.FcL tratadas com omalizumabe usando um anticorpo reconheceu o PARP MX 116 kDa intacto e o

produto de clivagem Mx 89 kDa (Figura 4C).

#### Breve Descrição das Figuras

[0024]A Figura 1 mostra os três peptídeos sintéticos representando os segmentos consecutivos de C $\epsilon$ mX e a reatividade de vários anti-C $\epsilon$ mX mAbs com os peptídeos. Os resíduos de aminoácidos do domínio C $\epsilon$ mX são mostrados em negrito.

[0025]A Figura 2 mostra a ligação de vários anti-C $\epsilon$ mX mAbs de linhagens de células CHO ou Ramos que expressam mlgE.FcL ou mlgE.Fcs.

[0026]A Figura 3 mostra que c4B12 quimérico e c26H2 induzem ADCC contra células Ramos que expressam mlgE.FcL em várias relações E/T. Figura 3B mostra que quiméricos c4B12 e c26H2 induzem ADCC contra células Ramos que expressam mlgE.FcL de maneira dose-resposta.

[0027]A Figura 4 mostra que a exposição PS induzida por quiméricos c4B12 e c26H2 em células Ramos que expressam mlgE.FcL é dose-dependente. Figura 4B mostra que os núcleos apoptóticos foram observados em quiméricos c4B12 e c26H2 tratados com células Ramos expressando mlgE.FcL. A Figura 4C mostra que a clivagem da caspase 3 e PARP foram observados em quiméricos c4B12 e c26H2 tratados com células Ramos expressando mlgE.FcL.

[0028]Figura 5 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos de VL e VH de mouse gerador 4B1 2, os escolhidos modelos de linhagens germinativas humanas KV2 e HV4 para VL e VH, respectivamente, e o 4BL humanizado 2 (hu4B12), rotulados como "Replace" nos alinhamentos. Este hu4B12 tem a mesma afinidade de ligação para proteínas recombinantes C $\epsilon$ mX e células Ramos que expressam mlgE.FcL como 4B 12 quimérico (C4b 12).

#### Referências mencionadas a documentos de Patentes Relacionados

US 5,091,313	2/1992	Chang
US 5,254,671	10/1993	Chang
US 5,260,416	11/1993	Chang

US 5,274,075	12/1993	Chang
US 5,292,867	3/1994	Chang
US 5,342,924	8/1994	Chang
US 2009/0010924A1		Wu

Outras referências

[0029]Davis FM, Gossett LA, Chang TW (1991) An epitope on membrane-bound but not secreted IgE: implications in isotype-specific regulation. Bio/Technology 9: 53-56.

[0030]Peng C, Davis FM, Sun LK, Liou RS, Kim YW, Chang TW (1992) A new isoform of human membrane-bound IgE. J Immunol 148: 129-136.

[0031]Chen, H.Y., Liu, F.T., Hou, C.M.H., Huang, J.S.W., Sharma, B.B., and Chang, TW. (2002) Monoclonal antibodies against C $\epsilon$ mX domain in human membrane-bound IgE and their potential on targeting IgE-expressing B cells. Int. Archives Allergy & Immunol. 128, 315-324.

### REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo C $\epsilon$ mX-específico ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é capaz de se ligar a IgE ligada à membrana de linfócitos B humanos e incapaz de se ligar ao peptídeo RADWPGPP, e ainda é capaz de se ligar a GLAGGSAQSQRAPDRV L (SEQ ID NO: 2), em que o anticorpo compreende as regiões hipervariáveis de cadeia leve apresentadas pelos aminoácidos nas posições 24 a 39 da SEQ ID NO: 5 (CDRL1), os aminoácidos nas posições 55 a 61 da SEQ ID NO: 5 (CDRL2) e os aminoácidos nas posições 94 a 102 da SEQ ID NO: 5 (CDRL3), e as regiões hipervariáveis de cadeia pesada apresentadas pelos aminoácidos nas posições 26 a 36 da SEQ ID NO: 8 (CDRH1), os aminoácidos nas posições 51 a 66 da SEQ ID NO: 8 (CDRH2) e os aminoácidos nas posições 98 a 106 da SEQ ID NO: 8 (CDRH3).

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico compreendendo as regiões variáveis de um anticorpo monoclonal de camundongo e regiões constantes de anticorpos humanos.

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal humanizado que compreende essencialmente as regiões hipervariáveis de um anticorpo monoclonal de camundongo e as regiões *framework* e regiões constantes de anticorpos humanos.

5. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo humano.

6. Anticorpo ou fragmento de ligação, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o fragmento é um Fab, F(ab)<sub>2</sub> ou Fv de cadeia única.



7. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a produção de um medicamento para tratar doenças mediadas por IgE.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as doenças mediadas por IgE são asma alérgica, rinite alérgica ou dermatite atópica.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as doenças mediadas por IgE são urticária induzida pelo frio, urticária crônica, urticária colinérgica, rinosinusite crônica, mastocitose sistêmica, mastocitose cutânea, aspergilose broncopulmonar alérgica, angioedema idiopática recorrente, cistite intersticial ou distúrbios gastrointestinais associados aos eosinófilos.

10. Uso de um imunogênico contendo GLAGGSAQSQRAPDRV L (SEQ ID NO: 2) ou um análogo com propriedade antigênica similar, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a produção de um medicamento para induzir resposta imune em pacientes *in vivo*, em que o imunogênico compreende as regiões hipervariáveis de cadeia leve apresentadas pelos aminoácidos nas posições 24 a 39 da SEQ ID NO: 5 (CDRL1), os aminoácidos nas posições 55 a 61 da SEQ ID NO: 5 (CDRL2) e os aminoácidos nas posições 94 a 102 da SEQ ID NO: 5 (CDRL3), e as regiões hipervariáveis de cadeia pesada apresentadas pelos aminoácidos nas posições 26 a 36 da SEQ ID NO: 8 (CDRH1), os aminoácidos nas posições 51 a 66 da SEQ ID NO: 8 (CDRH2) e os aminoácidos nas posições 98 a 106 da SEQ ID NO: 8 (CDRH3).

11. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo se liga a IgE ligada à membrana de linfócitos B humanos.

12. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de

aminoácidos da SEQ ID NO: 5.

13. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo humanizado que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 7.

FIG. 1

	CH4	C <sub>α</sub> mX	migis
	SVNPGLAGGSAQSQRAPDRVL	SVNPGLAGGSAQSQQLPRAAGGSVPHPRCHCGAGRADWPGPPPELDV	
P1	SVNPGLAGGSAQSQRAPDRVL		
P2		HSGQQQLPRAAGGSVPHPR	
P3			GAGRADWPGPPPELDV

	5H2	mlgG	a20	1G2	3A6	3H11	6H12	18A11	1A8	4B12	23B8	26H2
P1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
P2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
P3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
mlgE.FcL	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
mlgE.Fcs	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IgE	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 2

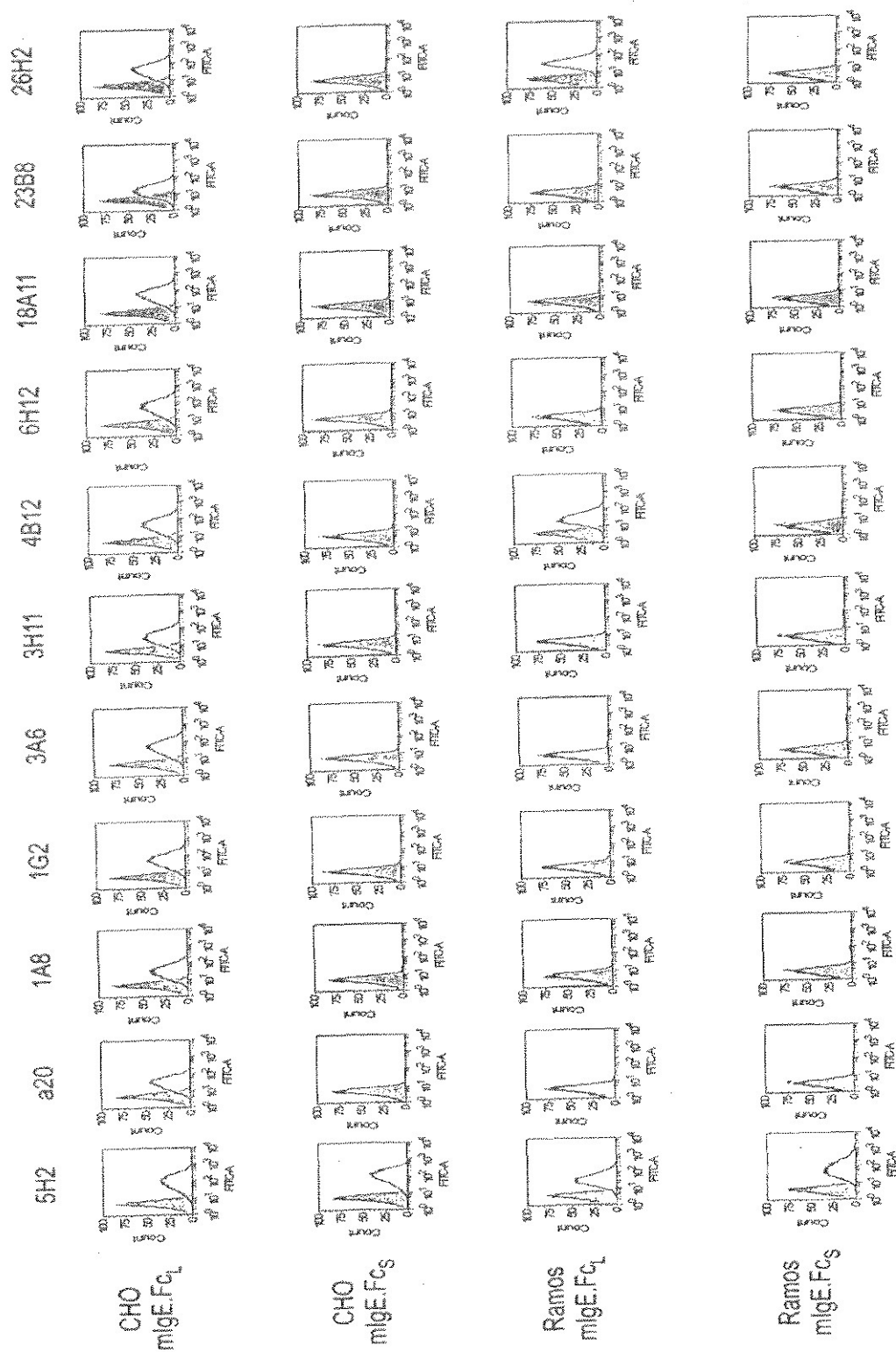


FIG. 3A

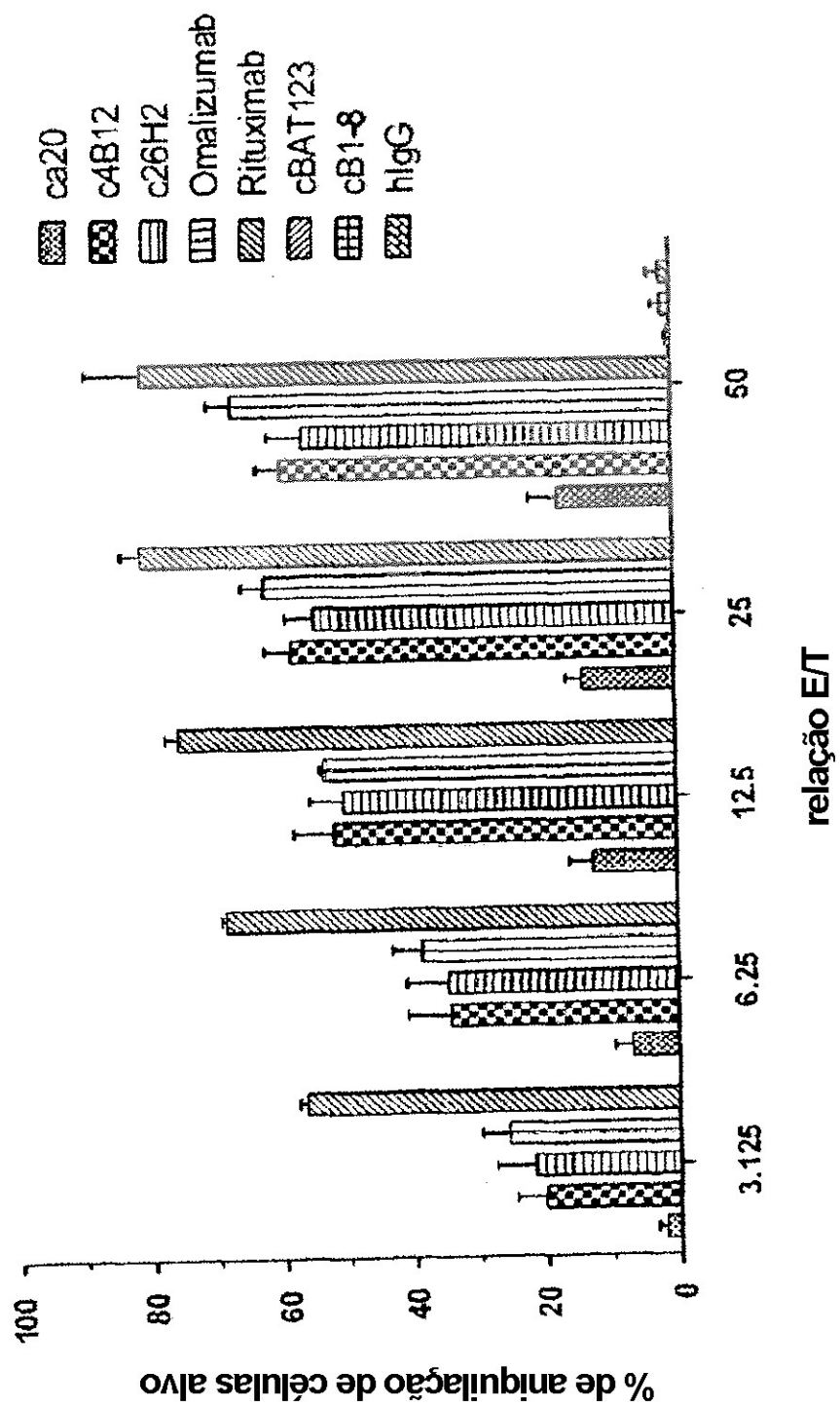


FIG. 3B

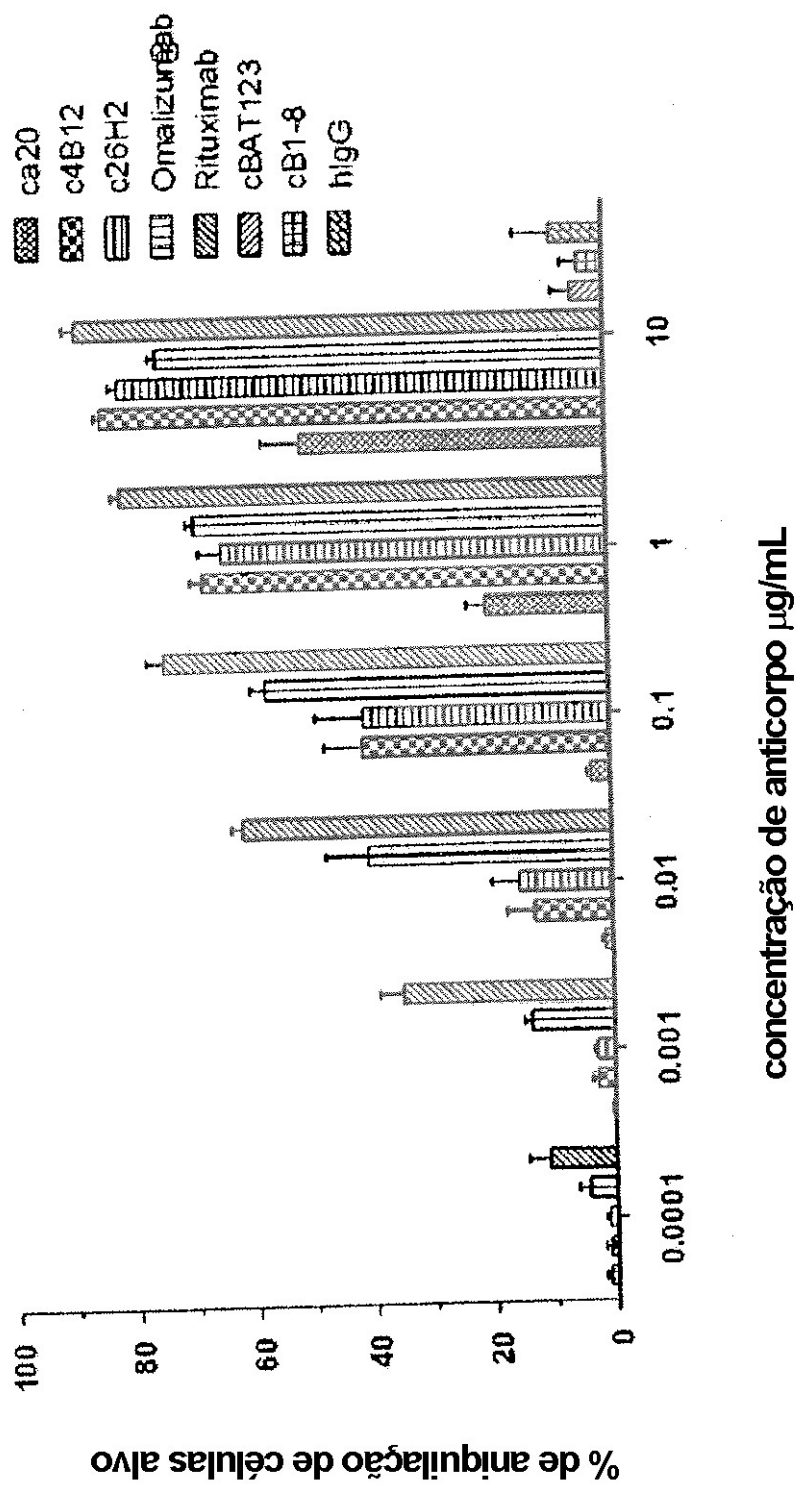


FIG. 4A

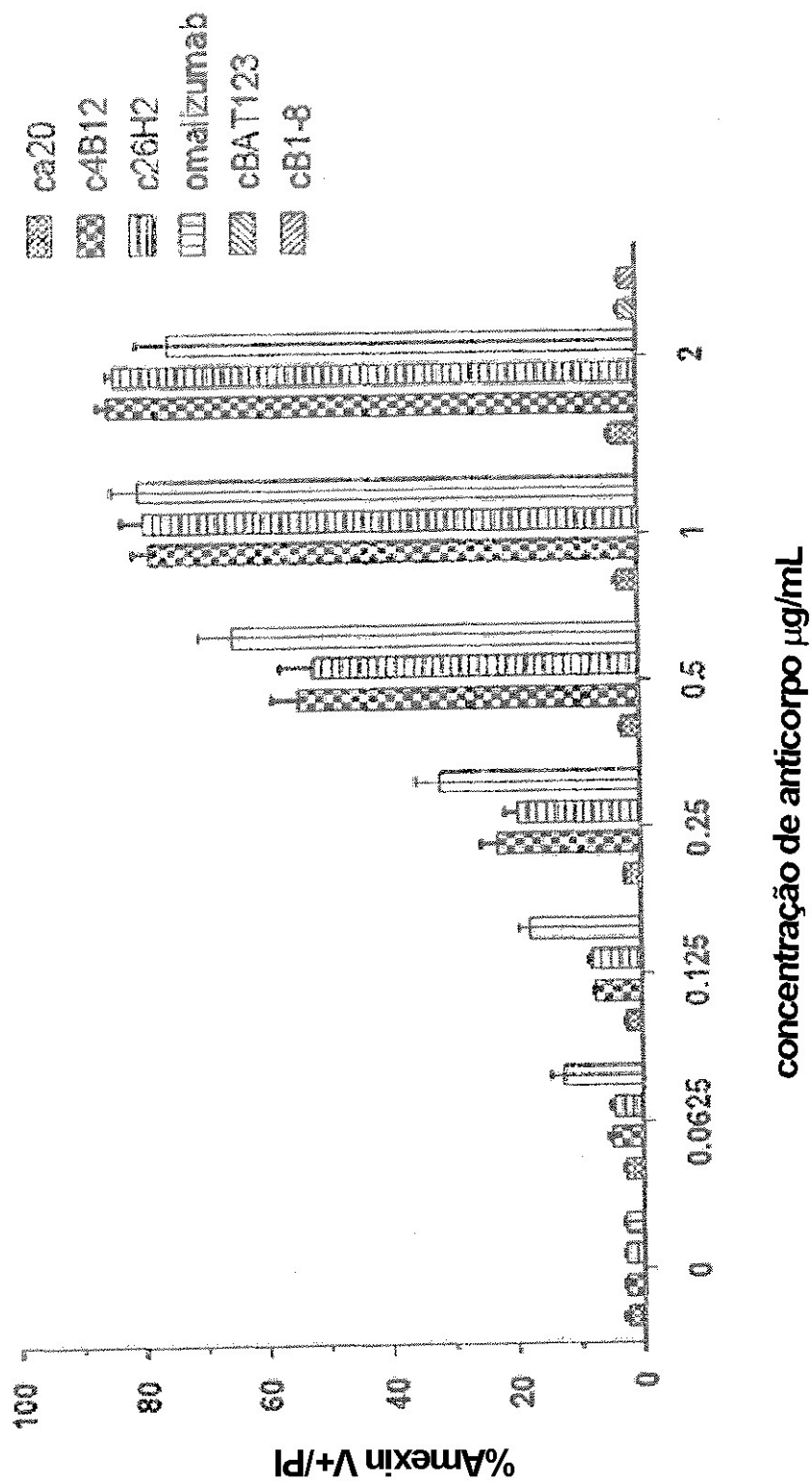


FIG. 4B

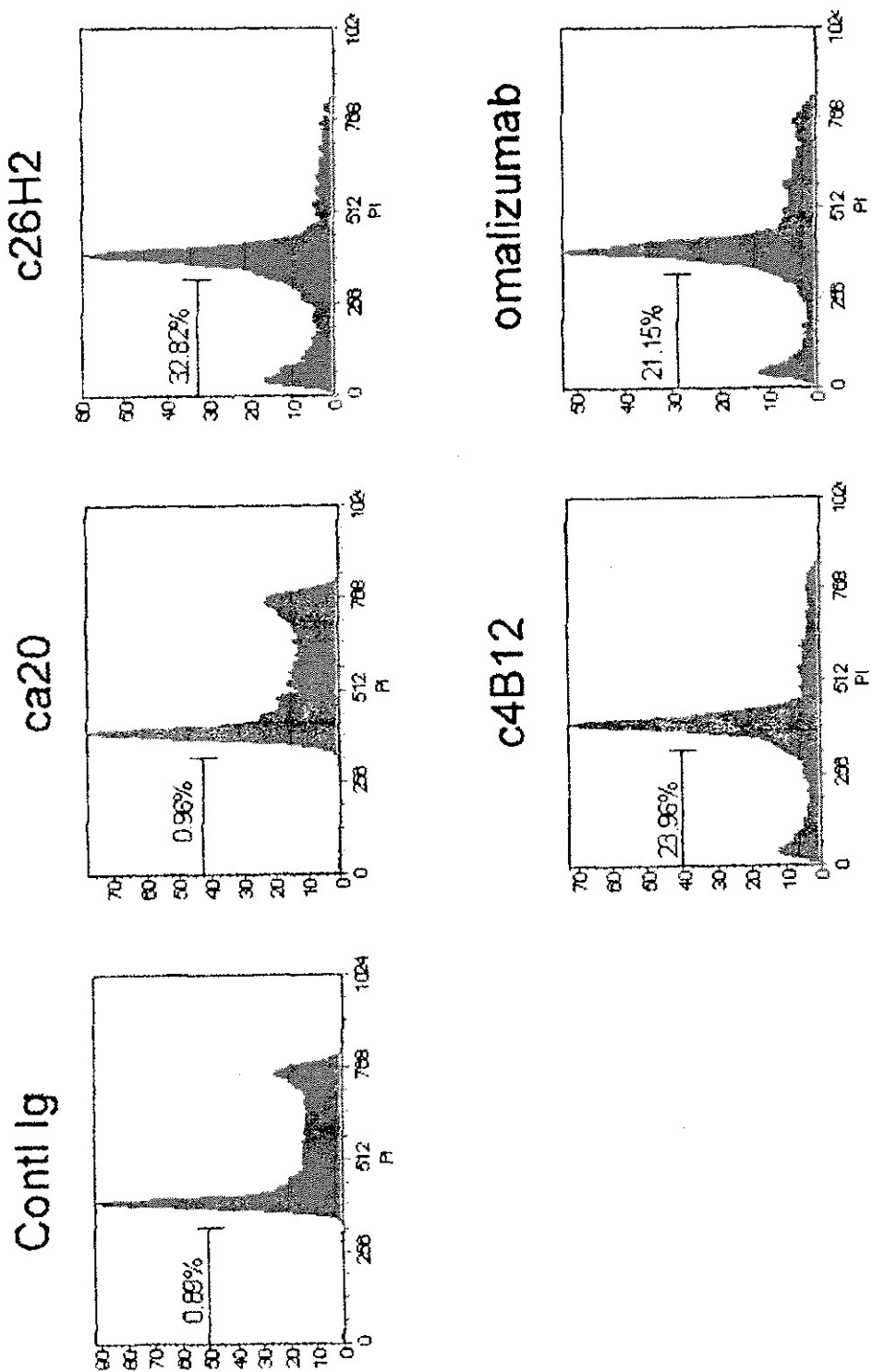
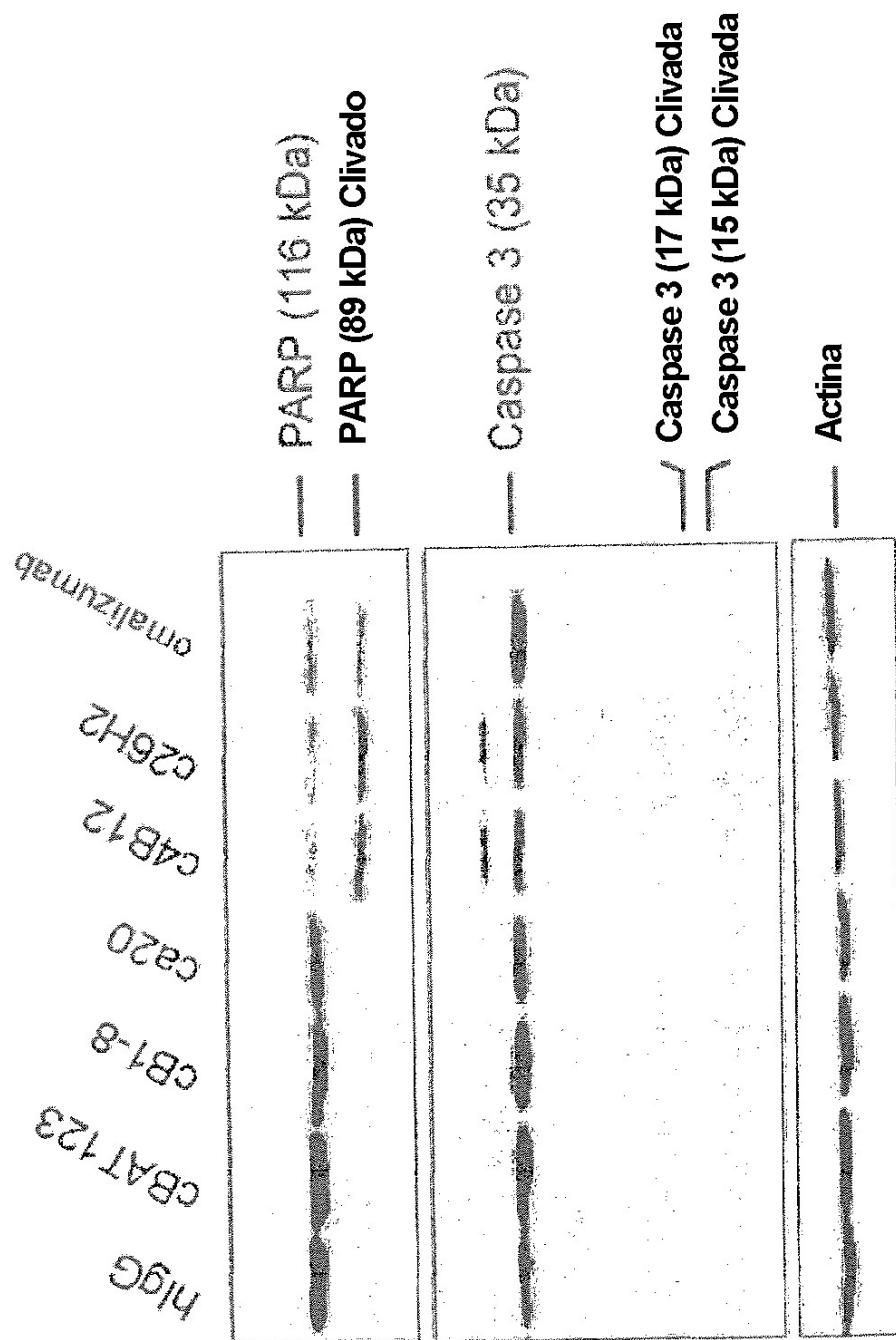




FIG. 4C



**Cadeia leve**

```

1      10      20      abcde 30      40      50      60
4B12  DVLMTOTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIYHSNGNTYLEWYLQKPGGSPKLLIYKYSNRRFSGVPO
k12   DIVMTQTPLSLSYTPGGPASISCRSSQSLIFSGKTYLYWYLQKPGGSPGILLIYEVSRRFSGVPO
Replace IV      S TP QP      Q

70      80      90      100
4B12  RFSGGSGGTDFTFKISRVEAEDLGYYQFQGGSHVPTFGGGKLEIKR
k12   RFSGGSGGTDFTFKISRVEAEDVYYQMGGLQLPTFGGGKVEIKR
Replace L      V      V

```

**Cadeia pesada**

```

1      10      20      30      a 40      50      60
4B12  DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIROFFGNKLEWMGSLISYSGITGYNPSLKS
HV4   QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSTSSGYWGWIRQPPGKGLEWIGSLYHSGSTYYNPSLKS
Replace Q      ET      S      P KG I

70      80 abc 90      100      110
4B12  RLSVTRDTSKNOFFLQLNSVTIEDTATYYCAHMGYDGLAY#GHGIVTVSA
HV4   RVTISVDTSKNGFSLKLSSVTAADTAVYYCAR-----YWGGLTVTVSS
Replace VTISV      S K S AA V      Q L S

```

**FIG. 5**