



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

(11) PI 0821375-5 B1



(22) Data do Depósito: 16/12/2008

(45) Data de Concessão: 04/02/2020

(54) Título: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS, BIVALENTES, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DESTES E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DOS MESMOS

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

(30) Prioridade Unionista: 21/12/2007 EP 07 024867.9.

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

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

(86) Pedido PCT: PCT EP2008010702 de 16/12/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/080251 de 02/07/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/06/2010

(57) Resumo: ANTICORPOS BIESPECÍFICOS, BIVALENTES, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DESTES E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DOS MESMOS A presente invenção refere-se a novos anticorpos biespecíficos, bivalentes, de domínio trocado, à sua preparação e à sua aplicação.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"ANTICORPOS BIESPECÍFICOS, BIVALENTES, PROCESSO PARA
A PREPARAÇÃO DESTES E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DOS
MESMOS".**

[0001] A presente invenção refere-se a novos anticorpos biespecíficos, bivalentes, à sua preparação e à sua aplicação.

Antecedentes da Invenção

[0002] Proteínas engenheiradas, tais como anticorpos bi- ou multiespecíficos, capazes de se ligarem a dois ou mais antígenos são conhecidos na técnica. Tais proteínas de ligação multiespecífica podem ser geradas usando-se fusão celular, conjugação química ou técnicas de DNA recombinante.

[0003] Uma ampla variedade de formatos de anticorpos biespecíficos recombinantes foi desenvolvida em um passado recente, por exemplo, anticorpos biespecíficos tetravalentes por fusão de, por exemplo, um formato de anticorpo de IgG e domínios de cadeia única (ver, por exemplo, Coloma, M.J., et al., Nature Biotech 15 (1997) 159-163; WO 2001/077342; e Morrison, S.L. , Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234).

[0004] Também vários outros formatos novos, nos quais a estrutura de núcleo de anticorpo (IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM) não mais é retida, tais como dia-, tria- ou tetracorpos, minicorpos, vários formatos de cadeia única (scFv, Bis-scFv), que são capazes de se ligarem a dois ou mais antígenos, foram desenvolvidos (Holliger, P., et al., Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136 2005; Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J., et al., Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C., et al., Nature Biotech 25 (2007) 1290-1297).

[0005] Todos tais formatos usam ligantes ou para fundirem o núcleo do anticorpo (IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM) a uma proteína de ligação adicional (por exemplo, scFv) ou para fundirem, por exemplo, dois fra-

gmentos Fab ou scFv. (Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14). Embora seja óbvio que ligantes tenham vantagens para a engenharia de anticorpos biespecíficos, eles também podem causar problemas em arranjos terapêuticos. De fato, esses peptídeos exógenos poderiam desencadear uma resposta imune contra o próprio ligante ou a junção entre a proteína e o ligante. Além disso, a natureza flexível desses peptídeos os torna mais propensos à clivagem proteolítica, potencialmente conduzindo a pobre estabilidade de anticorpo, agregação e imunogenicidade aumentada. Em adição, pode-se desejar reter funções de efetor, tais como, por exemplo, citotoxicidade dependente de complemento (CDC) ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), que são mediadas através da Fcparte, por manutenção de um elevado grau de similaridade aos anticorpos que ocorrem naturalmente.

[0006] Portanto, idealmente, deve-se almejar o desenvolvimento de anticorpos biespecíficos, que sejam muito similares em estrutura geral aos anticorpos que ocorrem naturalmente (como IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM), com desvio mínimo das sequências humanas.

[0007] Em uma abordagem, anticorpos biespecíficos, que são muito similares aos anticorpos naturais, foram produzidos usando a tecnologia de quadroma (ver Milstein, C., e Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-40), baseada na fusão somática de duas linhagens de células de hibridoma diferentes, que expressam anticorpos monoclonais murinos, com as especificidades desejadas do anticorpo biespecífico. Por causa do pareamento aleatório de duas cadeias de anticorpo pesada e leve diferentes, dentro da linhagem de células de hibridoma híbrido (ou quadroma) resultante, até dez espécies de anticorpos diferentes são geradas, das quais somente uma é o anticorpo biespecífico funcional desejado. Devido à presença de subprodutos de pareados maneira errada e a rendimentos de produção significativamente reduzidos, signi-

fica que são necessários procedimentos de purificação sofisticados (ver, por exemplo, Morrison, S.L., *Nature Biotech* 25 (2007) 1233-1234). Em geral, o mesmo problema de subprodutos pareados de maneira errada permanece se forem usadas técnicas de expressão recombinantes.

[0008] Uma abordagem para contornar o problema de subprodutos pareados de maneira errada, que é conhecido como "botões em cavidades" (knobs-into-holes), pretende forçar o pareamento de duas cadeias pesadas de anticorpo diferentes, por introdução de mutações nos domínios de CH3, para modificar a interface de contato. Em uma cadeia, aminoácidos volumosos foram substituídos por aminoácidos com cadeias laterais curtas, para criar uma "cavidade". Inversamente, aminoácidos com cadeias laterais grandes foram introduzidos no outro domínio de CH3, para criar um "botão". Por coexpressão dessas duas cadeias pesadas (e duas cadeias leves idênticas, que têm que ser apropriadas para ambas as cadeias pesadas), elevados rendimentos de formação de heterodímero ("botão-cavidade") versus formação de homodímero ("cavidade-cavidade" ou "botão-botão") foram observados (Ridgway, J.B., Presta, L.G., Carter, P. e WO 96/027011). A percentagem de heterodímero poderia ser adicionalmente aumentada por remodelação das superfícies de interação dos dois domínios de CH3, usando uma abordagem de exibição de fago e a introdução de uma ponte de dissulfeto para estabilizar os heterodímeros (Merchant, A.M, et al., *Nature Biotech* 16 (1998) 677-681; Atwell, S., Ridgway, J.B., Wells, J.A., Carter, P., J., *Mol Biol* 270 (1997) 26-35). Novas abordagens para a tecnologia de botões em cavidades são descritas, por exemplo, no documento de número EP 1870459A1. Embora esse formato pareça muito atraente, nenhum dado descrevendo a progressão em direção à clínica está atualmente disponível. Uma restrição importante dessa estratégia é que as cadeias leves dos dois anticorpos pa-

rentais têm que ser idênticas para evitar o pareamento errado e a formação de moléculas inativas. Portanto, essa técnica não é apropriada para se desenvolver facilmente anticorpos biespecíficos, bivalentes, recombinantes, contra dois antígenos, partindo-se de dois anticorpos contra o primeiro e o segundo antígenos, ou conforme as cadeias pesadas destes anticorpos e/ou as cadeias leves idênticas têm que ser otimizadas.

[0009] O documento de número 2006/093794 se refere a composições de ligação à proteína heterodimérica. O documento de número WO 99/37791 descreve derivados de anticorpos multipropósito. Morrison et al., no J. Immunolog, 160(1998) 2802-2808, se refere à influência de troca de domínio de região variável sobre as propriedades funcionais de IgG.

Sumário da Invenção

[00010] A invenção se refere a um anticorpo biespecífico, bivalente, compreendendo:

- a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno; e
 - b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,
- em que os domínios variáveis de VL e de VH são substituídos um pelo outro,
- e
- em que os domínios constantes de CL e de CH1 são substituídos um pelo outro.

[00011] Uma concretização adicional da invenção é um processo para a preparação de um anticorpo biespecífico, bivalente, de acordo com a invenção, compreendendo as etapas de:

- a) transformação de uma célula hospedeira com
- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que

codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno, e

- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,

em que os domínios variáveis de VL e de VH são substituídos um pelo outro,

e

em que os domínios constantes de CL e de CH1 são substituídos um pelo outro;

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

- c) recuperação da molécula de anticorpo da cultura.

[00012] Uma outra concretização da invenção é uma célula hospedeira compreendendo:

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

- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,

em que os domínios variáveis de VL e de VH são substituídos um pelo outro,

e

em que os domínios constantes de CL e de CH1 são substituídos um pelo outro.

[00013] Uma outra concretização da invenção é uma composição, de preferência, uma composição farmacêutica ou uma composição diagnóstica, do anticorpo de acordo com a invenção.

[00014] Uma outra concretização da invenção é uma composição

farmacêutica compreendendo um anticorpo de acordo com a invenção e pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[00015] Uma outra concretização da invenção é um método para o tratamento de um paciente que necessite de terapia, caracterizado por administração, ao paciente, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo de acordo com a invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

[00016] A invenção de refere a um anticorpo biespecífico, bivalente, compreendendo:

- a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno; e
 - b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,
- em que os domínios variáveis de VL e de VH são substituídos um pelo outro,
- e
- em que os domínios constantes de CL e de CH1 são substituídos um pelo outro.

[00017] Portanto, o anticorpo biespecífico, bivalente, compreende:

- a) uma primeira cadeia leve e uma primeira cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno; e
 - b) uma segunda cadeia leve e uma segunda cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,
- em que os domínios variáveis de VL e de VH da segunda cadeia leve e da segunda cadeia pesada são substituídos um pelo outro,
- e
- em que os domínios constantes de CL e de CH1 da segunda cadeia leve e da segunda cadeia pesada são substituídos um pelo outro.

[00018] Portanto, para o anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno aplica-se o seguinte:

dentro da cadeia leve

o domínio de cadeia leve variável VL é substituído pelo domínio de cadeia pesada variável VH do anticorpo, e o domínio de cadeia leve constante CL é substituído pelo domínio de cadeia pesada constante CH1 do anticorpo;

e dentro da cadeia pesada

o domínio de cadeia pesada variável VH é substituído pelo domínio de cadeia leve variável VL do anticorpo, e o domínio de cadeia pesada constante CH1 é substituído pelo domínio de cadeia leve constante CL do anticorpo.

[00019] O termo "anticorpo", conforme usado aqui, se refere a anticorpos monoclonais completos. Tais anticorpos completos consistem em dois pares de uma "cadeia leve" (LC) e uma "cadeia pesada" (HC) (tais pares de cadeia leve (LC)/cadeia pesada são abreviados aqui como LC/CH). As cadeias leves e as cadeias pesadas de tais anticorpos são polipeptídeos consistindo em vários domínios. Em um anticorpo completo, cada cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada (aqui abreviada como HCVR ou VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada compreende os domínios constantes de cadeia pesada CH1, CH2 e CH3 (classes de anticorpos IgA, IgD, e IgG) e, opcionalmente, o domínio constante de cadeia pesada CH4 (classes de anticorpos IgE e IgM). Cada cadeia leve compreende um domínio variável de cadeia leve VL e um domínio constante de cadeia leve CL. A estrutura de um anticorpo completo que ocorre naturalmente, o anticorpo IgG, é mostrado, por exemplo, na Figura 1. Os domínios variáveis de VH e de VL podem ser adicionalmente subdivididos em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões que determinam complementariedade

(CDR), inter espaçadas com regiões que estão mais conservadas, denominadas regiões de grade de leitura (FR). Cada VH e VL é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas a partir do terminal de amino para o terminal de carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (Janeway, C.A., Jr. et al. (2001). Immunobiology, 5ª ed., Garland Publishing; e Woof, J., Burton, D., Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99). Os dois pares de cadeia pesada e de cadeia leve (HC/LC) são capazes de se ligar de maneira específica ao mesmo antígeno. Portanto, o anticorpo completo é um anticorpo monoespecífico, bivalente. Tais "anticorpos" incluem, por exemplo, anticorpos de camundongos, anticorpos humanos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e anticorpos engenheirados geneticamente (anticorpos variantes ou mutantes), tanto quanto suas propriedades características sejam retidas. São especialmente preferidos anticorpos humanos ou humanizados, especialmente como anticorpos humanos ou humanizados recombinantes.

[00020] Existem cinco tipos de cadeias pesadas de anticorpos de mamíferos denotadas por letras gregas: α , δ , ϵ , γ e μ (Janeway, C.A., Jr., et al., Immunobiology, 5ª ed., Garland Publishing (2001)). O tipo de cadeia pesada presente define a classe de anticorpo; essas cadeias são encontradas em anticorpos de IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, respectivamente (Rhoades, R.A., Pflanzner RG (2002). Human Physiology, 4ª ed., Thomson Learning). Cadeias pesadas distintas diferem em tamanho e em composição; α e γ contêm aproximadamente 450 aminoácidos, enquanto que μ e ϵ têm aproximadamente 550 aminoácidos.

[00021] Cada cadeia pesada tem duas regiões, a região constante e a região variável. A região constante é idêntica em todos os anticorpos do mesmo isotipo, mas difere em anticorpos de isotipo diferente. Cadeias pesadas γ , α e δ têm uma região constante composta por três domínios constantes de CH1, CH2 e CH3 (em uma linha), e uma regi-

ção de dobradiça para flexibilidade adicionada (Woof, J., Burton, D., Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99); cadeias pesadas μ e ϵ têm uma região constante composta por quatro domínios constantes de CH1, CH2, CH3 e CH4 (Janeway, C.A., Jr., et al., Immunobiology, 5ª ed., Garland Publishing (2001)). A região variável da cadeia pesada difere em anticorpos produzidos por diferentes células B, mas é a mesma para todos os anticorpos produzidos por uma única célula B ou clone de célula B. A região variável de cada cadeia pesada tem aproximadamente 110 aminoácidos de comprimento e é composta por um único domínio de anticorpo.

[00022] Em mamíferos, há somente dois tipos de cadeias leves, que são chamados lambda (λ) e kappa (κ). Uma cadeia leve tem dois domínios sucessivos: um domínio constante CL e um domínio variável VL. O comprimento aproximado de uma cadeia leve é de 211 a 217 aminoácidos. De preferência, a cadeia leve é uma cadeia leve kappa (κ), e o domínio constante CL é, de preferência, C kappa (κ).

[00023] Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal", conforme usados aqui, se referem a uma preparação de moléculas de anticorpos de uma única composição de aminoácidos.

[00024] Os "anticorpos" de acordo com a invenção podem ser de qualquer classe (por exemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, de preferência IgG ou IgE), ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, de preferência IgG1), por meio do quê ambos os anticorpos, a partir dos quais o anticorpo biespecífico bivalente de acordo com a invenção é derivado, têm uma parte Fc da mesma subclasse (por exemplo, IgG1, IgG4 e os similares, de preferência IgG1), de preferência do mesmo alotipo (por exemplo, caucasiano).

[00025] Uma "parte de Fc de um anticorpo" é um termo bem-conhecido pelo versado na técnica e definido com base em clivagem

com papaína de anticorpos. Os anticorpos de acordo com a invenção contêm, como parte Fc, de preferência, uma parte Fc derivada de origem humana e, de preferência, todas as outras partes das regiões constantes humanas. A parte Fc de um anticorpo está diretamente envolvida em ativação de complemento, ligação a C1q, ativação de C3 e ligação a receptor de Fc. Embora a influência de um anticorpo no sistema de complemento seja dependente de certas condições, a ligação a C1q é provocada por sítios de ligação definidos, na parte Fc. Tais sítios de ligação são conhecidos no estado da técnica e descritos, por exemplo, por Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., e Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; e EP 0307 434. Tais sítios de ligação são, por exemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 e P329 (numeração de acordo com o índice de Kabat da UE, ver abaixo). Anticorpos das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 usualmente mostram ativação de complemento, ligação a C1q e ativação de C3, enquanto que IgG4 não ativam o sistema de complemento, não se ligam a C1q e não ativam C3. De preferência, a parte Fc é uma parte de Fc humana.

[00026] O termo "anticorpo quimérico" se refere a um anticorpo compreendendo uma região variável, isto é, região de ligação, a partir de uma fonte ou espécie e pelo menos uma porção de uma região constante derivada de uma fonte ou espécie diferente, usualmente preparada por técnicas de DNA recombinante. Anticorpos quiméricos compreendendo uma região variável murina e uma região constante humana são preferidos. Outras formas preferidas de "anticorpos quiméricos", abrangidas pela presente invenção, são aquelas, nas quais a

região constante tenha sido modificada ou trocada a partir daquela do anticorpo original para gerar as propriedades de acordo com a invenção, especialmente com respeito à ligação a C1q e/ou à ligação a receptor de Fc (FcR). Também se refere a tais anticorpos quiméricos como "anticorpos de classe comutada". Anticorpos quiméricos são o produto de genes de imunoglobulina expressos compreendendo segmentos de DNA, que codificam regiões variáveis de imunoglobulina e segmentos de DNA, que codificam regiões constantes de imunoglobulina. Processos para produção de anticorpos quiméricos envolvem técnicas convencionais de DNA recombinante e de transfecção de genes, são bem-conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5.202.238 e US 5.204.244.

[00027] O termo "anticorpo humanizado" se refere a anticorpos, nos quais o quadro de leitura ou "regiões que determinam complementariedade" (CDR) tenham sido modificadas para compreender a CDR de uma imunoglobulina de diferente especificidade, quando comparada àquela da imunoglobulina parental. Em uma concretização preferida, uma CDR murina é enxertada na região de grade de leitura de um anticorpo humano, para preparar o "anticorpo humanizado". Ver, por exemplo, Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; e Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. CDRs particularmente preferidas correspondem àquelas que representam sequências que reconheçam os antígenos observados acima para anticorpos quiméricos. Outras formas de "anticorpos humanizados" englobadas pela presente invenção são aquelas, nas quais a região constante tenha sido adicionalmente modificada ou trocada a partir daquela do anticorpo original, para gerar as propriedades de acordo com a invenção, especialmente com respeito à ligação a C1q e/ou ligação ao receptor de Fc (FcR).

[00028] O termo "anticorpo humano", conforme usado aqui, pretende incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes, derivadas a partir de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Anticorpos humanos são bem-conhecidos no estado da técnica (van Dijk, M.A., e van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Anticorpos humanos também podem ser produzidos em animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que sejam capazes, quando da imunização, de produzir um repertório completo ou uma seleção de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. A transferência do arranjo de genes de imunoglobulina de linhagem germinativa humana em tais camundongos mutantes de linhagem germinativa resultará na produção de anticorpos humanos quando da inoculação com antígeno (ver, por exemplo, Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40). Anticorpos humanos também podem ser produzidos em bibliotecas de exibição de fago (Hoo-genboom, H.R., e Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). As técnicas de Cole, S.P.C., et al., e Boerner, et al. também estão disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole, S.P.C., et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., New York (1986), páginas 77-96; e Boerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Conforme já mencionado para anticorpos quiméricos e humanizados de acordo com a invenção, o termo "anticorpo humano", conforme usado aqui, também compreende tais anticorpos, que estejam modificados na região constante, para gerar as propriedades de acordo com a invenção, especialmente com respeito à ligação a C1q e/ou ligação a FcR, por exemplo, por "comutação de classe", isto é mudança ou troca de partes de Fc (por exemplo, de IgG1 para IgG4 e/ou mutação

IgG1/IgG4).

[00029] O termo "anticorpo humano recombinante", conforme usado aqui, pretende incluir todos os anticorpos humanos que sejam preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como anticorpos isolados a partir de uma célula hospedeira, tal como célula de NS0 ou de CHO ou a partir de um animal (por exemplo, camundongo) que seja transgênico para genes de imunoglobulina humanos ou anticorpos expressos usando um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis e constantes em uma forma rearranjada. Os anticorpos humanos recombinantes de acordo com a invenção foram submetidos a hipermutação somática in vivo. Portanto, as sequências de aminoácidos das regiões de VH e de VL dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas de e relacionadas a sequências de VH e de VL de linhagem germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório de linhagem germinativa de anticorpo humano in vivo.

[00030] O "domínio variável" (domínio variável de uma cadeia leve (VL), região variável de uma cadeia pesada (VH)), conforme usado aqui, denota cada uma do par de cadeias leve e pesada, que está envolvido diretamente na ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios de cadeias leve e pesada humanas variáveis têm a mesma estrutura geral e cada domínio compreende quatro regiões de grade de leitura (FR), cujas sequências estão amplamente conservadas, conectadas por três "regiões hipervariáveis" (ou regiões que determinem a complementariedade, CDRs). As regiões de grade de leitura adotam uma conformação de folha β e as CDRs podem formar laços conectando a estrutura de folha β . As regiões de CDRs em cada cadeia são mantidas em sua estrutura tridimensional pelas regiões de grade de leitura e formam, em conjunto com as CDRs a partir da outra cadeia, o sítio de

ligação ao antígeno. As regiões de CDR3 de cadeia leve e pesada de anticorpo desempenham um papel particularmente importante na especificidade/afinidade de ligação dos anticorpos de acordo com a invenção e, portanto, fornecem um objeto adicional da invenção.

[00031] Os termos "região hipervariável" ou "porção de ligação a antígeno de um anticorpo", quando usados aqui, se referem aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo, que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos a partir das "regiões que determinam a complementariedade" ou "CDRs". Regiões de "grade de leitura" ou "FR" são aquelas regiões de domínio variáveis diferentes daquelas dos resíduos de região hipervariável, conforme definido aqui. Portanto, as cadeias leve e pesada de um anticorpo compreendem, desde o terminal N até o terminal C, os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. CDRs em cada cadeia estão separadas por tais aminoácidos de grade de leitura. Especialmente, CDR3 da cadeia pesada é a região que contribui muitíssimo para a ligação ao antígeno. Regiões de CDR e de FR são determinadas de acordo com a definição padrão de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

[00032] Os "domínios constantes" da cadeia pesada e da cadeia leve não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções de efector. Dependendo da sequência de aminoácidos da região constante de suas cadeias pesadas, anticorpos ou imunoglobulinas são divididos nas classes:

[00033] O termo "anticorpo biespecífico, bivalente", conforme usado aqui, se refere a um anticorpo conforme descrito acima, na qual cada um dos dois pares de cadeia pesada e de cadeia leve (HC/LC) se liga de maneira específica a um antígeno diferente, isto é, a primeira cadeia pesada e a primeira cadeia leve (que se origina a partir de um an-

ticorpo contra um primeiro antígeno) se ligam de maneira específica a um primeiro antígeno, e, a segunda cadeia pesada e a segunda cadeia leve (que se origina a partir de um anticorpo contra um segundo antígeno) se ligam de maneira específica em conjunto com um segundo antígeno (conforme retratado na Figura 2); tais como anticorpos biespecíficos, bivalentes, são capazes de se ligar de maneira específica a dois antígenos diferentes ao mesmo tempo, e não a mais do que dois antígenos, ao contrário de, por um lado, um anticorpo monoespecífico capaz de se ligar somente a um antígeno, e, por outro lado, por exemplo, um anticorpo tetraespecífico, tetravalente, que pode se ligar a quatro moléculas de antígeno ao mesmo tempo.

[00034] De acordo com a invenção, a razão de um anticorpo biespecífico, bivalente, desejado, comparado aos subprodutos indesejados pode ser aperfeiçoada pela substituição de certos domínios em somente um par de cadeia leve e de cadeia pesada (HC/LC). Embora o primeiro dos dois pares HC/LC se origine a partir de um anticorpo que se ligue de maneira específica a um primeiro antígeno e seja deixado essencialmente inalterado, o segundo dos dois pares HC/LC se origina a partir de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno, e é alterado pela seguinte substituição:

- cadeia leve: substituição do domínio de cadeia leve variável VL pelo domínio de cadeia pesada variável VH do anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno, e o domínio de cadeia leve constante CL pelo domínio de cadeia constante CH1 do anticorpo que se liga de maneira constante a um segundo antígeno, e
- cadeia pesada: substituição do domínio de cadeia pesada variável VH pelo domínio de cadeia leve variável VL do anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno, e o domínio de cadeia pesada constante CH1 pelo domínio de cadeia leve constante CL do anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,

geno.

[00035] Portanto, os anticorpos biespecíficos, bivalentes, resultantes são anticorpos artificiais, que compreendem:

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

b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,

sendo que a cadeia leve (de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno) contém um domínio variável VH ao invés de VL e

um domínio constante CH1 ao invés de CL,

sendo que a cadeia pesada (de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno) contém um domínio variável VL ao invés de VH, e

um domínio constante CL ao invés de CH1.

[00036] Em um aspecto adicional da invenção, tal razão aperfeiçoada de um anticorpo biespecífico, bivalente, desejado, comparado aos subprodutos indesejados pode ser aperfeiçoada ulteriormente por uma das seguintes duas alternativas:

A) Primeira alternativa (ver Figura 3):

[00037] Os domínios CH3 do anticorpo biespecífico, bivalente, de acordo com a invenção podem ser alterados pela tecnologia de "botão em cavidades", que é descrita em detalhes com vários exemplos, por exemplo, no documento de número WO 96/027011, Ridgway J.B., et al., Protein Eng 9 (1996) 617–621; e Merchant, A.M., et al., Nat Biotechnol 16 (1998) 677–681. Nesse método, as superfícies de interação dos dois domínios CH3 são alterados para aumentar a heterodimerização de ambas as cadeias pesadas contendo estes dois domínios de CH3. Cada um dos dois domínios de CH3 (das duas cadeias pesadas) pode ser o "botão", enquanto que o outro é a "cavidade". A introdução

de uma ponte de dissulfeto estabiliza os heterodímeros (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al. J. Mol. Biol. 270 (1997) 26–35) e aumenta o rendimento.

[00038] Portanto, em concretização preferida, os domínios CH3 de um anticorpo biespecífico, bivalente, em que cada um do primeiro domínio de CH3 e do segundo domínio de CH3 se encontram em uma interface, que compreende uma interface original entre os domínios de CH3 de anticorpo, são alterados pela tecnologia de "botão em cavidades", incluindo estabilização adicional por introdução de uma ponte de dissulfeto nos domínios de CH3 (descrito no documento de número WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng 9 (1996) 617-621; Merchant, A.M., et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; e Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26–35), para promover a formação do anticorpo biespecífico, bivalente.

[00039] Portanto, em um aspecto da invenção, o anticorpo biespecífico, bivalente, é caracterizado pelo fato de que:

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

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

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

um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido tendo um maior volume de cadeia lateral, por meio disto gerando uma

protuberância dentro da interface do domínio de CH3 de uma cadeia pesada, que seja posicionável em uma cavidade dentro da interface do domínio de CH3 da outra cadeia pesada,

e

b) o domínio de CH3 da outra cadeia pesada é alterado, de modo que, dentro da interface original do segundo domínio de CH3, que se encontra com a interface original do primeiro domínio de CH3, dentro do anticorpo, biespecífico, bivalente, um resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo um menor volume de cadeia lateral, por meio disto gerando uma cavidade dentro da interface do segundo domínio de CH3, dentro do qual é posicionável uma protuberância dentro da interface do primeiro domínio de CH3.

[00040] De preferência, o resíduo de aminoácido tendo um maior volume de cadeia lateral é selecionado a partir do grupo consistindo em arginina (R), fenil-alanina (F), tirosina (Y), triptofano (W).

[00041] De preferência, o resíduo de aminoácido tendo um menor volume de cadeia lateral é selecionado a partir do grupo consistindo em alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

[00042] Em um aspecto da invenção, ambos os domínios de CH3 são adicionalmente alterados pela introdução de cisteína (C), como aminoácido, nas posições correspondentes de cada domínio de CH3, tal que uma ponte de dissulfeto entre ambos os domínios de CH3 possa ser formada.

[00043] Em outra concretização preferida da invenção, ambos os domínios de CH3 são alterados pelo uso de resíduos R409D; K370E (K409D), para resíduos de botão, e D399K; E357K, para resíduos de cavidade, descritos, por exemplo, no documento de número EP 1870459A1.

ou

B) Segunda alternativa (ver Figura 4):

[00044] Pela substituição de um domínio de cadeia pesada constante CH3 por um domínio de cadeia pesada constante CH1; e o outro domínio de cadeia pesada constante CH3 é substituído por um domínio de cadeia leve constante CL.

[00045] O domínio de cadeia pesada constante CH1, pelo qual o domínio de cadeia pesada CH3 é substituído, pode ser de qualquer classe de Ig (por exemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM), ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

[00046] O domínio de cadeia leve constante CL, pelo qual o domínio de cadeia pesada CH3 é substituído, pode ser do tipo lambda (λ) ou kappa (κ), de preferência, do tipo kappa (κ).

[00047] Portanto, uma concretização preferida da invenção é um anticorpo biespecífico, bivalente, compreendendo:

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

b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,

sendo que os domínios variáveis VL e VH são substituídos um pelo outro,

e

sendo que os domínios constante CL e CH1 são substituídos um pelo outro,

e sendo que, opcionalmente,

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

sendo que a interface é alterada para promover a formação do anticorpo biespecífico, bivalente, sendo que a alteração é caracterizada pelo fato de que

ca) o domínio CH3 de uma cadeia pesada é alterada, de modo que, dentro da interface original, o domínio CH3 de uma cadeia pesada, que se encontra com a interface original do domínio CH3 da outra cadeia pesada dentro do anticorpo biespecífico, bivalente, um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido tendo maior volume de cadeia lateral, por meio disto gerando uma protuberância dentro da interface do domínio CH3 de uma cadeia pesada, que seja posicionável em uma cavidade dentro da interface do domínio CH3 da outra cadeia pesada

e

cb) o domínio CH3 da outra cadeia pesada é alterada, de modo que, dentro da interface original do segundo domínio CH3 que se encontra com a interface original do primeiro domínio CH3 dentro do anticorpo biespecífico, bivalente, um resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo um menor volume de cadeia lateral, por meio disto gerando uma cavidade dentro da interface do segundo domínio CH3, dentro da qual é posicionável uma protuberância da interface do primeiro domínio CH3;

ou

d) um domínio de cadeia pesada constante CH3 é substituído por um domínio de cadeia pesada constante CH3; e ou outro domínio de cadeia pesada constante CH3 é substituído por um domínio de cadeia leve constante CL.

[00048] Os termos "antígeno" ou "molécula de antígeno", conforme usados aqui, são usados de maneira intercambiável e se referem a todas as moléculas que possam ser ligadas de maneira específica por um anticorpo. O anticorpo biespecífico, bivalente, se liga de maneira específica a um primeiro antígeno e a um segundo antígeno distinto. O termo "antígenos", conforme usado aqui, inclui, por exemplo, proteínas, diferentes epítomos em proteínas (como antígenos diferentes den-

tro do significado da invenção), e polissacarídeos. Isso inclui, principalmente, partes (revestimentos, cápsulas, paredes celulares, flagelos, fímbrias e toxinas) de bactérias, vírus e outros microorganismos. Lipídeos e ácidos nucleicos são antigênicos somente quando combinados com proteínas e polissacarídeos. Antígenos exógenos (não próprios) não microbianos podem incluir pólen, clara de ovo e proteínas a partir de tecidos e órgãos transplantados ou na superfície de células de sangue transfundidas. De preferência, o antígeno é selecionado a partir do grupo consistindo em citocinas, proteínas da superfície celular, enzimas e receptores de citocinas, proteínas da superfície celular, enzimas e receptores.

[00049] Antígenos de tumor são aqueles antígenos que são apresentados por moléculas de MHC I ou de MHC II na superfície de células de tumor. Algumas vezes, esses antígenos podem ser apresentados por células de tumor e nunca por aquelas normais. Nesse caso, eles são chamados de antígenos específicos de tumor (TSAs) e, tipicamente, resultam de uma mutação específica de tumor. Mais comuns são antígenos que são apresentados por células de tumor e células normais, e eles são chamados antígenos associados a tumor (TAAs). Linfócitos T citotóxicos, que reconheceram esses antígenos, podem ser capazes de destruir as células de tumor antes que elas se proliferem ou sofram metástase. Antígenos de tumor também podem estar na superfície do tumor na forma de, por exemplo, um receptor mutado, em cujo caso eles serão reconhecidos por células B.

[00050] Em uma concretização preferida, pelo menos um dos dois diferentes antígenos (primeiro e segundo antígenos), aos quais o anticorpo biespecífico, bivalente, se liga de maneira específica, é um antígeno de tumor.

[00051] Em outra concretização preferida, ambos os dois diferentes antígenos (primeiro e segundo antígenos), aos quais o anticorpo bies-

pecífico, bivalente, se liga de maneira específica, são antígenos de tumor; nesse caso, o primeiro e o segundo antígenos também podem ser dois epítomos diferentes na mesma proteína de tumor.

[00052] Em outra concretização preferida, um dos dois antígenos diferentes (primeiro e segundo antígenos), aos quais o anticorpo biespecífico, bivalente, se liga de maneira específica, é um antígeno de tumor e o outro é um antígeno de célula de efector, como, por exemplo, um receptor de célula T, CD3, CD16 e os similares.

[00053] Em outra concretização preferida, um dos dois antígenos diferentes (primeiro e segundo antígenos), aos quais o anticorpo biespecífico, bivalente, se liga de maneira específica, é um antígeno de tumor e o outro é uma substância anti-câncer, tal como uma toxina ou um inibidor de quinase.

[00054] Conforme usado aqui, "ligação de maneira específica" ou "se liga de maneira específica a" se referem a um anticorpo que se liga de maneira específica a um antígeno. De preferência, a afinidade de ligação do anticorpo que se liga de maneira específica a este antígeno é de valor de KD de 10^{-9} mol/L ou inferior (por exemplo, 10^{-10} mol/L), de preferência, com um valor de KD de 10^{-10} mol/L ou inferior (por exemplo, 10^{-12} mol/L). A afinidade de ligação é determinada com um ensaio de ligação padrão, tal como técnica de ressonância de plásmom de superfície (Biacore®).

[00055] O termo "epítomo" inclui qualquer determinante de polipeptídeo capaz de se ligar de maneira específica a um anticorpo. Em certas concretizações, determinante de epítomo inclui grupamentos de moléculas de superfície quimicamente ativos, tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, fosforila ou sulfonila, e, em certas concretizações, podem ter características estruturais tridimensionais específicas, e/ou características de carga específicas. Um epítomo é uma região de um antígeno que está ligado por um anticorpo. Em certas con-

cretizações, um anticorpo é dito se ligar de maneira específica a um antígeno, quando ele reconhecer preferencialmente seu antígeno alvo em uma mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas.

[00056] Uma concretização adicional da invenção é um processo para a preparação de um anticorpo biespecífico, bivalente, de acordo com a invenção, compreendendo:

- a) transformação de uma célula hospedeira com:
 - vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico, que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno, e
 - vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico, que codifica a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,sendo que os domínios variáveis VL e VH são substituídos um pelo outro,
e
sendo que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos um pelo outro;
- b) cultivo da célula hospedeira sob condições que permitam a síntese da molécula de anticorpo; e
- c) recuperação da molécula de anticorpo a partir da cultura.

[00057] Em geral, há dois vetores que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada do anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno, e adicionalmente dois vetores que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada do anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno. Um dos dois vetores codifica a respectiva cadeia leve e o outro dos dois vetores codifica a respectiva cadeia pesada. Entretanto, em um processo alternativo para a preparação de um anticorpo biespecífico, bivalente, de acordo com a invenção, somente um primeiro vetor que codifica a cadeia leve e a cadeia pesada

do anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno e somente um segundo vetor que codifica a cadeia leve e a cadeia pesada do anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno pode ser usado para transformação da célula hospedeira.

[00058] A invenção engloba um processo para a preparação dos anticorpos compreendendo o cultivo das células hospedeiras correspondentes sob condições que permitam a síntese das moléculas de anticorpo e a recuperação dos anticorpos a partir da cultura, por exemplo, por expressão de:

- uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica a cadeia leve de um anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno;
- uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica a cadeia pesada do anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno;
- uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica a cadeia leve de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno, sendo que o domínio de cadeia leve variável VL é substituído pelo domínio de cadeia pesada variável VH, e sendo que o domínio de cadeia leve constante CL é substituído pelo domínio de cadeia pesada constante CH1; e
- uma quarta sequência de ácidos nucleicos que codifica a cadeia pesada do anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno, sendo que o domínio de cadeia pesada variável VH é substituído por um domínio de cadeia leve variável VL, e sendo que o domínio de cadeia pesada constante CH1 é substituído pelo domínio de cadeia leve constante CL.

[00059] Uma concretização adicional da invenção é uma célula hospedeira compreendendo:

- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que

codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno, e

- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,

sendo que os domínios variáveis VL e VH são substituídos um pelo outro,

e

sendo que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos um pelo outro.

[00060] Uma concretização adicional da invenção é uma célula hospedeira compreendendo:

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

b) um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia leve e um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada, de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,

sendo que os domínios variáveis VL e VH são substituídos um pelo outro,

e

sendo que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos um pelo outro.

[00061] Uma concretização adicional da invenção é uma composição, de preferência, uma composição farmacêutica ou uma composição diagnóstica do anticorpo biespecífico, bivalente, de acordo com a invenção.

[00062] Uma concretização adicional da invenção é uma composi-

ção farmacêutica compreendendo um anticorpo biespecífico, bivalente, de acordo com a invenção, e pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[00063] Uma concretização adicional da invenção é um método para o tratamento de um paciente que necessite de terapia, caracterizado por administração, ao paciente, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo biespecífico, bivalente, de acordo com a invenção.

[00064] O termo "ácido nucleico ou molécula de ácido nucleico", conforme usado aqui, pretende incluir moléculas de DNA e moléculas de ARN. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de fita única ou de fita dupla, mas, de preferência, é DNA de fita dupla.

[00065] Conforme usado aqui, as expressões "célula", "linhagem de células" e "cultura de células" são usados de maneira intercambiável e todas tais designações incluem a progênie. Portanto, as palavras "transformantes" e "células transformadas" incluem a célula em questão primária e culturas dela derivadas, sem se considerar o número de transferências. Também é entendido que toda a progênie pode não ser precisamente idêntica em teor de DNA, devido a mutações deliberadas ou inadvertidas. A progênie variante, que tenha a mesma função ou atividade biológica, conforme selecionada na célula originalmente transformada, está incluída. Quando se pretender designações distintas, ficará claro a partir do contexto.

[00066] O termo "transformação", conforme usado aqui, se refere ao processo de transferência de vetores/ácido nucleico para uma célula hospedeira. Se células, sem barreiras de parede celular formidáveis, forem usadas como células hospedeiras, a transfecção é realizada, por exemplo, pelo método de precipitação com fosfato de cálcio, conforme descrito por Graham, F.L., e van der Eb, A., J. Virology 52 (1978) 546-467. No entanto, outros métodos para a introdução de DNA

em células, tais como por eletroporação, nucleofecção, injeção nuclear ou por fusão de protoplastos, também podem ser usados. Se células procarióticas ou células que contenham construções de parede celular substanciais forem usadas, por exemplo, um método de transfecção é tratamento com cálcio usando cloreto de cálcio conforme descrito por Cohen, S., N, et al., PNAS. 69 (1972) 2110-2114.

[00067] A produção recombinante de anticorpos usando transformação é bem-conhecido no estado da técnica e descrito, por exemplo, nos artigos de revisão de Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., et al., Arzneimittelforschung 48 (1998) 870-880, assim como nos documentos de números US 6.331.415 e US 4.816.567.

[00068] Conforme usado aqui, "expressão" se refere ao processo pelo qual um ácido nucleico é transcrito em mARN e/ou ao processo pelo qual o mARN transcrito (a que se refere também como transcrito) estiver subsequentemente sendo traduzido em peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. Aos transcritos e aos polipeptídeos codificados refere-se coletivamente como produto de gene. Se o polinucleotídeo for derivado a partir de DNA genômico, a expressão em uma célula eucariótica pode incluir a excisão-união do mARN.

[00069] Um "vetor" é uma molécula de ácido nucleico, em particular auto-replicante, que transfere uma molécula de ácido nucleico inserida em e/ou entre células hospedeiras. O termo inclui vetores que funcionem primariamente para inserção de DNA ou de ARN em uma célula (por exemplo, integração cromossomal), replicação de vetores que funcionem primariamente para a replicação de DNA ou de ARN, e vetores de expressão que funcionem para transcrição e/ou tradução do DNA ou ARN. Também incluídos estão vetores que forneçam mais do que uma das funções conforme descritas.

[00070] Um "vetor de expressão" é um polinucleotídeo que, quando introduzido em uma célula hospedeira apropriada, pode ser transcrito e traduzido em um polipeptídeo. Um "sistema de expressão" usualmente se refere a uma célula hospedeira adequada composta por um vetor de expressão que pode funcionar para obter um produto de expressão desejado.

[00071] Os anticorpos biespecíficos, bivalentes, de acordo com a invenção são, de preferência, produzidos por meios recombinantes. Tais métodos são amplamente conhecidos no estado da técnica e compreendem expressão de proteína em células procarióticas e eucarióticas, com isolamento subsequente do polipeptídeo de anticorpo e usualmente purificação até uma pureza farmacologicamente aceitável. Para a expressão de proteína, ácidos nucleicos, que codificam cadeias leves e pesadas ou seus fragmentos, são inseridos em vetores de expressão por métodos padrão. A expressão é realizada em células hospedeiras procarióticas e eucarióticas apropriadas, como células de CHO, células de NS0, células de SP2/0, células de HEK293, células de COS, células de PER.C6, células de levedura ou células de E. coli, e o anticorpo é recuperado a partir das células (sobrenadante ou células depois de lise). Os anticorpos biespecíficos, bivalentes, podem estar presentes em células integrais, em um lisado de células, ou em uma 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 ou proteínas celulares, por técnicas padrão, incluindo tratamento alcalino/SDS, cromatografia em coluna e outros bem-conhecidos na técnica. Ver Ausubel, F., et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

[00072] A expressão em células de NS0 é descrita, por exemplo, por Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123; e Barnes,

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

[00073] As sequências de controle, que são adequadas para procariontes, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência de operador, e um sítio de ligação a ribossoma. Sabe-se que células eucarióticas utilizam promotores, intensificadores e sinais de poliadenilação.

[00074] Ácido nucleico está "ligado de maneira operativa" quando ele for colocado em um relacionamento funcional com outra sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, DNA para uma pré-sequência ou condutor secretório está ligado de maneira operativa a DNA para um polipeptídeo, se ele for expresso como uma pré-proteína que participe na secreção do polipeptídeo; um promotor ou intensificador está ligado de maneira operativa a uma sequência codificante se ele afetar a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação a ribossoma está ligado de maneira operativa a uma sequência a uma sequência codificante se ele estiver posicionado de modo a facilitar a tradução. Em geral, "ligado de maneira operativa" significa que as sequências de DNA estando ligadas são contíguas, e, no caso de um condutor secretório, contíguo e na grade de leitura. No entanto, intensificadores não têm que ser contíguos. A ligação é realizada por ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existirem, os adaptadores ou ligantes de oligonucleotídeo sintéticos são usados de acordo com a prá-

tica convencional.

[00075] Os anticorpos biespecíficos, bivalentes, são separados de maneira adequada a partir do meio de cultura por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais, tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia em hidroxil-apatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia por afinidade. DNA e ARN que codificam os anticorpos monoclonais são prontamente isolados e sequenciados usando procedimentos convencionais. As células de hibridoma podem servir como uma fonte de tais DNA e ARN. Uma vez isolado, o DNA pode ser inserido em vetores de expressão, que são, então, transfectados em células hospedeiras, tais como células de HEK 293, células de CHO ou células de mieloma que, de outra maneira, não produzem a proteína de imunoglobulina, para se obter a síntese de anticorpos monoclonais recombinantes nas células hospedeiras.

[00076] Variantes de sequências de aminoácidos (ou mutantes) do anticorpo biespecífico, bivalente, são preparadas por introdução de mudanças de nucleotídeos apropriadas no DNA de anticorpo, ou por síntese de nucleotídeos. Tais modificações podem ser realizadas, entretanto, somente em uma faixa muito limitada, por exemplo, conforme descrito acima. Por exemplo, as modificações não alteram as características de anticorpos mencionadas acima, tais como o isotipo de IgG e ligação a antígeno, mas, podem aperfeiçoar o rendimento da produção recombinante, estabilidade de proteína ou facilitam a purificação.

[00077] Os seguintes exemplos, listagem de sequências e figuras são fornecidos para auxiliar o entendimento da presente invenção, do verdadeiro escopo do qual é estabelecido nas reivindicações apenas. Entende-se que modificações podem ser feitas nos procedimentos estabelecidos sem se desviar do espírito da invenção.

Listagem de Sequências

[00078] **SEQ ID NO: 1** sequência de aminoácidos de cadeia pesa-

da de anticorpo de <IGF-1R> de tipo selvagem.

[00079] **SEQ ID NO: 2** sequência de aminoácidos de cadeia leve de anticorpo de <IGF-1R> de tipo selvagem.

[00080] **SEQ ID NO: 3** sequência de aminoácidos da cadeia pesada# (HC#) de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, sendo que o domínio de cadeia pesada VH é substituído pelo domínio de cadeia leve VL, e o domínio de cadeia pesada CH1 é substituído pelo domínio de cadeia leve CL.

[00081] **SEQ ID NO: 4** sequência de aminoácidos da cadeia leve* (LC*) de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, sendo que o domínio de cadeia leve VL é substituído pelo domínio de cadeia pesada VH, e o domínio de cadeia leve CL é substituído pelo domínio de cadeia pesada CH1.

[00082] **SEQ ID NO: 5** sequência de aminoácidos de etiqueta de peptídeo de ligação de IGF-1R ectodomínio His-Estreptavidina (IGF-1R-His-SBP ECD).

[00083] **SEQ ID NO: 6** sequência de aminoácidos de cadeia pesada de anticorpo de Angiopoietina-2 <ANGPT2> de tipo selvagem.

[00084] **SEQ ID NO: 7** sequência de aminoácidos de cadeia leve de anticorpo de Angiopoietina-2 <ANGPT2> de tipo selvagem.

[00085] **SEQ ID NO: 8** sequência de aminoácidos da cadeia pesada* (HC*) de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, sendo que o domínio de cadeia pesada VH é substituído pelo domínio de cadeia leve VL, e o domínio de cadeia pesada CH1 é substituído pelo domínio de cadeia leve CL.

[00086] **SEQ ID NO: 9** sequência de aminoácidos da cadeia leve* (LC*) de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, sendo que o domínio de cadeia leve VL é substituído pelo domínio de cadeia pesada VH, e o domínio de cadeia leve CL é substituído pelo domínio de cadeia pesada CH1.

[00087] **SEQ ID NO: 10** sequência de aminoácidos de domínio CH3 (botões) com uma troca T366W para uso na tecnologia de botões em cavidades.

[00088] **SEQ ID NO: 11** sequência de aminoácidos de domínio CH3 (cavidade) com uma troca T366S, L368A, Y407V para uso na tecnologia de botões em cavidades.

[00089] **SEQ ID NO: 12** sequência de aminoácidos de cadeia pesada de anticorpo <VEGF> de tipo selvagem.

[00090] **SEQ ID NO: 13 e 14** sequência de aminoácidos de cadeia leve de anticorpo <VEGF> de tipo selvagem com e sem líder.

[00091] **SEQ ID NO: 15** sequência de aminoácidos da cadeia pesada* (HC*) de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, sendo que o domínio de cadeia pesada VH é substituído pelo domínio de cadeia leve VL, e o domínio de cadeia pesada CH1 é substituído pelo domínio de cadeia leve CL e o domínio CH3 porta uma sequência de aminoácidos com uma troca T366S, L368A, Y407V (cavidade) para uso na tecnologia de botões em cavidades.

[00092] **SEQ ID NO: 16** sequência de aminoácidos de cadeia pesada de anticorpo <VEGF> de tipo selvagem, sendo que o domínio CH3 porta uma sequência de aminoácidos com uma troca T366W (botões) para uso na tecnologia de botões em cavidades.

[00093] **SEQ ID NO: 17** sequência de aminoácidos da cadeia pesada(G)* (HC*) de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, sendo que o domínio de cadeia pesada VH é substituído pelo domínio de cadeia leve VL, e o domínio de cadeia pesada CH1 é substituído pelo domínio de cadeia leve CL com uma inserção de glicina adicional.

[00094] **SEQ ID NO: 18** sequência de aminoácidos da cadeia leve(G)* (LC*) de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, sendo que o domínio de cadeia leve VL é substituído pelo domínio de cadeia pesada VH, e o domínio de cadeia leve CL é substituído pelo domínio

de cadeia pesada CH1 com uma inserção de glicina adicional.

Descrição das Figuras

[00095] **Figura 1** Figura esquemática de IgG, um anticorpo integral que ocorre naturalmente, específico para um antígeno com dois pares de cadeias leve e pesada, que compreendem domínios variável e constante em uma ordem típica.

[00096] **Figura 2** Figura esquemática de um anticorpo biespecífico, bivalente, compreendendo: a) a cadeia leve a e cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno; e b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno, sendo que os domínios variáveis VL e VH são substituídos um pelo outro, e sendo que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos um pelo outro.

[00097] **Figura 3** Figura esquemática de um anticorpo biespecífico, bivalente, compreendendo: a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno; e b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno, sendo que os domínios variáveis VL e VH são substituídos um pelo outro, e sendo que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos um pelo outro, e sendo que os domínios CH3 de ambas as cadeias pesadas são alteradas pela tecnologia de botões em cavidades.

[00098] **Figura 4** Figura esquemática de um anticorpo biespecífico, bivalente, compreendendo: a) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um primeiro antígeno; e b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno, sendo que os domínios variáveis VL e VH são substituídos um pelo outro, e sendo que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos um pelo outro, e sendo que um dos domínios de cadeia pesada constantes CH3 de ambas as

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

[00099] **Figura 5** Esquema de sequência de proteínas da cadeia pesada* <IGF-1R> HC* do anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1.

[000100] **Figura 6** Esquema de sequência de proteínas da cadeia leve* <IGF-1R> LC* do anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1.

[000101] **Figura 7** Mapa de plasmídeo de vetor de expressão pUC-HC*-IGF-1R de cadeia pesada* <IGF-1R> HC*.

[000102] **Figura 8** Mapa de plasmídeo de vetor de expressão de pUC-LC*-IGF-1R de cadeia leve* <IGF-1R> LC*.

[000103] **Figura 9** Mapa de plasmídeo do vetor de expressão 4700-Hyg-OriP.

[000104] **Figura 10** SDS-PAGE de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico (IgG1*) com HC* e LC* isoladas por imunoprecipitação com Proteína A Agarose a partir de sobrenadantes de culturas de células depois de transfecção transiente de células de HEK293E.

[000105] **Figura 11** Ligação de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 monoespecífico e anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem ao IGF-1R ECD em um ensaio de ligação baseado em ELISA.

[000106] **Figura 12** Mapa de plasmídeo de cadeia pesada* de vetor de expressão pUC-HC*-ANGPT2> de <ANGPT2> HC*.

[000107] **Figura 13** Mapa de plasmídeo de cadeia leve* de vetor de expressão pUC-LC*-ANGPT2> de <ANGPT2> LC*.

[000108] **Figura 14** SDS-PAGE reduzido e não reduzido a partir da purificação de mistura de A) anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 monoespecífico, B) anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico e C) anticorpos de tipo selvagem <ANGPT2>

("mistura de troca VL-VH/CL-CH1 biespecífica") a partir de sobrenadantes de cultura de células por cromatografia de afinidade à Proteína A seguida por cromatografia de exclusão por tamanho e concentração.

[000109] **Figura 15** Princípio de teste de ensaio de ligação em ponte de FACS IGF-1R-ANGPT2 celular em células que expressam I24 IGF-1R para detectar a presença de anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico funcional.

[000110] **Figura 16** Resultados para Amostras A a G de ensaio de ligação em ponte de FACS IGF-1R-ANGPT2 celular em células que expressam I24 IGF-1R para detectar a presença de anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico funcional em sobrenadantes de cultura de células.

Amostra	Célula IGF-1R	Anticorpo	hANGPT2	Anticorpo de detecção	Deteção
A	I24	não tratado	-	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE
B	I24	não tratado	2 µg/mL hANGPT2	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE
C	I24	mistura de anticorpos de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico	2 µg/mL hANGPT2	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE
D	I24	mistura de tipo selvagem	2 µg/mL hANGPT2	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE
E	I24	Anticorpo de tipo selvagem <ANGPT2>	2 µg/mL hANGPT2	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE
F	I24	Anticorpo de tipo selvagem <IGF-1R>	2 µg/mL hANGPT2	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE
G	I24	Anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 monoespecífico	2 µg/mL hANGPT2	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE

[000111] **Figura 17** Resultados para Amostras A a G de ensaio de ligação em ponte de FACS IGF-1R-ANGPT2 celular em células que expressam I24 IGF-1R para detectar a presença de anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico funcional.

Amostra	Célula IGF-1R	Anticorpo	hANGPT 2	Anticorpo de detecção	Deteção
A	I24	não tratado	-	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE
B	I24	não tratado	2 µg/mL hANGPT 2	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE
C	I24	Mistura de troca VL-VH/CL-CH1 biespecífica	2 µg/mL hANGPT 2	mIgG1 - Biotina - controle de isotipo	SA-PE
D	I24	Mistura de troca VL-VH/CL-CH1 biespecífica	2 µg/mL hANGPT 2	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE
E	I24	Mistura de tipo selvagem	2 µg/mL hANGPT 2	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE
F	I24	Anticorpo de tipo selvagem <ANGPT 2>	2 µg/mL hANGPT 2	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE
G	I24	Anticorpo de tipo selvagem <IGF-1R>	2 µg/mL hANGPT 2	<Ang-2>mIgG1- Biotina	SA-PE

[000112] **Figura 18** Esquema da ELISA de ligação em ponte de IGF-1R ECD.

[000113] **Figura 19** Esquema da ELISA de ligação em ponte de ANGPT2.

[000114] **Figura 20** Esquema da ELISA de ligação em ponte de VEGF-ANGPT2.

[000115] **Figura 21** Esquema do ensaio com Biacore de ligação em ponte de ANGPT2-VEGF.

[000116] **Figura 22** SDS-PAGE da purificação de anticorpo de troca de <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 purificado corresponde a concentrado de reunião de SEC; B) cromatografia de exclusão por tamanho do anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 purificado.

[000117] **Figura 23** SDS-PAGE da purificação de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 purificado corresponde a concentrado de reunião de SEC; B) cromatografia de exclusão por tamanho do anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 purificado.

[000118] **Figura 24** Ligação de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-

VH/CL-CH1 monoespecífico e anticorpo <ANGPt2> de tipo selvagem a ANGPT2 em um ensaio de ligação com base em ELISA.

[000119] **Figura 25** Análise com Biacore de ligação de anticorpo de troca <ANGPt2> VL-VH/CL-CH1 monoespecífico e anticorpo <ANGPt2> de tipo selvagem a ANGPT2.

[000120] **Figura 26** SDS-PAGE reduzida e não reduzida das frações de eluição a partir de cromatografia de exclusão por tamanho do anticorpo de troca <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 biespecífico.

[000121] **Figura 27** Designação de bandas em SDS-PAGE por espectrometria de massa de frações nativas. A posição de proteínas identificadas por espectrometria de massa no respectivo SDS-PAGE não reduzido é indicada.

[000122] **Figura 28** Análise das frações de eluição 5 e 9 a partir de cromatografia de exclusão por tamanho do anticorpo de troca <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 biespecífico na ELISA de ligação em ponte de VEGF-ANGPT2. Um anticorpo biespecífico e tetravalente TvG6-Ang23, que reconhece ANGPT2 e VEGF simultaneamente, é incluída como controle positivo.

[000123] **Figura 29** Análise por ressonância de plásmon de superfície das frações de eluição 5 e 9 a partir de cromatografia de exclusão por tamanho do anticorpo de troca <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 biespecífico no ensaio com Biacore de ligação em ponte VEGF-ANGPT2. Um anticorpo biespecífico e tetravalente TvG6-Ang23, que reconhece ANGPT2 e VEGF simultaneamente, é incluída como controle positivo.

[000124] **Figura 30** Esquema do anticorpo de troca <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 biespecífico com botões em cavidades para heterodimerização.

[000125] **Figura 31** Análise com Biacore de ligação de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G) monoespecífico e anticorpo

<ANGPT2> de tipo selvagem a ANGPT2.

Exemplos

Materiais & métodos gerais

[000126] Informações gerais com respeito às sequências de nucleotídeos de imunoglobulinas humanas de cadeias leve e pesada são dadas em: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Aminoácidos de cadeias de anticorpos são numerados e indicados de acordo com a numeração de UE (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)).

Técnicas de DNA recombinante

[000127] Métodos padrão foram usados para manipular DNA, conforme descrito em Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Os reagentes biológicos moleculares foram usados de acordo com as instruções do fabricante.

Síntese de genes

[000128] Segmentos de genes desejados foram preparados a partir de oligonucleotídeos preparados por síntese química. Os segmentos de genes de 600 - 1.800 pb de comprimento, que estejam flanqueados por sítios de clivagem por endonuclease de restrição singulares, foram montados por anelamento e ligação de oligonucleotídeos, incluindo amplificação por PCR, e subsequentemente clonados via os sítios de restrição indicados, por exemplo KpnI/ SacI ou AscI/PacI, em um vetor de clonagem de pGA4 com base em pPCRScript (Stratagene). As sequências de DNA dos fragmentos de genes subclonados foram confirmadas por sequenciamento de DNA. Os fragmentos de síntese de genes foram ordenados de acordo com especificações dadas em Ge-

neart (Regensburg, Alemanha).

Determinação de sequências de DNA

[000129] As sequências de DNA foram determinadas por sequenciamento de fita dupla realizado em MediGenomix GmbH (Martinsried, Alemanha) ou Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Alemanha).

Análise de sequências de DNA e de proteína e gerenciamento de dados de sequências

[000130] Os pacotes de programas de computador GCG's (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) Versão 10.2 e a suite Infomax's Vector NT1 Advance Versão 8.0 foram usados para a criação, mapeamento, análise, anotação e ilustração de sequências. Vetores de expressão

[000131] Para a expressão dos anticorpos descritos, variantes de plasmídeos de expressão para células de expressão transiente (por exemplo, em HEK293 EBNA ou HEK293-F), à base ou em uma organização de cDNA com um promotor de CMV-Íntron A ou em uma organização genômica com um promotor de CMV foram aplicadas.

[000132] Além do cassete de expressão de anticorpo, os vetores continham:

- uma origem de replicação, que permita a replicação desse plasmídeo em *E. coli*, e
- um gene de β -lactamase, que confere resistência à ampicilina em *E. coli*.

[000133] A unidade de transcrição do gene de anticorpo é composta pelos seguintes elementos:

- sítio(s) de restrição único(s) na extremidade 5',
- o intensificador precoce imediato e promotor a partir do citomegalovírus humano,
- seguido pela sequência de Íntron A no caso da organização de cDNA,

- uma região de 5' não traduzida de um gene de anticorpo humano,
- uma sequência de sinal de cadeia pesada de imunoglobulina,
- a cadeia de anticorpo humano (tipo selvagem ou com troca de domínio) ou como cDNA ou como organização genômica com uma organização de éxon-Íntron de imunoglobulina,
- uma região 3' não traduzida com uma sequência de sinal de poliadenilação, e
- sítio(s) de restrição único(s) na extremidade 3'.

[000134] Os genes de fusão compreendendo as cadeias de anticorpo descritas, conforme descrito abaixo, foram geradas por PCR e/ou síntese de genes e montados com métodos e técnicas recombinantes conhecidos por conexão dos segmentos de ácido nucleico correspondentes, por exemplo, usando sítios de restrição únicos nos respectivos vetores. As sequências de ácidos nucleicos subclonadas foram verificadas por sequenciamento de DNA. Para transfecções transientes, maiores quantidades dos plasmídeos foram preparadas por preparação de plasmídeos a partir de culturas de *E. coli* transformadas (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Técnicas de cultura de células

[000135] Técnicas de cultura de células padrão foram usadas conforme descrito em *Current Protocols in Cell Biology* (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. e Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

[000136] Anticorpos biespecíficos foram expressos por cotransfecção transiente dos respectivos plasmídeos de expressão em células HEK293-EBNA de crescimento de maneira aderente ou em células HEK29-F crescendo em suspensão, conforme descrito abaixo.

Transfecções transientes em sistema HEK293-EBNA

[000137] Anticorpos biespecíficos foram expressos por cotransfecção transiente dos respectivos plasmídeos de expressão (por exemplo, codificando a cadeia pesada e a cadeia pesada modificada, assim como a cadeia leve e a cadeia leve modificadas correspondentes) em células HEK293-EBNA crescendo de maneira aderente (linhagem 293 de células de rim embrionárias humanas que expressam antígeno nuclear do Vírus Epstein-Barr; número de depósito na American Type Culture Collection ATCC # CRL-10852, Lote 959 218) cultivadas em DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco) suplementado com Ultra Low IgG FCS à 10% (soro de bezerro fetal, Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco) e 250 µg/mL de geneticina (Gibco). Para transfecção, foi usado Reagente para Transfecção FuGENE™ 6 (Roche Molecular Biochemicals) em uma razão de reagente FuGENE™ (µL) para DNA (µg) de 4:1 (variando de 3:1 a 6:1). Proteínas foram expressas a partir dos respectivos plasmídeos usando uma razão molar de plasmídeos que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada (modificados e de tipo selvagem) de 1:1 (equimolar) variando desde 1:2 a 2:1, respectivamente. Células foram alimentadas no dia 3 com L-glutamina ad 4 mM, glicose [Sigma] e NAA [Gibco]. Sobrenadantes de cultura de células contendo anticorpo biespecífico foram coletados a partir do dia 5 a 11 depois de transfecção por centrifugação e armazenadas à -20°C. Informações gerais com respeito à expressão recombinante de imunoglobulinas humanas em, por exemplo, células de HEK293, são dadas em: Meissner, P. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203.

Transfecções transientes em sistema HEK293-F

[000138] Anticorpos biespecíficos foram gerados por transfecção transiente dos respectivos plasmídeos (por exemplo, que codificam a cadeia pesada e a cadeia pesada modificada, assim como a cadeia leve e a cadeia leve modificadas correspondentes) usando o sistema HEK293-F (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. De

maneira breve, células de HEK293-F (Invitrogen) crescendo em suspensão ou em um frasco de agitação ou em um fermentador agitado, em meio de expressão FreeStyle 293 livre de soro (Invitrogen), foram transfectadas com uma mistura dos quatro plasmídeos de expressão e 293fectina ou 293fectina (Invitrogen). Em frascos de agitação de 2 L (Corning), células de HEK293-F foram semeadas em uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/mL em 600 mL e incubadas à 120 rpm, e 8% de CO₂. O dia depois em que as células foram transfectadas em uma densidade celular de cerca de $1,5 \times 10^6$ células/mL com cerca de 42 mL de mistura de A) 20 mL de Opti-MEM (Invitrogen) com 600 µg de DNA de plasmídeo total (1 µg/mL), que codifica a cadeia pesada ou a cadeia pesada modificada, respectivamente, e a cadeia leve correspondente, em uma razão equimolar e B) 20 mL de Opti-MEM + 1,2 mL de 293fectina ou 293fectina (2 µL/mL). De acordo com o consumo de glicose, a solução de glicose foi adicionada durante o curso da fermentação. O sobrenadante contendo o anticorpo secretado foi coletado depois de 5-10 dias e os anticorpos foram ou diretamente purificados a partir do sobrenadante ou o sobrenadante foi congelado e armazenado.

Determinação de proteínas

[000139] A concentração de proteínas de anticorpos purificados e derivados foi determinada por determinação da densidade óptica (DO) à 280 nm, usando o coeficiente de extinção molar calculado com base na sequência de aminoácidos de acordo com Pace, C.N., et. al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423.

Determinação da concentração de anticorpos em sobrenadantes

[000140] A concentração de anticorpos e derivados em sobrenadantes de cultura de células foi estimada por imunoprecipitação com contas de Proteína A Agarose (Roche). 60 µL de contas de Proteína A Agarose foram lavadas três vezes em TBS-NP40 (50 mM Tris, pH 7,5,

150 mM NaCl, Nonidet-P40 à 1%). Subsequentemente, 1-15 mL de sobrenadante de cultura de células foram aplicados às contas de Proteína A Agarose pré-equilibradas em TBS-NP40. Depois de incubação durante 1 h à temperatura ambiente, as contas foram lavadas em uma coluna de filtro Ultrafree-MC (Amicon) uma vez com 0,5 mL de TBS-NP40, duas vezes com 0,5 mL 2x de salina tamponada com fosfato (2xPBS, Roche) e ligeiramente quatro vezes com 0,5 mL de citrato de sódio 100 mM pH 5,0. Anticorpo ligado foi eluído por adição de 35 µL de NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen). Metade da amostra foi combinada com Agente Redutor de Amostra NuPAGE® ou deixada não reduzida, respectivamente, e aquecida durante 10 min à 70°C. Consequentemente, 5-30 µL foram aplicados em um NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE à 4-12% (Invitrogen) (com tampão MOPS para SDS-PAGE não reduzida e aditivo de tampão correndo com tampão MES com NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen) para SDS-PAGE reduzida) e tingido com Azul de Coomassie.

[000141] A concentração de anticorpos e derivados em sobrenadantes de cultura de células foi medida quantitativamente por cromatografia de HPLC por afinidade. De maneira breve, os sobrenadantes de cultura de células, contendo anticorpos e derivados que se ligam à Proteína A, foram aplicados a uma coluna Applied Biosystems Poros A/20 em KH₂PO₄ 200 mM, citrato de sódio 100 mM, pH 7,4 e eluídos a partir da matriz com NaCl 200 mM, ácido cítrico 100 mM, pH 2,5 em um sistema Agilent HPLC 1100. A proteína eluída foi quantificada por absorbância de UV e integração de áreas de pico. Um anticorpo de IgG1 padrão purificado serviu como um padrão.

[000142] Alternativamente, a concentração de anticorpos e derivados em sobrenadantes de cultura de células foi medida por Sandwich-IgG-ELISA. De maneira breve, placas de microtitulação de 96 cavidades de StreptaWell High Bind Streptavidin A (Roche) foram revestidas com

100 µL/cavidade de F(ab')₂<h-Fcγ> BI de molécula de captura de IgG anti-humana biotinizada (Dianova) à 0,1 µg/mL, durante 1 h à temperatura ambiente, ou, alternativamente, durante uma noite à 4°C e, subsequentemente, lavadas três vezes com 200 µL/cavidade de PBS, Tween à 0,05% (PBST, Sigma). 100 µL/cavidade de uma série de diluição em PBS (Sigma) dos respectivos sobrenadantes de cultura de células contendo anticorpos foram adicionados às cavidades e incubados durante 1-2 h em um agitador de placas de microtitulação à temperatura ambiente. As cavidades foram lavadas três vezes com 200 µL/cavidade de PBST e os anticorpos ligados foram detectados com 100 µl de F(ab')₂<hFcγ>POD (Dianova) a 0,1 µg/mL como anticorpo de detecção durante 1-2 h em um agitador de placas de microtitulação, à temperatura ambiente. Anticorpo de detecção não ligado foi removido por lavagem três vezes com 200 µL/cavidade de PBST e o anticorpo de detecção ligado foi detectado por adição de 100 µL ABTS/cavidade. A determinação da absorbância foi realizada em um Tecan Fluor Spectrometer em um comprimento de onda de medição de 405 nm (comprimento de onda de referência 492 nm).

Purificação de proteínas

[000143] As proteínas foram purificadas a partir de sobrenadantes de cultura de células filtrados com referência a protocolos padrão. De maneira breve, os anticorpos foram aplicados a uma coluna de Proteína A Sepharose (GE Healthcare) e lavados com PBS. A eluição de anticorpos foi conseguida em pH 2,8 seguida por neutralização imediata da amostra. A proteína agregada foi separada dos anticorpos monoméricos por cromatografia de exclusão por tamanho (Superdex 200, GE Healthcare) em PBS ou em histidina 20 mM, NaCl 150 mM pH 6,0. Frações de anticorpos monoméricos foram reunidas, concentradas se necessário usando, por exemplo, um concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), congeladas e armazenadas à -20°C

ou -80°C. Parte das amostras foi fornecida para análise de proteínas subsequente e caracterização analítica, por exemplo, por SDS-PAGE, cromatografia de exclusão por tamanho ou espectrometria de massa.

SDS-PAGE

[000144] O sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Em particular, foram usados géis de NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast a 10% ou 4-12% (pH 6,4) e um NuPAGE® MES (géis reduzidos, aditivo de tampão correndo com NuPAGE® Antioxidant) ou MOPS (géis não reduzidos) correndo tampão.

Cromatografia de exclusão por tamanho analítica

[000145] Cromatografia de exclusão por tamanho, para a determinação da agregação e do estado oligomérico de anticorpos, foi realizada por cromatografia de HPLC. De maneira breve, anticorpos purificados por Proteína A foram aplicados a uma coluna Tosoh TSKgel G3000SW em NaCl 300 mM, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM, pH 7,5 em um sistema Agilent HPLC 1100 ou a uma coluna Superdex 200 (GE Healthcare) em 2 x PBS em um sistema Dionex HPLC. A proteína eluída foi quantificada por absorbância de UV e integração das áreas de picos. BioRad Gel Filtration Standard 151–1901 serviu como um padrão.

Espectrometria de massa

[000146] A massa desglicosilada total de anticorpos de cruzamento foi determinada e confirmada via espectroscopia de massa por ionização com spray de elétrons (ESI-MS). De maneira breve, 100 µg de anticorpos purificados foram desglicosilados com 50 mU de N-glicosidase F (PNGaseF, ProZyme) em KH₂PO₄/K₂HPO₄ 100 mM, pH 7 à 37°C durante 12-24 h, em uma concentração de proteínas de até 2 mg/mL e subsequentemente dessalinizada via HPLC em uma coluna de Sephadex G25 (GE Healthcare). A massa das respectivas cadeias pesada e leve foi determinada por ESI-MS depois de desglicosilação e

redução. De maneira breve, 50 µg de anticorpos em 115 µL foram incubados com 60 µL TCEP 1 M e 50 µL de cloridrato de guanidina 8 M subsequentemente dessalinizado. A massa total e a massa das cadeias pesada e leve reduzidas foi determinada via ESI-MS em um sistema Q-Star Elite MS equipado com uma fonte NanoMate.

ELISA de ligação em ponte de IGF-1R ECD

[000147] As propriedades de ligação dos anticorpos gerados foram avaliadas em um ensaio de ELISA com o domínio extracelular IGF-1R (ECD). Para esse fim, o domínio extracelular de IGF-1R (resíduos 1-462) compreendendo a sequência líder natural e os 12 domínios ricos em LI-cisteína do ectodomínio IGF-1R humano da cadeia alfa (de acordo com McKern et al., 1997; Ward et al., 2001) fundidos a uma etiqueta de peptídeo de ligação à His-Estreptavidina N-terminal (His-SBP), foi clonado em um derivado de vetor pcDNA3 e expresso de maneira transiente em células de HEK293F. A sequência de proteína do IGF-1R-His-SBP ECD é dada em SEQ ID NO: 5. Placas de microtitulação de 96 cavidades de StreptaWell High Bind Streptavidin (Roche) foram revestidos com 100 µL/cavidade de sobrenadante de cultura de células contendo proteína de fusão IGF-1R-ECD-SBP solúvel durante uma noite, à 4°C, e lavadas três vezes com 200 µL/cavidade de PBS, Tween à 0,05% (PBST, Sigma). Subsequentemente, 100 µL/cavidade de uma série de diluição do respectivo anticorpo, e, como uma referência, anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem em PBS (Sigma) incluindo BSA à 1% (fração V, Roche) foi adicionado às cavidades e incubados durante 1-2 h em um agitador de placa de microtitulação, à temperatura ambiente. Para a série de diluição, ou a mesma quantidade de anticorpo purificado, como uma referência, ou sobrenadantes a partir de transfecção transiente em HEK293E (HEK293F) normalizados por Sandwich-IgG-ELISA para a mesma concentração de anticorpos, foram aplicados às cavidades. As células foram lavadas três vezes com

200 µL/cavidade de PBST e anticorpo ligado foi detectado com 100 µL/cavidade de F(ab')₂-hFcγ-POD (Dianova) à 0,1 µg/mL, como anticorpo de detecção, durante 1-2 h em um agitador de placa de microtulação, à temperatura ambiente. Anticorpo de detecção não ligado foi removido por lavagem três vezes com 200 µL/cavidade de PBST e o anticorpo de detecção ligado foi detectado por adição de 100 µL ABTS/cavidade. A determinação de absorbância foi realizada em um Tecan Fluor Spectrometer em um comprimento de onda de medição de 405 nm (comprimento de onda de 492 nm).

IGF-1R ECD Biacore

[000148] A ligação dos anticorpos gerados a IGF-1R ECD humanos também foi investigado por ressonância de plásmon de superfície usando um instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia). De maneira breve, para medições de afinidade IgG anti-Humano de Cabra, anticorpos JIR 109-005-098 foram imobilizados em um chip CM5 via acoplamento de amina, para apresentação dos anticorpos contra IGF-1R ECD-Fc humano etiquetado. A ligação foi medida em tampão de HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 à 0,005%, pH 7,4), 25°C. IGF-1R ECD (R&D Systems ou purificado em casa) foi adicionado em várias concentrações em solução. A associação foi medida por uma injeção de IGF-1R ECD de 80 segundos a 3 minutos; a dissociação foi medida por lavagem da superfície do chip com tampão HBS durante 3 - 10 minutos e um valor de KD foi estimado usando um modelo de ligação de Langmuir 1:1. Devido à baixa densidade de carregamento e nível de captura de anticorpos <IGF-1R>, ligação de IGF-1R ECD monovalente foi obtido. Dados de controle negativos (por exemplo, curvas de tampão) foram subtraídos a partir de curvas de amostra para correção de deslocamento de linha de base intrínseca do sistema e para redução de sinal de ruído. Biacore T100 Evaluation Software versão 1.1.1 foi usado para a análise.

se de sensogramas e para o cálculo de dados de afinidade (Figura 18).

ELISA de ligação a ANGPT2

[000149] As propriedades de ligação dos anticorpos gerados foram avaliadas em um ensaio ELISA com proteína ANGPT2-His de comprimento completo (R&D Systems). Para esse fim, placas de microtitulação intensificadas claras de poliestireno Falcon foram revestidas com 100 µL de ANGPT2 humano recombinante 1 µg/mL (R&D Systems, livre de veículo) em PBS, durante 2 h à temperatura ambiente, ou durante uma noite à 4°C. As cavidades foram lavadas três vezes com 300 µL de PBST (Tween 20 à 0,2%) e bloqueadas com 200 µL de BSA a 2% Tween 20 à 0,1%, durante 30 min à temperatura ambiente, e subsequentemente lavadas três vezes com 300 µL de PBST. 100 µL/cavidade de uma série de diluições de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 purificado e, como uma referência, anticorpo <ANGPT2> de tipo selvagem em PBS (Sigma) foram adicionados às cavidades e incubados durante 1 h em um agitador de placas de microtitulação, à temperatura ambiente. As cavidades foram lavadas três vezes com 300 µL de PBST (Tween 20 à 0,2%) e o anticorpo ligado foi detectado com 100 µL/cavidade de F(ab') <hk>POD 0,1 µg/mL (Biozol N° Cat. 206005) ou 100 µL/cavidade de F(ab') <hFcγ>POD 0,1 µg/mL (Immuno Research) em BSA à 2% Tween 20 a 0,1% em BSA a 2% Tween 20 à 0,1%, como anticorpo de detecção, durante 1 h, em um agitador de placa de microtitulação, à temperatura ambiente. O anticorpo de detecção não ligado foi removido por lavagem três vezes com 300 µL/cavidade de PBST e o anticorpo de detecção ligado foi detectado por adição de 100 µL de ABTS/cavidade. A determinação de absorbância foi realizada em um Tecan Fluor Spectrometer em um comprimento de onda de medição de 405 nm (comprimento de onda de referência 492 nm).

BIACORE de ligação de ANGPT2

[000150] A ligação dos anticorpos gerados a ANGPT2 humano também foi investigada por ressonância de plásmon em superfície usando um instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia). De maneira breve, para medições de afinidade anticorpos policlonais cabra<hlgG-Fcg> foram imobilizados em um chip CM5 ou CM4 via acoplamento de amina para apresentação dos anticorpos contra ANGPT2 humana. A ligação foi medida em tampão de HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 à 0,005%, pH 7,4), com ou sem Ca^{2+} 5 mM, 25°C. ANGPT2-His purificado (R&D Systems ou purificado em casa) foi adicionado em várias concentrações em solução. A associação foi medida por uma injeção de ANGPT2 de 3 minutos; a dissociação foi medida por lavagem da superfície do chip com tampão de HBS durante 3 a 5 minutos e um valor de KD foi estimado usando um modelo de ligação de Langmuir 1:1. Devido à heterogeneidade da preparação de ANGPT2, nenhuma ligação 1:1 poderia ser observada; valores de KD são, portanto, somente estimativas relativas. Dados de controle negativos (por exemplo, curvas de tampão) foram subtraídos a partir de curvas de amostra para correção de deslocamento de linha de base intrínseca do sistema e para redução de sinal de ruído. Biacore T100 Evaluation Software versão 1.1.1 foi usado para análise de sensogramas e para cálculo de dados de afinidade (Figura 19).

Inibição de ligação de hANGPT2 a Tie-2-ECD (ELISA)

[000151] Para testar a capacidade de anticorpos ANGPT2 interferirem com a ligação de Tie2, o seguinte ELISA foi estabelecido. O teste foi realizado em placas de microtitulação de 384 cavidades (MicroCoat, DE, N° Cat. 464718) à TA. Depois de cada etapa de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST. No início, as placas foram revestidas com 0,5 µg/mL de proteína Tie-2 (R&D Systems, RU, N°

Cat. 313-TI) durante pelo menos 2 horas (h). Depois disso, as cavidades foram bloqueadas com PBS suplementado com Tween-20 à 0,2% e BSA à 2% (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha) durante 1 h. Diluições de anticorpos purificados em PBS foram incubadas em conjunto com 0,2 µg/mL de huANGPT2 (R&D Systems, RU, N° Cat. 623-AN) durante 1 h, à TA. Depois de lavagem, uma mistura de 0,5 µg/mL de clone BAM0981 de anti-ANGPT2 biotinilado (R&D Systems, RU) e estreptavidina HRP diluída 1 : 3000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, N° Cat. 11089153001) foi adicionada durante 1 h. Depois disso, as placas foram lavadas 6 vezes com PBST. As placas foram reveladas com reagente ABTS recém-preparado (Roche Diagnostics GmbH, DE, tampão #204 530 001, tabletes #11 112 422 001) durante 30 minutos, à TA. A absorbância foi medida a 405 nm.

ELISA de ligação em ponte de ANGPT2-VEGF

[000152] As propriedades de ligação dos anticorpos biespecíficos gerados foi avaliada em um ensaio ELISA com proteína VEGF165-His de comprimento completo (R&D Systems) e proteína ANGPT2-His humana (R&D Systems) imobilizadas para detecção de anticorpo biespecífico ligado de maneira simultânea. Somente um anticorpo biespecífico é capaz de se ligar simultaneamente a VEGF e a ANGPT2 e, portanto, se liga em ponte aos dois antígenos, enquanto que anticorpos IgG "padrão" monoespecíficos, não devem ser capazes de se ligar simultaneamente a VEGF e a ANGPT2. Para esse fim, placas de microtitulação intensificadas claras de poliestireno Falcon foram revestidas com 100 µL 2 µg/mL de VEGF165 humano recombinante (R&D Systems) em PBS, durante 2 h à temperatura ambiente, ou durante uma noite a 4°C. As cavidades foram lavadas três vezes com 300 µL de PBST (Tween 20 a 0,2%) e bloqueadas com 200 µL de BSA a 2% Tween 20 a 0,1% durante 30 min à temperatura ambiente e, subsequentemente, lavada três vezes com 300 µL PBST. 100 µL/cavidade de uma série de

diluição de anticorpo biespecífico purificado e anticorpos de controle em PBS (Sigma) foram adicionados às cavidades e incubados durante 1 h em um agitador de placas de microtitulação, à temperatura ambiente. As cavidades foram lavadas três vezes com 300 µL de PBST (Tween 20 a 0,2%) e o anticorpo ligado foi detectado por adição de 100 µL de ANGPT2-His humano a 0,5 µg/mL (R&D Systems) em PBS. As cavidades foram lavadas três vezes com 300 µL de PBST (Tween 20 a 0,2%) e ANGPT2 ligado foi detectado com 100 µL anticorpo <ANGPT2>mIgG1-Biotina a 0,5 µg/mL (BAM0981, R&D Systems), durante 1 h à temperatura ambiente. O anticorpo de detecção não ligado foi removido por lavagem com três vezes 300 µL de PBST (Tween 20 a 0,2%) e o anticorpo ligado foi detectado por adição de 100 µL de conjugado Estreptavidina-POD 1 : 2000 (Roche Diagnostics GmbH, N° Cat. 11089153) diluído 1:4 em tampão de bloqueio, durante 1 h à temperatura ambiente. Conjugado de Estreptavidina-POD não ligado foi removido por lavagem com três - seis vezes 300 µL de PBST (Tween 20 a 0,2%) e conjugado de Estreptavidina-POD ligado foi detectado por adição de 100 µL ABTS/cavidade. A determinação de absorbância foi realizada em um Tecan Fluor Spectrometer em um comprimento de onda de medição de 405 nm (comprimento de onda de referência 492 nm) (Figura 20).

Ensaio com Biacore para detectar ligação simultânea de anticorpos biespecíficos a VEGF e a ANGPT2

[000153] A fim de corroborar adicionalmente os dados a partir do ELISA de ligação em ponte, um ensaio adicional foi estabelecido usando tecnologia de ressonância de plásmon em superfície em um instrumento Biacore T100 para confirmar a ligação simultânea a VEGF e a ANGPT2, de acordo com o protocolo seguinte. Os dados foram analisados usando o pacote de programas de computador T100: ANGPT2 foi capturado com um nível de captura de 2000-1700 RU via um

PentaHisAntibody (PentaHis-Ab livre de BSA, Qiagen N° 34660) que estava imobilizado em um chip CM5 via acoplamento de amina (livre de BSA). Tampão de HBS-N serviu como tampão de corrida, a ativação foi feita por mistura de EDC/NHS. O Capture-Antibody livre de BSA PentaHis-Ab foi diluído em tampão de acoplamento NaAc, pH 4,5, c = 30 µg/mL, finalmente, grupos carboxila ainda ativados foram bloqueados por injeção de etanolamina 1 M, densidades de ligantes de 5.000 e 17.000 RU foram testadas. ANGPT2, com uma concentração de 500 nM, foi capturado pelo PentaHis-Ab em uma vazão de 5 µL/min diluído com tampão de corrida + 1 mg/mL de BSA. Subsequentemente, anticorpo biespecífico, que se liga a ANGPT2 e a VEGF, foi demonstrado por incubação com rhVEGF. Para esse fim, anticorpo biespecífico foi ligado a ANGPT2 em uma vazão de 50 µL/min e em uma concentração de 100-500 nM, diluído com tampão de corrida + 1 mg/mL de BSA, e a ligação simultânea foi detectada por incubação com VEGF (rhVEGF, R&D-Systems N° Cat., 293-VE) em PBS + Tween 20 à 0,005 % (v/v) tampão de corrida + 1 mg/mL de BSA em uma vazão de 50 µL/min e em uma concentração de VEGF de 100-150 nM. Tempo de associação de 120 seg, tempo de dissociação de 1.200 seg. A regeneração foi feita em uma vazão de 50 µL/min com 2 x glicina 10 mM pH 2,0 e um tempo de contato de 60 seg. Os sensogramas foram corrigidos usando o referenciamento duplo usual (referência de controle: ligação de anticorpo biespecífico e rhVEGF a molécula de captura PentaHisAb). Brancos para cada Ab foram medidos com concentração de rhVEGF "0". Um esquema do ensaio com Biacore é mostrado na Figura 21. Os sensogramas foram corrigidos usando o referenciamento duplo usual (referência de controle: ligação de Ab biespecífico e rhVEGF a molécula de captura PentaHisAb. Brancos para cada Ab foram medidos com concentração de rhVEGF "0").

Exemplos 1:

[000154] Produção, expressão, purificação e caracterização de anticorpo <IGF-1R> bivalente, monoespecífico, sendo que os domínios variáveis VL e VH são substituídos um pelo outro, e sendo que os domínios constantes CL e CH1 são substituídos um pelo outro (aqui abreviado como anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1).

Exemplo 1A

[000155] Preparação dos plasmídeos de expressão para o anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico.

[000156] As sequências para os domínios variáveis de cadeia pesada e leve do anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 de Receptor 1 de Fator de Crescimento semelhante à insulina, bivalente, monoespecífico, incluindo as respectivas sequências de líder descritas neste Exemplo, são derivadas a partir da cadeia pesada de anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem (SEQ ID NO: 1, plasmídeo 4843-pUC-HC-IGF-1R) e de uma cadeia leve (SEQ ID NO: 2, plasmídeo 4842-pUC-LC-IGF-1R) descritas no documento de número WO 2005/005635, e os domínios constantes de cadeias pesada e leve são derivados a partir de um anticorpo humano (C-kappa e IgG1).

[000157] Os segmentos de genes que codificam a sequência de líder de anticorpo <IGF-1R>, o domínio variável de cadeia leve (VL) e o domínio constante de cadeia kappa-leve humano (CL) foram unidos e fundidos à extremidade 5' dos domínios Fc dos domínios constantes de cadeia γ 1-pesada humanos (dobradiça-CH2-CH3). O DNA que codifica a respectiva proteína de fusão, resultando da troca de domínios de VH e de CH1 por domínios de VL e de CL, foi gerado por síntese de genes e é denotado <IGF-1R> HC* (Cadeia Pesada*) (SEQ ID NO: 3) no que se segue.

[000158] Os segmentos de genes para a sequência de líder de anticorpo <IGF-1R>, o domínio variável de cadeia pesada (VH) e os domínios constantes de cadeia γ 1-pesada humana (CH1) foram unidos

como cadeia independente. O DNA que codifica a respectiva proteína de fusão resultando da troca de domínios de VL e de CL por domínios de VH e de CH1 foi gerado por síntese de genes e é denotado por <IGF-1R> LC* (Cadeia Leve)* (SEQ ID NO: 4) no que se segue.

[000159] A Figura 5 e a Figura 6 mostram uma vista esquemática da sequência de proteína da cadeia pesada* de <IGF-1R> HC* modificada e da cadeia leve* de <IGF-1R> LC* modificada.

[000160] No que se segue, são descritos de maneira breve os respectivos vetores de expressão:

Vetor DW047-pUC-HC*-IGF-1R

Vetor DW047-pUC-HC*-IGF-1R é um plasmídeo de expressão, por exemplo, por expressão transiente de uma cadeia pesada* de <IGF-1R> HC* (cassete de expressão de cDNA organizado; com CMV-Íntron A em células de *HEK293* (*EBNA*) ou para expressão estável em células de CHO.

[000161] Além do cassete de expressão de <IGF-1R> HC*, este vetor contém:

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

[000162] A unidade de transcrição do gene de <IGF-1R> HC* é composta pelos seguintes elementos:

- o sítio de restrição de *Ascl* único na extremidade 5',
- o intensificador precoce imediato e promotor a partir do citomegalovírus humano,
- seguido pela sequência de Íntron A,
- uma região 5' não traduzida de um gene de anticorpo humano,
- uma sequência de sinal de cadeia leve de imunoglobulina,

- a cadeia HC* madura de <IGF-1R> que codifica uma fusão do domínio variável de cadeia leve humano (VL) e do domínio constante de cadeia kappa-leve (CL) fundidos à extremidade 5' dos domínios de Fc dos domínios constantes de cadeia γ 1-pesada humanos (Dobradiça-CH2-CH3).
- uma região 3' não traduzida com uma sequência de sinal de poliadenilação, e
- o sítio de restrição único de SgrAI na extremidade 3'.

[000163] O mapa de plasmídeo de vetor de expressão de <IGF-1R> HC*, DW047-pUC-HC*-IGF-1R, é mostrado na Figura 7. A sequência de aminoácidos do <IGF-1R> HC* (incluindo a sequência de sinal) é dada em SEQ ID NO: 3.

[000164] Vetor DW048-pUC-LC*-IGF-1R

[000165] Vetor DW048-pUC-LC*-IGF-1R é um plasmídeo de expressão, por exemplo, para expressão transiente de uma cadeia leve* de VL-VH/CL-CH1 troca <IGF-1R> LC* (cassete de expressão organizado com cDNA; com CMV-Íntron A em células de HEK293 (EBNA) ou para expressão estável em células de CHO.

[000166] Além do cassete de expressão de <IGF-1R> LC*, este vetor contém:

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

[000167] A unidade de transcrição do gene de <IGF-1R> LC* é composta dos seguintes elementos:

- o sítio de restrição único de Sse8387I na extremidade 5',
- o intensificador precoce imediato e promotor a partir do citomegalovírus humano,
- seguido pela sequência de Íntron A,

- uma região não traduzida de 5' de um gene de anticorpo humano,
- uma sequência de sinal de cadeia pesada de imunoglobulina,
- a cadeia LC* madura de anticorpo <IGF-1R> humano, que codifica uma fusão do domínio variável de cadeia pesada humana (VH) e os domínios constantes de cadeia γ 1-pesada humanos (CH1),
- uma região não traduzida de 3' com uma sequência de sinal de poliadenilação, e
- os sítios de restrição únicos Sall e FseI na extremidade 3'.

[000168] O mapa de plasmídeo do vetor de expressão <IGF-1R> LC* de cadeia leve*, DW048-pUC-LC*-IGF-1R, é mostrado na Figura 8. A sequência de aminoácidos do <IGF-1R> LC* (incluindo sequência de sinal) é dada na SEQ ID NO: 4.

[000169] Plasmídeos DW047-pUC-HC*-IGF-1R e DW048-pUC-LC*-IGF-1R podem ser usados para cotransfecções transientes ou estáveis, por exemplo, para células de HEK293, HEK293 EBNA ou de CHO (sistema de 2 vetores). Por razões comparativas, o anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem foi expresso de maneira transiente a partir dos plasmídeos 4842-pUC-LC-IGF-1R (SEQ ID NO: 2) e 4843-pUC-HC-IGF-1R (SEQ ID NO: 1), análogos àqueles descritos neste exemplo.

[000170] A fim de se atingir níveis de expressão mais elevados em expressões transientes em células de HEK293 EBNA, o cassete de expressão de <IGF-1R> HC* pode ser subclonado via sítios de AscI, SgrAI, e o cassete de expressão de <IGF-1R> LC* pode ser subclonado via sítios de Sse8387I e FseI no vetor de expressão 4700 pUC-Hyg_OriP contendo:

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

selecionável.

[000171] Unidades de transcrição de cadeias pesadas e leves podem ou ser subclonadas em dois vetores 4700-pUC-Hyg-OriP independentes para cotransfecção (sistema de 2 vetores) ou elas podem ser clonadas em um vetor 4700-pUC-Hyg-OriP comum (sistema de 1 vetor) para transfecções transientes ou estáveis subsequentes com os vetores resultantes. A Figura 9 mostra um mapa de plasmídeo do vetor básico 4700-pUC-OriP.

Exemplo 1B

[000172] Preparação dos plasmídeos de expressão de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 bivalentes, monoespecíficos

[000173] O genes de fusão de <IGF-1R> (genes de fusão de HC* e de LC*) compreendendo as sequências Fab trocadas de anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem foram montados com métodos e técnicas recombinantes reconhecidos por conexão dos segmentos de ácidos nucleicos correspondentes.

[000174] As sequências de ácidos nucleicos que codificam as HC* e LC* de IGF-1R foram, cada uma, sintetizadas por síntese química e subsequentemente clonadas em um vetor de clonagem de pGA4 à base de pPCRScrip (Stratagene) em Geneart (Regensburg, Alemanha). O cassete de expressão que codifica a IGF-1R HC* foi ligado ao respectivo plasmídeo de E. coli via sítios de restrição de PvuII e de BmgBI, resultando no vetor final DW047-pUC-HC*-IGF-1R; o cassete de expressão que codifica a respectiva IGF-1R LC* foi ligado ao respectivo plasmídeo de E. coli sítios de restrição de PvuII e de Sall, resultando no vetor final DW048-pUC-LC*-IGF-1R. As sequências de ácidos nucleicos clonadas foram verificadas por sequenciamento de DNA. Para transfecções transientes e estáveis, quantidades maiores dos plasmídeos foram preparadas por preparação de plasmídeo a partir de culturas de E. coli transformadas (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Exemplo 1C

[000175] Expressão transiente de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, em células de HEK293 EBNA

[000176] Anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 recombinante foi expresso por cotransfecção transiente de plasmídeos DW047-pUC-HC*-IGF-1R e DW048-pUC-LC*-IGF-1R em células HEK293-EBNA que crescem de maneira aderente (linhagem 293 de células de rim embrionárias humanas que expressem o antígeno nuclear de Vírus de Epstein-Barr; número de depósito no American Type Culture Collection ATCC # CRL-10852, Lote 959 218) cultivadas em DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco) suplementado com Ultra Low IgG FCS à 10% (soro de bezerro fetal, Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco), e geneticina 250 µg/mL (Gibco). Para transfecção, foi usado Reagente de Transfecção FuGENE™ 6 (Roche Molecular Biochemicals), em uma razão de reagente FuGENE™ (µL) para DNA (µg) de 4:1 (variando desde 3:1 a 6:1). Plasmídeos de cadeia leve e pesada que codificam <IGF-1R> HC* e LC* (plasmídeos DW047-pUC-HC*-IGF-1R e DW048-pUC-LC*-IGF-1R) foram expressos a partir de dois diferentes plasmídeos usando uma razão molar de plasmídeo que codifica cadeia leve para plasmídeo que codifica cadeia pesada de 1:1 (equimolar) variando desde 1:2 a 2:1, respectivamente. As células foram alimentadas no dia 3 com L-glutamina ad 4 mM, glicose [Sigma] e NAA [Gibco]. Anticorpos de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, contendo sobrenadantes de cultura de células, foram coletados a partir do dia 5 a 11 depois de transfecção por centrifugação e armazenados à -20°C. Informações gerais com respeito da expressão recombinante de imunoglobulinas humanas em, por exemplo, células de HEK293, são dadas em: Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

Exemplo 1D

[000177] Imunoprecipitação de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-

VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico

[000178] Anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, foi isolado a partir dos sobrenadantes de culturas de células (Exemplo 1C) por imunoprecipitação com contas de Proteína A Agarose (Roche). 60 µL de contas de Proteína A Agarose foram lavadas três vezes em TBS-NP40 (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet-P40, 1%). Subsequentemente, 1-15 mL de sobrenadante de cultura de células foram aplicados às contas Proteína A Agarose pré-equilibradas em TBS-NP40. Depois de incubação durante 1 h, à temperatura ambiente, as contas foram lavadas em uma coluna de filtro Ultrafree-MC (Amicon) uma vez com 0,5 mL de TBS-NP40, duas vezes com 0,5 mL 2 x com salina tamponada com fosfato (2 x PBS, Roche) e ligeiramente quatro vezes com 0,5 mL de citrato de sódio 100 mM pH 5,0. O anticorpo ligado foi eluído por adição de 35 µL de Tampão de Amostra NuPAGE® LDS (Invitrogen). Metade da amostra foi combinada com Agente Redutor de Amostra NuPAGE® ou deixada não reduzida, respectivamente, e aquecida durante 10 min à 70°C. Consequentemente, 20 µL foram aplicados a um NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE à 4-12% (Invitrogen) (com tampão MOPS para SDS-PAGE não reduzida e tampão MES com aditivo de tampão correndo com NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen) para SDS-PAGE reduzida) e tingidos com Azul de Coomassie. A Figura 10 mostra a SDS-PAGE a partir de um experimento de imunoprecipitação típico. O anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, se comporta como um anticorpo IgG1 típico com uma banda de cerca de 25 KDa correspondendo à cadeia leve LC* e uma banda de 50 KDa correspondendo à respectiva cadeia pesada HC*. No estado não reduzido, uma banda em cerca de 150 KDa pode ser observada para o anticorpo completo.

Exemplo 1E

[000179] Purificação de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1

bivalente monoespecífico e confirmação de identidade por espectrometria de massa

[000180] O anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico expresso e secretado foi purificado a partir de sobrenadantes de cultura de células filtrados por cromatografia por afinidade com Proteína A de acordo com métodos padrão conhecidos. De maneira breve, os anticorpos de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 contendo sobrenadantes de cultura de células, a partir de transfecção transitentes, foram clarificados por centrifugação (10.000 g durante 10 minutos) e filtração através de um filtro de 0,45 µm e aplicados a uma coluna Protein A HiTrap MabSelect Xtra (GE Healthcare) equilibrada com tampão de PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,4). Proteínas não ligadas foram removidas por lavagem com tampão de equilíbrio de PBS seguido por tampão de citrato de sódio 0,1 M, pH 5,5, e lavadas com PBS. A eluição de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 foi conseguida com citrato de sódio 100 mM, pH 2,8 seguida por neutralização imediata da amostra com 300 µL de Tris 2 M pH 9,0 por fração de 2 mL. A proteína agregada foi separada a partir de anticorpos monoméricos por cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna de grau de preparação HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare) em histidina 20 mM, NaCl 150 mM pH 6,0 e frações de anticorpos monoméricos foram subsequentemente concentradas usando um concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra-15. Anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 foi congelado e armazenado à -20°C ou -80°C. A integridade da troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 foi analisada por SDS-PAGE na presença e na ausência de um agente redutor e subsequente tingimento com Azul Brilhante de Coomassie, conforme descrito no Exemplo 1D. O anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 purificado se comporta como um anticorpo IgG1 típico com uma banda de cerca de 25 KDa corres-

pondendo à cadeia leve LC* e uma banda de 50 KDa correspondendo à respectiva cadeia pesada HC*. No estado não reduzido, uma banda em cerca de 150 KDa pode ser observada para o anticorpo completo. A agregação e o estado oligomérico do anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 foram analisados por cromatografia de exclusão por tamanho analítica e mostrou que o anticorpo de cruzamento de Fab purificado estava em um estado monomérico. Amostras caracterizadas foram fornecidas para análise de proteína e caracterização funcional subsequente. Espectrometria de massa por ESI confirmou a massa molecular teórica (calculada sem resíduo de lisina C-terminal da cadeia pesada e com um resíduo de piroglutamato C-terminal da cadeia leve) do anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 completamente desglicosilado como espécie principal. (Figura 22)

Exemplo 1F

[000181] Análise das propriedades de ligação a IGF-1R de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, em um ELISA de ligação a IGF-1R e por Biacore

[000182] As propriedades de ligação de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico foram avaliadas em um ensaio ELISA com o domínio extracelular de IGF-1R (ECD) conforme descrito acima. A Figura 11 mostra os resultados normalizados a partir de uma titulação de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 e anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem a partir de sobrenadantes de transfecção transientes em HEK293E por Sandwich-IgG-ELISA. Pode-se ver claramente que anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 é funcional e que mostra características de ligação comparáveis como o anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem e, portanto, parece completamente funcional. As pequenas diferenças observadas se situam dentro do erro do método e poderiam, por exemplo, resultar de pequenas variações em concentração de proteína.

[000183] Essas constatações foram corroboradas por dados de Biacore com os respectivos anticorpos purificados que mostraram que anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico tinha uma afinidade e cinética de ligação comparáveis para IGF-1R ECD como o anticorpo de tipo selvagem original dentro do erro do método. Os dados de cinética são dados na seguinte tabela:

<i>ka [1/Ms]</i>	<i>kd [1/s]</i>	<i>K(D) [M]</i>
anticorpo <IGF-1R> tipo selvagem	3,18E+06	5,521E-3 1,74E-09
anticorpo de troca		
<IGF-1R> VL-VH/CL-CH1	2,65E+06	6,258E-3 2,36E-09

Exemplo 1G

[000184] Análise das propriedades de ligação a IGF-1R de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 bivalente monoespecífico por FACS com células de I24 que superexpressam IGF-1R

[000185] A fim de confirmar a atividade de ligação de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, a ligação ao IGF-1R superexpresso na superfície de células de I24 (células de NIH3T3 que expressam IGF-1R humano recombinante, Roche) é estudada FACS. De maneira breve, 5 x 10⁵ células de I24 por tubo de FACS são incubadas com uma diluição de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 purificado e anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem, como uma referência, e incubadas sobre gelo durante 1 h. O anticorpo não ligado é removido por lavagem com 4 mL de PBS gelado (Gibco) + FCS à 2% (Gibco). Subsequentemente, as células são centrifugadas (5 min à 400 g) e o anticorpo ligado é detectado com conjugado de F(ab')₂ <hFcγ>PE (Dianova) sobre gelo durante 1 h, protegido da luz. O anticorpo de detecção não ligado é removido por lavagem com 4 mL de PBS gelado + FCS à 2%. Subsequentemente, as células são centrifugadas (5 min à 400 g), ressuspensas em 300-500 µL de PBS e anticorpo de detecção ligado é quantificado em um FACSCalibur ou FACS Canto (BD (canal

FL2, 10.000 células por aquisição). Durante o experimento, os respectivos controles de isotipo são incluídos para excluirmos quaisquer eventos de ligação não específicos. A ligação de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 e anticorpo de referência <IGF-1R> de tipo selvagem a IGF-1R em células de I24 é comparada via deslocamento dependente de concentração de intensidade de fluorescência média.

[000186] Experimentos adicionais mostraram que o anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 também reteve sua capacidade de induzir a internalização de IGF-1R em células de MCF7 e tinha somente baixa atividade de ADCC em células de DU145 se incubadas com PBMCs humanos comparáveis ao anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem.

[000187] Tomados em conjunto, os experimentos no Exemplo 1 mostraram que, usando a troca de domínio, podem ser gerados anticorpos completamente funcionais, com propriedades comparáveis aos anticorpos de tipo selvagem. Todas as propriedades funcionais foram retidas em ensaios bioquímicos e celulares. Esses anticorpos com troca de domínio formam a base para a geração de anticorpos biespecíficos conforme descrito abaixo.

Exemplos 2:

[000188] Produção, expressão, purificação e caracterização de anticorpo <ANGPT2> monoespecífico, bivalente, no qual, os domínios variáveis VL e VH são substituídos um pelo outro, e, no qual, os domínios constantes CL e CH1 são substituídos um pelo outro (aqui abreviado como anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1).

Exemplo 2A

[000189] Preparação dos plasmídeos de expressão para a variante de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1

[000190] As sequências para os domínios variáveis de cadeias pesada e leve de um anticorpo de troca Angiopoietina-2 <ANGPT2> VL-

VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, incluindo as respectivas sequências de líder descritas neste exemplo, são derivadas a partir de uma cadeia pesada de anticorpo <ANGPT2> humana (SEQ ID NO: 6) e uma cadeia leve (SEQ ID NO: 7) descritas no documento de número WO 2006/045049 e os domínios constantes pesado e leve são derivados a partir de um anticorpo humano (C-kappa e IgG1).

[000191] Os segmentos de gene que codificam a sequência de líder de anticorpo <ANGPT2>, o domínio variável de cadeia leve (VL) e o domínio constante de cadeia kappa-leve humano (CL) foram ligados e fundidos à extremidade 5' dos domínios de Fc dos domínios constantes de cadeia γ 1-pesada humana (Dobradiça-CH2-CH3). O DNA que codifica a respectiva proteína de fusão, resultando da troca de domínios VH e CH1 pelos domínios VL e CL, foi gerado por síntese de genes e é denotado por <ANGPT2> HC* (cadeia pesada*) (SEQ ID NO: 8) no que se segue.

[000192] Os segmentos de gene para a sequência de líder de anticorpo <ANGPT2>, o domínio variável de cadeia pesada (VH) e os domínios constantes de cadeia γ 1-pesada humanos (CH1) foram unidos como cadeia independente. O DNA que codifica a proteína de fusão resultando da troca de domínios de VL e de CL pelos domínios de VH e de CH1 foram gerados por síntese de genes é denotado por <ANGPT2> LC* (cadeia leve*)(SEQ ID NO: 9) no que se segue.

[000193] Os vetores de expressão respectivos são análogos àqueles descritos no Exemplo 1A. O mapa de plasmídeo do vetor de expressão de <ANGPT2> HC* de cadeia pesada*, pUC-HC*-ANGPT2>, é mostrado na Figura 12. A sequência de aminoácidos da <ANGPT2> HC* (incluindo sequência de sinal) é dada em SEQ ID NO: 8.

[000194] O mapa de plasmídeo do vetor de expressão de <ANGPT2> LC* de cadeia leve*, pUC-LC*-ANGPT2>, é mostrado na Figura 13. A sequência de aminoácidos da <ANGPT2> LC* (incluindo a

sequência de sinal) é dada em SEQ ID NO: 9. Os plasmídeos pUC-HC*-ANGPT2> e pUC-LC*-ANGPT2> podem ser usados para transfecção transiente e estável, por exemplo, em células de HEK293-F, HEK293 EBNA ou de CHO (sistema de 2 vetores).

[000195] A fim de se conseguir níveis de expressão mais elevados em expressões transientes em células de HEK293 EBNA, o cassete de expressão de <ANGPT2> HC* pode ser subclonado via sítios de *Ascl*, *SgrAI*, e o cassete de expressão de <ANGPT2> LC* pode ser subclonado via sítios de *Sse8387I* e de *FseI* no vetor de expressão 4700 pUC-Hyg_OriP, conforme descrito no Exemplo 1A. Unidades de transcrição de cadeias pesada e leve podem ou ser subclonadas em dois vetores 4700-pUC-Hyg-OriP independentes para cotransfecção (sistema de 2 vetores) ou elas podem ser clonadas em um vetor 4700-pUC-Hyg-OriP comum (sistema de 1 vetor) para transfecções transiente ou estável subsequentes com os vetores resultantes, via sítios de *FseI*, de *SgrAI*, de *Sse8387I* e de *Ascl*.

[000196] O anticorpo <ANGPT2> de tipo selvagem foi clonado nos plasmídeos SB04-pUC-HC-ANGPT2 (SEQ ID NO: 6) e SB06-pUC-LC-ANGPT2 (SEQ ID NO: 7), que são análogos aos vetores descritos neste e no Exemplo 1A prévio. As unidades de transcrição para as cadeias de pesada e leve de anticorpo <ANGPT2> de tipo selvagem foram subclonadas a partir de plasmídeos SB04-pUC-HC-ANGPT2 e SB06-pUC-LC-ANGPT2, vetores básicos via sítios de *FseI*, de *SgrAI*, de *Sse8387I* e de *Ascl* em plasmídeos SB07-pUC-Hyg-OriP-HC-ANGPT2 e SB09-pUC-Hyg-OriP-LC-ANGPT2, a fim de se conseguir maiores níveis de expressão transientes em células de HEK293E. Por razões comparativas e para experimentos de coexpressão (ver o Exemplo 3), o anticorpo <ANGPT2> de tipo selvagem foi ou (co-) expresso de maneira transiente a partir dos plasmídeos SB07-pUC-Hyg-OriP-HC-ANGPT2 e SB09-pUC-Hyg-OriP-LC-ANGPT2 ou a partir dos

plasmídeos SB04-pUC-HC-ANGPT2 e SB06-pUC-LC-ANGPT2.

Exemplo 2B

[000197] Preparação dos plasmídeos de expressão de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico

[000198] Os genes de fusão de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 (genes de fusão de HC* e de LC*) compreendendo as sequências de Fab trocadas do anticorpo <ANGPT2> de tipo selvagem foram montadas com métodos e técnicas recombinantes conhecidos por conexão dos segmentos de ácidos nucleicos correspondentes.

[000199] As sequências de ácidos nucleicos que codificam as HC* e LC* de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 foram, cada uma, sintetizadas por síntese química e subsequentemente clonadas em um pPCRScripT (Stratagene) com base em vetor de clonagem pGA4 em Geneart (Regensburg, Alemanha). O cassete de expressão que codifica a HC* de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 foi ligado ao respectivo plasmídeo de E. coli via sítios de restrição de PstI e de EcoNI, resultando no vetor final pUC-HC*-<ANGPT2>; o cassete de expressão que codifica a respectiva LC* de <ANGPT2> foi ligado ao respectivo plasmídeo de E. coli via sítios de restrição de PvuII e de FseI, resultando no vetor final pUC-LC*-<ANGPT2>. As sequências de ácidos nucleicos subclonadas foram verificadas por sequenciamento de DNA. Para transfeções transiente e estável, quantidades maiores dos plasmídeos foram preparadas por preparação de plasmídeo a partir de culturas de E. coli transformadas (Nucleobond AX, Macherey-Nagel)

Exemplo 2C

[000200] Expressão transiente de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, em células de HEK293 EBNA

[000201] Anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 recombinante foi expresso por cotransfecção transiente de plasmídeos pUC-HC*-

ANGPT2> e pUC-LC*-ANGPT2> em células de HEK293-EBNA que crescem de maneira aderente (linhagem 293 de células de rim embrionárias humanas que expressam o antígeno nuclear de Vírus de Epstein-Barr; número de depósito no American Type Culture Collection ATCC # CRL-10852, Lote 959 218) cultivadas em DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco) suplementado com Ultra Low IgG FCS à 10% (soro de bezerro bovino, Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco), e geneticina 250 µg/mL (Gibco). Para transfecção, Reagente de Transfecção FuGENE™ 6 (Roche Molecular Biochemicals) foi usada uma razão de reagente FuGENE™ (µL) para DNA (µg) de 4:1 (variando desde 3:1 a 6:1). Plasmídeos de cadeias leve e pesada que codificam HC* e LC* de <ANGPT2> (plasmídeos pUC-HC*-ANGPT2> e pUC-LC*-ANGPT2>) foram expressos a partir de dois plasmídeos diferentes usando uma razão molar de plasmídeo que codifica cadeia leve para plasmídeos que codifica cadeia pesada de 1:1 (equimolar) variando desde 1:2 a 2:1, respectivamente. As células foram alimentadas no dia 3 com L-glutamina ad 4 mM, glicose [Sigma] e NAA [Gibco]. Anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 contendo sobrenadantes de cultura de células foram coletadas a partir do dia 5 a 11 depois de transfecção por centrifugação e armazenadas à -20°C. Informações gerais com respeito à expressão recombinante de imunoglobulinas humanas em, por exemplo, células de HEK293 são dadas em: Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

Exemplo 2D

[000202] Purificação de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, e confirmação de identidade por espectrometria de massa

[000203] O anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, expresso e secretado foi purificado a partir de sobrenadantes de cultura de células filtrados por cromatografia de afinidade

por Proteína A de acordo com métodos padrão conhecidos. De maneira breve, os anticorpos de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, contendo sobrenadantes de cultura de células a partir de transfecções transientes, foram clarificados por centrifugação (10.000 g durante 10 minutos) e filtração através de um filtro de 0,45 µm, e aplicados a uma coluna Protein A HiTrap MabSelect Xtra (GE Healthcare) equilibrada com tampão de PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,4). As proteínas não ligadas são removidas por lavagem com tampão de equilíbrio de PBS seguido por tampão de citrato de sódio 0,1 M, pH 5,5 e lavadas com PBS. A eluição de anticorpo de troca VL-VH/CL-CH1 foi conseguida com citrato de sódio 100 mM, pH 2,8 seguido por neutralização imediata da amostra com 300 µL de Tris 2 M pH 9,0 por fração de 2 mL. A proteína agregada foi separada a partir dos anticorpos monoméricos por cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna de grau de preparação HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare) em histidina 20 mM, NaCl 150 mM pH 6,0, e as frações de anticorpo monoméricas foram subsequentemente concentradas usando um concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra-15. O anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 foi congelado e armazenado à -20°C ou -80°C. A integridade do anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 foi analisada por SDS-PAGE na presença e na ausência de um agente redutor e subsequente tingimento com Azul Brilhante de Coomassie (Figura 23-A). A agregação e o estado oligomérico do anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 foram analisados por cromatografia de exclusão por tamanho analítica (Figura 23-B). As amostras caracterizadas foram fornecidas para análise de proteínas e caracterização funcional subsequentes. A espectrometria de massa por ESI confirmou a massa molecular teórica do anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 completamente desglucosilado como espécie principal. Nenhuma contaminação por proteí-

nas semelhantes a anticorpos pôde ser observada.

Exemplo 2F

[000204] Análise das propriedades de ligação a <ANGPT2> de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, em um ELISA de ligação a <ANGPT2> e por Biacore

[000205] As propriedades de ligação de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, foram avaliadas em um ensaio ELISA com proteína ANGPT2>-His de comprimento completo (R&D Systems), conforme descrito acima. A Figura 24 mostra os resultados a partir de uma titulação de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 purificado e de anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem, no ELISA de ligação de sanduíche. Pode ser claramente visto que o anticorpo de troca <ANGPT> VL-VH/CL-CH1 é funcional e mostra propriedades de ligação comparáveis ao anticorpo <ANGPT2> de tipo selvagem e, portanto, parece completamente funcional. As pequenas diferenças observadas se situam dentro do erro do método e poderiam, por exemplo, resultar de pequenas variações em concentração de proteína.

[000206] Essas constatações foram corroboradas por dados de Biacore com os respectivos anticorpos purificados, que mostraram que o anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, com um valor de KD de 13 pM, tinha uma afinidade comparável e cinética de ligação para ANGPT2 dentro do erro do método, como o anticorpo <ANGPT2> de tipo selvagem original, com um valor de KD de 12 pM (Figura 25)

Exemplo 2G

[000207] Análise das propriedades funcionais de anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico

[000208] A fim de mostrar que o anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico tem propriedades funcionais

comparáveis ao anticorpo <ANGPT2> de tipo selvagem original, os dois anticorpos foram comparados em relação à sua capacidade de interferirem com a ligação de ANGPT2 a seu domínio extracelular de receptor de Tie2 em um ensaio de ligação ELISA, conforme descrito acima. No respectivo ELISA de ligação, anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 tinha um valor de EC50 de 135 ng/mL para interferência com ligação a ANGPT2 humano, o qual é comparável ao valor de EC50 de 145 nM para o anticorpo <ANGPT2> de tipo selvagem original. Esses dados foram confirmados em um ensaio de competição de ligação a ligante celular com células de HEK293 que superexpressam Tie2 em sua superfície, onde o anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 tinha um valor de EC50 de 225 ng/ml para interferência com ligação de ANGPT2 humano, o qual é comparável ao valor de EC50 de 205 nM para o anticorpo <ANGPT2> de tipo selvagem original (dados não mostrados).

[000209] Tomados em conjunto, os experimentos no Exemplo 2 mostraram que, usando a troca de domínios, podem ser gerados anticorpos completamente funcionais com propriedades comparáveis aos anticorpos de tipo selvagem. Todas de propriedades funcionais foram re- tidas em ensaios bioquímicos e celulares. Esses anticorpos com troca de domínios formam a base para a geração de anticorpos biespecíficos, conforme descrito abaixo nos Exemplos 3 e 4.

Exemplo 2H

[000210] Uma análise de modelagem molecular dos anticorpos com troca de domínios revelou que o espaço estérico entre os domínios trocados poderia se de dobra limitante. Portanto, construtos foram projetados, nos quais um resíduo de glicina adicional foi introduzido no terminal C dos domínios trocados do Fab, por exemplo, entre a região que conecta VL-CL e dobradiça ou na extremidade de domínio VH-CH1 livre, respectivamente. O respectivo anticorpo bivalente, mono-

pecífico, é denotado como anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G) no que se segue.

[000211] As sequências para os domínios variáveis de cadeias pesada e leve de um anticorpo de troca Angiopoietina-2 <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 bivalente, monoespecífico, incluindo as respectivas sequência de líder descritas neste Exemplo, são derivadas a partir de uma cadeia pesada (SEQ ID NO: 6) e de uma cadeia leve (SEQ ID NO: 7) de anticorpo <ANGPT2> humano, descritos no documento de número WO 2006/045049, e os domínios constantes de cadeias pesada e leve são derivados a partir de um anticorpo humano (C-kappa e IgG1).

[000212] Os segmentos de gene que codificam a sequência de líder de anticorpo <ANGPT2>, o domínio variável de cadeia leve (VL) e o domínio constante de cadeia kappa-leve humano (CL) foram ligados e fundidos à extremidade 5' dos domínios Fc dos domínios constantes de cadeia γ 1-pesada humanos (Dobradiça-CH2-CH3) e incluindo um resíduo de glicina adicional. O DNA, que codifica a respectiva proteína de fusão, resultando da troca dos domínios de VH e de CH1 pelos domínios de VL e de CL, foi gerado por síntese de gene e denotado por <ANGPT2> HC(G)* (cadeia pesada*) (SEQ ID NO: 17) no que se segue.

[000213] Os segmentos de genes para a sequência de líder de anticorpo <ANGPT2>, o domínio variável de cadeia pesada (VH) e os domínios constantes de cadeia γ 1-pesada humanos (CH1) foram unidos como cadeia independente, incluindo um resíduo de glicina adicional. O DNA que codifica a respectiva proteína de fusão, resultando da troca de domínios de VL e de CL pelos domínios de VH e de CH1, foi gerado por síntese de genes e é denotado por <ANGPT2> LC(G)* (cadeia leve*) (SEQ ID NO: 18) no que se segue.

[000214] Os respectivos vetores de expressão são análogos àqueles

descritos nos Exemplos 2 acima. Subsequentemente, esses vetores de expressão foram usados para a coexpressão transiente do respectivo anticorpo <ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G) com troca de domínios em células HEK293-F. O respectivo anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G) foi purificado a partir de expressão transiente, conforme descrito acima e analisado por SDS-PAGE, cromatografia de exclusão por tamanho e espectrometria de massa do respectivo anticorpo. Os rendimentos de expressão de proteína foram bons e similares aos rendimentos de expressão obtidos para o anticorpo de troca VL-VH/CL-CH1 convencional descrito acima. Todas as propriedades investigadas não mostraram constatações inesperadas e foram essencialmente comparáveis ao respectivo anticorpo de tipo selvagem <ANGPT2. A Figura 31 demonstra as propriedades virtualmente comparáveis do anticorpo de tipo selvagem <ANGPT2> e o anticorpo <ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G) em um ensaio de ligação com a ANGPT2. dentro do erro do método, ambos os anticorpos exibiram uma afinidade de ligação comparável para ANGPT2 humano com valores de KD estimados (média a partir de duas determinações) de cerca de 38 pM para o anticorpo de tipo selvagem <ANGPT2> e cerca de 45 pM para o anticorpo <ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G).

<i>ka [1/Ms]</i>	<i>kd [1/s]</i>	<i>K(D) [M]</i>
anticorpo <ANGPT2>		
de tipo selvagem	5,26 E+05	2,0 E-4 3,79 E-10
Anticorpo de troca		
<ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G)	5,29 E+06	2,358 E-3 4,45 E-09

Exemplos 3

[000215] Expressão de anticorpo <ANGPT2-IGF-1R> bivalente, bi-específico, em que, na cadeia pesada e leve se ligando de maneira específica a IGF-1R, os domínios variáveis de VL e de VH são substi-

tuídos um pelo outro, e os domínios constantes de CL e de CH1 são substituídos um pelo outro (aqui abreviado como anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1)

Exemplo 3A

[000216] Coexpressão transiente de anticorpo de tipo selvagem <ANGPT2> e anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 em células de HEK293 EBNA para fornecer anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico.

[000217] A fim de gerar um <ANGPT2> que reconhece anticorpo biespecífico funcional via a região de Fab de tipo selvagem <ANGPT2> em um lado e IGF-1R via a região de Fab de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 no outro lado, os dois plasmídeos de expressão, que codificam o anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 (Exemplo 1A), foram coexpressos com dois plasmídeos de expressão que codificam o anticorpo de tipo selvagem <ANGPT2>. (Exemplo 2A). Assumindo uma associação estatística de cadeias pesadas de tipo selvagem HC e cadeias pesadas de cruzamento de Fab HC*, isto resultou na geração de anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico e bivalente. Sob a assunção de que ambos os anticorpos são igualmente bem expressos e sem levar em consideração subprodutos, isto deve ter resultado e em uma razão 1:2:1 dos três produtos principais anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 monoespecífico, anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico e anticorpo de tipo selvagem <ANGPT2>. Em adição, vários subprodutos, tais como dímeros LC-LC* (fragmento de Fab2), dímeros HC-HC* (anticorpo monovalente) e dímeros HC*-LC podem ser esperados.

[000218] Em contraste, quando da coexpressão, os dois plasmídeos de expressão que codificam o anticorpo de tipo selvagem <IGF-1R> (Exemplo 1A) e os dois plasmídeos de expressão que codificam o an-

ticorpo de tipo selvagem <ANGPT2> como uma referência, somente uma pequena proporção de anticorpo <IGF-1R-ANGPT2> biespecífico funcional será gerada devido à associação estatística das cadeias pesadas, mas a associação não guiada de cadeias leves com ambas as cadeias pesadas a partir dos anticorpos <IGF-1R> e <ANGPT2> de tipo selvagem.

[000219] Para gerar a mistura dos produtos principais A) anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 monoespecífico, B) anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico e C) anticorpos de tipo selvagem <ANGPT2>, os quatro plasmídeos DW047-pUC-HC*-IGF-1R e DW048-pUC-LC*-IGF-1R e ou os plasmídeos SB07-pUC-Hyg-OriP-HC-ANGPT2 e SB09-pUC-Hyg-OriP-LC-ANGPT2 (ou plasmídeos SB04-pUC-HC-ANGPT2 e SB06-pUC-LC-ANGPT2) foram co-transfectados de maneira transiente em células de HEK293-EBNA que crescem de maneira aderente (linhagem 293 de células de rim embrionárias humanas que expressam o antígeno nuclear Vírus de Epstein-Barr; número de depósito no American Type Culture Collection ATCC # CRL-10852, Lote 959 218) cultivadas em DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco) suplementado com Ultra Low IgG FCS a 10% (soro de bezerro fetal, Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco), e geneticina 250 µg/mL (Gibco). Para transfecção, Reagente de Transfecção FuGENE® 6 (Roche Molecular Biochemicals) foi usado em uma razão de reagente FuGENE® (µL) para DNA (µg) de 4:1 (variando desde 3:1 a 6:1). Plasmídeos de cadeias leve e pesada que codificam <IGF-1R> HC* e LC* (plasmídeos DW047-pUC-HC*-IGF-1R e DW048-pUC-LC*-IGF-1R) e <ANGPT2> HC e LC (plasmídeos SB07-pUC-Hyg-OriP-HC-ANGPT2 e SB09-pUC-Hyg-OriP-LC-ANGPT2 ou plasmídeos SB04-pUC-HC-ANGPT2 e SB06-pUC-LC-ANGPT2, respectivamente) foram expressos a partir de quatro plasmídeos diferentes usando uma razão molar de cadeias leves para cadeias pesadas

que codificam plasmídeos de 1:1 (equimolar). As células foram alimentadas no dia 3 com L-glutamina ad 4 mM, glicose [Sigma] e NAA [Gibco]. O sobrenadante coletado continha uma mistura dos produtos principais A) anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 monoespecífico, B) anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico e C) anticorpos de tipo selvagem <ANGPT2> e é denotado como "mistura de troca VL-VH/CL-CH1 biespecífica". A mistura de troca VL-VH/CL-CH1 biespecífica contendo sobrenadantes de cultura de células, foram coletadas a partir do dia 5 até 11 depois de transfecção por centrifugação e armazenadas à -20°C.

[000220] Por razões comparativas, o anticorpo <IGF-1R> tipo selvagem foi coexpresso de maneira transiente a partir de plasmídeos de HC e de LC (4842-pUC-LC-IGF-1R e 4843-pUC-HC-IGF-1R, Exemplo 1A) em conjunto com os plasmídeos de HC e de LC de <ANGPT2> de tipo selvagem (SB07-pUC-Hyg-OriP-HC-ANGPT2 e SB09-pUC-Hyg-OriP-LC-ANGPT2 ou SB04-pUC-HC-ANGPT2 e SB06-pUC-LC-ANGPT2, respectivamente). As células foram alimentadas no dia 3 com L-glutamina ad 4 mM, glicose [Sigma] e NAA [Gibco]. O sobrenadante coletado continha uma mistura de diferentes variantes de anticorpos de tipo selvagem <IGF-1R> e <ANGPT2> ou monoespecíficos, biespecíficos ou incompetentes para ligação, devido à associação não guiada de cadeias leves com ambas as cadeias pesadas a partir dos anticorpos de tipo selvagem <IGF-1R> e <ANGPT2> resultando em associação de cadeia leve errada, e é denotada como "mistura de tipo selvagem". Mistura de tipo selvagem, contendo sobrenadantes de cultura de células, foram coletadas a partir do dia 5 a 11 depois de transfecção por centrifugação e armazenados à -20°C.

[000221] Como o anticorpo de tipo selvagem <ANGPT2> mostra rendimentos de expressão transiente significativamente mais elevados do que os anticorpos de cruzamento <IGF-1R> de tipo selvagem e

<IGF-1R> Fab, a razão dos plasmídeos de anticorpo de tipo selvagem <ANGPT2> e plasmídeos de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 foi deslocada em favor da expressão de anticorpos de tipo selvagem <ANGPT2>. A razão de plasmídeo teve que ser adaptada durante futuros experimentos para permitir uma expressão igual de ambas as especificidades, resultando em uma distribuição mais uniforme dos diferentes anticorpos.

Exemplo 3B

[000222] Imunoprecipitação de anticorpos de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico

[000223] Uma mistura dos produtos principais A) anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 monoespecífico, B) anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico e C) anticorpos de tipo selvagem <ANGPT2> ("mistura de troca VL-VH/CL-CH1"), foi isolada a partir de sobrenadantes de cultura de células (Exemplo 3A) por imunoprecipitação com contas de Proteína A Agarose (Roche). 60 µL de contas de Proteína A Agarose foram lavadas três vezes em TBS-NP40 (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet-P40 à 1%). Subsequentemente, 1 -15 mL de sobrenadante de cultura de células foram aplicados às contas de Proteína A Agarose pré-equilibradas em TBS-NP40. Depois de incubação durante 1 h, à temperatura ambiente, as contas foram lavadas em uma coluna de filtro Ultrafree-MC (Amicon) uma vez com 0,5 mL de TBS-NP40, duas vezes com 0,5 mL 2 x de salina tamponada com fosfato (2 x PBS, Roche) e ligeiramente quatro vezes com 0,5 mL de citrato de sódio 100 mM pH 5,0. O anticorpo ligado foi eluído por eluição de 35 µL de Tampão de Amostra NuPAGE® LDS (Invitrogen). Metade da amostra foi combinada com Agente Redutor de Amostra NuPAGE® ou deixada não reduzida, respectivamente, e aquecida durante 10 min à 70°C. Consequentemente, 20 µL foram aplicados a uma NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE à 4-12%

(Invitrogen) (com tampão MOPS para SDS-PAGE não reduzida e tampão MES e aditivo de tampão correndo com Antioxidante NuPAGE® (Invitrogen) para SDS-PAGE reduzida) e tingidos com Azul de Coomassie. Na SDS-PAGE, nenhuma diferença entre as três espécies de anticorpos pôde ser vista. Todos os anticorpos se comportaram como anticorpos IgG1 típicos com uma banda de cerca de 25 KDa correspondendo às cadeias leves e uma banda de 50 KDa correspondendo às respectivas cadeias pesadas. No estado não reduzido, uma banda em cerca de 150 KDa pôde ser observada para o anticorpo completo. Portanto, a fim de provar a presença de anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 funcional biespecífico, a mistura de cruzamento das três espécies de anticorpos foi purificada (Exemplo 3C) e um ensaio de ligação em ponte de FACS celular foi projetado (Exemplo 3D).

Exemplo 3C

[000224] Purificação de anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico

[000225] A mistura dos produtos principais A) anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 monoespecífico, B) anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico e C) anticorpos de tipo selvagem <ANGPT2> ("Mistura de troca VL-VH/CL-CH1 biespecífica") a partir do Exemplo 3A, foi purificada a partir dos sobrenadantes de cultura de células filtrados por cromatografia por afinidade com Proteína A seguida por cromatografia de exclusão por tamanho de acordo com métodos padrão conhecidos. De maneira breve, a mistura de anticorpos contendo sobrenadantes de cultura de células a partir de transfeções transientes de plasmídeos DW047-pUC-HC*-IGF-1R e DW048-pUC-LC*-IGF-1R e SB07-pUC-Hyg-OriP-HC-ANGPT2 e SB09-pUC-Hyg-OriP-LC-ANGPT2 foram clarificados por centrifugação (10.000 g durante 10 minutos) e filtração através de um filtro de 0,45

µm e aplicados a uma coluna de Protein A HiTrap MabSelect Xtra (GE Healthcare) equilibrada com tampão de PBS (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,4). As proteínas não ligadas foram removidas por lavagem com tampão de equilíbrio de PBS seguido por tampão de citrato de sódio 0,1 M, pH 5,5 e lavadas com PBS. A eluição de anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico foi alcançada com citrato de sódio 100 mM, pH 2,8, seguida por neutralização imediata da amostra com 300 µL de Tris 2 M pH 9,0 por fração de 2 mL. A proteína agregada foi separada a partir de anticorpos monoméricos por cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna de grau de preparação HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare) em histidina 20 mM, NaCl 150 mM pH 6,0, e as frações de anticorpos monoméricos foram subsequentemente concentradas usando um concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra-15. A mistura de troca VL-VH/CL-CH1 foi congelada e armazenada à -20°C ou -80°C. A integridade da espécie de anticorpo foi analisada por SDS-PAGE (ver a Figura 14) na presença e na ausência de um agente redutor e tingimento subsequente com Azul Brilhante de Coomassie conforme descrito no Exemplo 1D. A mistura de anticorpos se comportou como anticorpos IgG1 típicos com uma banda de cerca de 25 KDa correspondendo às cadeias leves e uma banda de 50 KDa correspondendo às respectivas cadeias pesadas. No estado não reduzido, uma banda em cerca de 150 KDa pôde ser observada para o anticorpo completo. Nenhum subproduto óbvio, tais como anticorpos monovalentes, etc, foram visíveis a partir da SDS-PAGE, depois de purificação com Proteína A. A agregação e o estado oligomérico do anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico foram analisados por cromatografia de exclusão por tamanho analítica e mostrou que as espécies de anticorpo purificadas estavam em um estado monomérico. Amostras caracterizadas foram fornecidas para aná-

lise de proteínas e caracterização funcional subsequentes. A fim de provar a presença de anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico funcional, a mistura das três espécies de anticorpos foi analisada em um ensaio de ligação em ponte de FACS celular (Exemplo 3D).

[000226] Por razões comparativas, a mistura de tipo selvagem resultando a partir da coexpressão de plasmídeos de HC e de LC de anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem (4842-pUC-LC-IGF-1R e 4843-pUC-HC-IGF-1R, Exemplo 1A) em conjunto com os plasmídeos de HC e de LC <ANGPT2> de tipo selvagem (SB07-pUC-Hyg-OriP-HC-ANGPT2 e SB09-pUC-Hyg-OriP-LC-ANGPT2) foi purificado como uma referência a partir dos sobrenadantes de cultura de células filtrados por cromatografia por afinidade com Proteína A seguida por cromatografia de exclusão por tamanho de acordo com o procedimento descrito.

Exemplo 3D

[000227] Detecção de anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico funcional em um ensaio de ligação em ponte de FACS celular em células que expressam I24 IGF-1R

[000228] A fim de confirmar a presença de anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico funcional na "mistura de troca VL-VH/CL-CH1 biespecífica" dos produtos principais A) anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 monoespecífico, B) anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico e C) anticorpos de tipo selvagem <ANGPT2> a partir da coexpressão transiente descrita no Exemplo 3A, um ensaio de ligação em ponte FACS IGF-1R-ANGPT2 de FACS celular em células de I24 (células de NIH3T3 que expressam IGF-1R humano recombinante, Roche) foi realizado. O princípio de ensaio está retratado na Figura 15. Um anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico que está presente nos sobrenadantes (Exemplo 3A) ou na mistura de anticorpo purificado

(Exemplo 3C), respectivamente; é capaz de se ligar ao IGF-1R em células de I24 e ao ANGPT2 simultaneamente; e, portanto, ligará em ponte seus dois antígenos alvo com as duas regiões de Fab opostas.

[000229] De maneira breve, 5×10^5 células de I24 por tubo de FACS foram incubadas com ou 50 μ L de sobrenadantes de cultura de células não diluído ou com uma diluição para 160 μ g/mL de mistura de anticorpos purificada total e incubadas sobre gelo durante 1 h. No primeiro caso, as células foram incubadas com A) sobrenadantes de cultura de células a partir da coexpressão dos plasmídeos de <IGF-1R> de cruzamento (DW047-pUC-HC*-IGF-1R e DW048-pUC-LC*-IGF-1R) com os plasmídeos de <ANGPT2> de tipo selvagem (SB04-pUC-HC-ANGPT2> e SB06-pUC-LC-ANGPT2) denotados como "mistura de troca VL-VH/CL-CH1 biespecífica" ou B) com sobrenadantes de cultura de células a partir da coexpressão dos plasmídeos <IGF-1R> de tipo selvagem (4842-pUC-LC-IGF-1R e 4843-pUC-HC-IGF-1R) com os plasmídeos <ANGPT2> de tipo selvagem (SB04-pUC-HC-ANGPT2> e SB06-pUC-LC-ANGPT2) denotados como "mistura de tipo selvagem" (Figura 16). No segundo caso, a respectiva mistura de anticorpos purificada ou a partir de mistura de troca VL-VH/CL-CH1 biespecífica ou a partir de mistura de tipo selvagem foi aplicada às células de I24 (Exemplo 3C, Figura 17). O anticorpo não ligado foi removido por lavagem com 4 mL de PBS gelado (Gibco) + FCS à 2% (Gibco), as células foram centrifugadas (5 min à 400 g) e o anticorpo biespecífico ligado foi detectado com 50 μ L de Angiopietina-2 humana 2 μ g/mL (ANGPT2) (R&D Systems) durante 1 h sobre gelo. Subsequentemente, Angiopietina-2 (ANGPT2) não ligada foi removida por lavagem uma vez (Figura 16) ou duas vezes (Figura 17) com 4 mL de PBS gelado (Gibco) + FCS à 2% (Gibco), as células foram centrifugadas (5 min à 400 g) e Angiopietina-2 ligada foi detectada com 50 μ L de anticorpo <Ang-2>mIgG1-Biotina 5 μ g/mL (BAM0981, R&D Systems) durante 45

min sobre gelo; alternativamente, as células foram incubadas com 50 µL de controle de mIgG1-Biotina-Isotipo 5 µg/mL (R&D Systems). Anticorpo de detecção não ligado foi removido por lavagem com 4 mL de PBS gelado (Gibco) + FCS à 2% (Gibco), as células foram centrifugadas (5 min à 400 g) e anticorpo de detecção ligado foi detectado com 50 µL de conjugado de Estreptavidina-PE 1:400 (Invitrogen/Zymed) durante 45 min sobre gelo protegido contra luz. O conjugado de Estreptavidina-PE foi removido por lavagem com 4 mL de PBS gelado + FCS à 2%. Subsequentemente, as células foram centrifugadas (5 min à 400 g), ressuspensas em 300-500 µL de PBS e o conjugado de Estreptavidina-PE ligado foi quantificado em um FACSCalibur ou FACS Canto (BD (canal FL2, 10.000 células por aquisição). Durante o experimento, os respectivos controles de isotipo foram incluídos para excluir quaisquer eventos de ligação não específicos. Em adição, anticorpos IgG1 bivalentes, monoespecíficos, purificados <IGF-1R> e <ANGPT2> foram incluídos como controles.

[000230] A Figura 16 mostra os resultados a partir do ensaio de ligação em ponte de FACS celular em células I24 com sobrenadantes de cultura de células; a Figura 17 mostra os resultados com a mistura de anticorpo purificado. Em ambos os casos, nos quais a tecnologia de troca VL-VH/CL-CH1 foi aplicada, a incubação com "mistura de troca VL-VH/CL-CH1 biespecífica" de anticorpo de sobrenadante ou purificado, a partir da coexpressão de um anticorpo de troca VL-VH/CL-CH1 com um anticorpo de tipo selvagem, resultou em um deslocamento significativo de fluorescência indicando a presença de um anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico funcional, que é capaz de se ligar ao IGF-1R em células de I24 e ao ANGPT2 simultaneamente; e, portanto, liga em ponte seus dois antígenos alvo com as duas regiões de Fab opostas. Ao contrário disso e conforme previsto para a coexpressão de dois anticorpos de tipo selvagem, so-

mente uma proporção muito pequena de anticorpos biespecíficos funcionais é formada, resultando em somente um leve deslocamento em fluorescência no ensaio de ligação em ponte de FACS, quando o sobrenadante de cultura de células ou a "mistura de tipo selvagem" de anticorpos purificados a partir da coexpressão dos plasmídeos <IGF-1R> de tipo selvagem com os plasmídeos <ANGPT2> de tipo selvagem, foi aplicada indicando a presença de somente uma pequena fração de anticorpo de tipo selvagem <IGF-1R-ANGPT2> biespecífico funcional.

[000231] Esses resultados mostram que, por coexpressão de plasmídeos de troca VL-VH/CL-CH1, que codificam um anticorpo <IGF-1R> com plasmídeos de tipo selvagem, que codificam um anticorpo <ANGPT2>, anticorpo de troca <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 biespecífico funcional, que reconhece os dois alvos diferentes simultaneamente, podem ser facilmente gerados. Ao contrário, a coexpressão de dois plasmídeos de tipo selvagem que codificam anticorpos <IGF-1R> e <ANGPT2>, resulta em uma elevada complexidade dos anticorpos formados e somente uma pequena proporção de anticorpo de tipo selvagem <IGF-1R-ANGPT2> biespecífico funcional.

Exemplo 4

[000232] **Geração de anticorpo de troca <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 biespecífico, bivalente, com domínios de CH3 modificados (botões em cavidades) (Figura 30)**

[000233] Conforme mostrado no exemplo acima, a coexpressão de plasmídeos que codificam anticorpos de tipo selvagem com plasmídeos que codificam anticorpos de troca VL-VH/CL-CH1 resulta na geração de uma mistura de troca de VL-VH/CL-CH1 biespecífica dos produtos principais A) anticorpo de troca VL-VH/CL-CH1 monoespecífico, B) anticorpo de troca VL-VH/CL-CH1 biespecífico e C) anticorpo de tipo selvagem. Para aperfeiçoar ulteriormente o rendimento do anti-

corpo de troca <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 biespecífico, a tecnologia de botões em cavidades foi aplicada à coexpressão de um anticorpo de troca <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 e de um anticorpo <VEGF> de tipo selvagem para estimular a heterodimerização das respectivas cadeias pesadas não modificada e modificada (via HC e HC*) e para obter uma preparação de anticorpo biespecífico mais homogênea e funcional. Nesse exemplo, foi gerado um anticorpo biespecífico que reconhece VEGF e ANGPT2 simultaneamente, com base no anticorpo de tipo selvagem <VEGF>, G6-31, e no anticorpo VL-VH/CL-CH1 troca <ANGPT2>, Mab536, conforme descritos acima.

[000234] Conforme descrito acima, os segmentos de genes que codificam a sequência de líder de anticorpo <ANGPT2>, domínio variável de cadeia leve (VL) e o domínio constante de cadeia kappa-leve humana (CL) foram unidos e fundidos à extremidade 5' dos domínios de Fc dos domínios constantes de cadeia γ 1-pesada humanos (Dobradiça-CH2-CH3). O DNA que codifica a respectiva proteína de fusão resultando da troca de domínios de VH e de CH1 por domínios de VL e de CL, foi gerado por síntese de genes e é denotado por <ANGPT2> HC* (cadeia pesada*) (SEQ ID NO: 8).

[000235] Os segmentos de genes para a sequência de líder de anticorpo <ANGPT2>, domínio variável de cadeia pesada (VH) e os domínios constantes de cadeia γ 1-pesada humanos (CH1) foram unidos como cadeia independente. O DNA que codifica a respectiva proteína de fusão, que resulta da troca de domínios de VL e de CL por domínios de VH e de CH1, foi gerado por síntese de genes e é denotado por <ANGPT2> LC* (cadeia leve*) (SEQ ID NO: 9) no que se segue.

[000236] As sequências para os domínios variáveis de cadeias pesada e leve de tipo selvagem do anticorpo de tipo selvagem <VEGF> bivalente, monoespecífico, G6-31, incluindo as respectivas sequências de líder descritas neste Exemplo, são derivadas a partir dos domínios

variáveis de cadeia pesada, G6-31, de anticorpo <VEGF> humana de SEQ ID NO: 12, e os domínios variáveis de cadeia leve de SEQ ID NO: 13, que são ambos derivados a partir do anticorpo anti-VEGF derivado de exibição de fago humano, G6-31, que é descrito em detalhes em Liang et al., J Biol Chem. 2006 Jan 13; 281(2):951-61 e em US 2007/0141065 e os domínios constantes de cadeias pesada e leve são derivados a partir de um anticorpo humano (C-kappa e IgG1).

[000237] Para essa finalidade, o plasmídeo que codifica a cadeia pesada do anticorpo de tipo selvagem <VEGF>, G6-31, foi modificado por introdução de um segmento de gene de CH3, gerado por síntese de genes e que codifica o resíduo de botões T366W da SEQ ID NO: 10, no domínio de CH3 da respectiva cadeia pesada de G6-31 de anticorpo de tipo selvagem <VEGF>, resultando em SEQ ID NO: 16; ao contrário, o plasmídeo que codifica a cadeia pesada* HC* do anticorpo VL-VH/CL-CH1 troca <ANGPT2>, Mab536, foi modificado por introdução de um segmento de gene de CH3, gerado por síntese de genes e que codifica os resíduos de cavidades T366S, L368A, Y407V da SEQ ID NO: 11, no domínio de CH3 da respectiva cadeia pesada* HC* de Mab536 de anticorpo VL-VH/CL-CH1 troca <ANGPT2>, resultando em SEQ ID NO: 15. Nesse caso, os plasmídeos que codificam o anticorpo de botões <VEGF> de tipo selvagem G6-31 foram organizados como vetores genômicos, enquanto que os plasmídeos para o anticorpo VL-VH/CL-CH1 troca <ANGPT2> Mab536 foram organizados como vetores de ÍntronA-cDNA.

[000238] Subsequentemente, os respectivos quatro plasmídeos que codificam cadeia pesada HC <VEGF> G6-31 com SEQ ID NO: 16 de botão e cadeia leve LC de tipo selvagem de SEQ ID NO: 14, e a cadeia pesada* HC* de VL-VH/CL-CH1 troca <ANGPT> modificada, com SEQ ID NO: 15 de cavidade e cadeia leve* LC* modificada (SEQ ID NO: 8) foram coexpressos em uma razão molar por transfecções tran-

sientes no sistema HEK293-F conforme descrito acima em uma escala de 2,6 L em um fermentador Quad. Os anticorpos foram purificados via uma coluna HiTrap MabSelect (GE), seguida por cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna HiLoad Superdex 200 26/60 (GE) conforme descrito acima. Os rendimentos depois de SEC estavam na faixa de cerca de 38 mg de frações de anticorpo purificadas a partir de expressão transiente de 2 L. A Figura 26 mostra SDS-PAGE reduzida e não reduzida das frações de exclusão por tamanho obtidas durante a purificação. Na SDS-PAGE reduzida, pode ser visto que as respectivas cadeias pesada e leve de tipo selvagem e modificadas foram sintetizadas e purificadas de maneira homogênea. No entanto, na SDS-PAGE não reduzida, é óbvio que ainda havia várias espécies de anticorpos presentes.

[000239] A seguir, as frações de exclusão por tamanho obtidas foram analisadas por espectrometria de massa (ou desglicosilada, mas não reduzida, ou desglicosilada e reduzida). Várias espécies de anticorpos podem ser identificadas nas frações por espectrometria de massa e puderam ser correlacionadas às bandas que são vistas na respectiva SDS-PAGE (Figura 27). A seguinte tabela mostra as espécies de anticorpos que puderam ser identificadas:

Espécie	1. Frac. Corr. 5 desglic.	1. Frac. Corr. 9 desglic.
LC G6-31/ 23255 Da/(SS): 23.251 Da	-	-
HC G6-31/ 49149 Da /(SS):49.136 Da	-	-
Anticorpos LC* VL-VH/CL-CH1 troca <ANGPT2>/23919 Da/(SS) : 23.914 Da	-	-
Anticorpo HC* VL-VH/CL-CH1 troca <ANGPT2> Mab536/49245 Da/(SS): 49.231 Da	-	

Espécie	1. Frac. Corr. 5 desglic.	1. Frac. Corr. 9 desglic.
Anticorpo LC G6-31 + LC VL-VH/CL-CH1 troca <ANGPT2> Mab536 => (SS) : 47.165 Da	X	X
Ab G6-31(SS) completo 144.774 Da	X	
Anticorpo de troca <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 biespecífico Ab completo (SS) 145.532 Da (LC+ HC G6-31) + (LC* + HC*)	X	
½ Ab G6-31 (SS) 72.387 Da	X	X
Anticorpo (HC G6-31) + (HC VL-VH/CL-CH1 troca <ANGPT2> Mab536)=> (SS) 98.367 Da	X	X
(SH) 2 x anticorpos (HC VL-VH/CL-CH1 troca <ANGPT2> Mab536) + LC G6-31 => 121.745 Da	X	
2 x (HC G6-31) + LC G6-31 + HC anticorpo VL-VH/CL-CH1 troca <ANGPT2> Mab536 =>(SS):170.754 Da	X + 20 Da	

[000240] O anticorpo de troca <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 biespecífico desejado, que reconhece VEGF, com um braço, e ANGPT2, com o outro braço, portanto, pôde ser identificado de maneira inequívoca por espectrometria de massa e também pôde ser visto na respectiva SDS-PAGE. Uma representação esquemática do anticorpo de troca <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 biespecífico desejado é vista da Figura 30. A concentração mais elevada desse anticorpo desejado pôde ser encontrada nas frações 5 e 6, enquanto que a sua concentração foi reduzida em frações posteriores.

[000241] Em adição, a presença de anticorpo de troca <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 biespecífico, capaz de se ligar simultaneamente a ANGPT2 e a VEGF, foi confirmada por um ensaio de ligação em ponte de ELISA (Figura 28) e um ensaio de ligação em ponte com Biacore (Figura 29) descritos acima, mostrando que o anticorpo biespecífico desejado foi capaz de se ligar a ANGPT2 e a VEGF de maneira simultânea. Nesses ensaios, um anticorpo biespecífico tetravalente TvG6-Ang23 serviu como um controle.

[000242] Deve-se observar que, devido a uma superexpressão relativa do anticorpo <VEGF> de tipo selvagem G6-31, por exemplo, devido a melhores rendimentos de expressão para os vetores genômicos, que codificam derivados de G6-31, a formação de subprodutos inativos foi estimulada, resultando em um excesso de dímeros de G6-31 e meio-anticorpos inativos. A fim de se conseguir um rendimento máximo do anticorpo de troca <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 biespecífico desejado, estudos adicionais são empreendidos, que atingem uma expressão uniforme de todas as quatro cadeias de anticorpos e reduzem a formação de subprodutos. Esses estudos incluem i) a otimização da estequiometria equimolecular dos 4 plasmídeos usados para a coexpressão, por exemplo, por combinação das unidades transcricionais em um ou dois plasmídeos, a introdução dos respectivos elementos de controle; assim como ii) a otimização de heterodimerização, por exemplo, por uso de diferentes tecnologias de botões em cavidades, tal como a introdução de uma ponte de dissulfeto adicional no domínio de CH3, por exemplo, Y349C na "cadeia de botões" e D356C na "cadeia de cavidade" e/ou combinadas com o uso de resíduos R409D; K370E (K409D) para resíduos de botões e D399K; E357K para resíduos de cavidade, conforme descrito pelo documento de número EP 1870459A1.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo biespecífico, bivalente, caracterizado pelo fato de que compreende:

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

b) a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,

em que:

na cadeia leve do anticorpo que se liga a um segundo antígeno, o domínio variável de cadeia leve (VL) é substituído pelo domínio variável de cadeia pesada (VH) de um anticorpo e o domínio de cadeia leve constante CL é substituído pelo domínio de cadeia pesada constante CH1 do anticorpo; e

na cadeia pesada do anticorpo que se liga a um segundo antígeno, o domínio variável de cadeia pesada (VH) é substituído pelo domínio variável de cadeia leve (VL) de um anticorpo e o domínio de cadeia pesada constante CH1 é substituído pelo domínio de cadeia leve constante CL do anticorpo.

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

o domínio de CH3 de uma cadeia pesada, que encontra a interface do domínio de CH3 da outra cadeia pesada;

o domínio de CH3 de uma cadeia pesada é alterado, de modo que, na interface, o domínio de CH3 de uma cadeia pesada, que encontra a interface do domínio de CH3 da outra cadeia pesada, no anticorpo biespecífico, bivalente, um ou dois resíduos de aminoácido são substituídos por um número equivalente de resíduos de aminoácido tendo um maior volume de cadeia lateral, por meio disto gerando uma protuberância dentro da interface do domínio de CH3 de uma cadeia pesada, que é posicionável em uma cavidade dentro da

interface do domínio de CH3 da outra cadeia pesada,

e

em que o domínio de CH3 da outra cadeia pesada é alterado, de modo que, dentro da interface do segundo domínio de CH3, que encontra a interface do primeiro domínio de CH3 dentro do anticorpo biespecífico, bivalente, dois ou três resíduos de aminoácido são substituídos por um número equivalente de resíduos de aminoácido tendo um menor volume de cadeia lateral, por meio disto gerando uma cavidade dentro da interface do segundo domínio de CH3, dentro do qual é posicionável uma protuberância dentro da interface do primeiro domínio de CH3.

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

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que três resíduos de aminoácido são substituídos por três resíduos de aminoácidos tendo um menor volume de cadeia lateral, em que os resíduos de aminoácidos tendo um menor volume de cadeia lateral são selecionados independentemente a partir do grupo consistindo em alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

5. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que três resíduos de aminoácidos são substituídos por três resíduos de aminoácidos tendo um menor volume de cadeia lateral, em que os resíduos de aminoácidos tendo um menor volume de cadeia lateral são independentemente selecionados a partir de um grupo consistindo em alanina (A), serina (S), treonina (T), valina

(V).

6. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que ambos os domínios de CH3 são adicionalmente alterados pela introdução de uma cisteína (C) como um aminoácido na mesma posição residual de cada domínio de CH3.

7. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que ambos os domínios de CH3 são adicionalmente alterados pela introdução de uma cisteína (C) como um aminoácido na mesma posição residual de cada domínio de CH3.

8. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que ambos os domínios de CH3 são adicionalmente alterados pela introdução de uma cisteína (C) como um aminoácido na mesma posição residual de cada domínio de CH3.

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

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

a) transformação de uma célula hospedeira com

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

- vetores compreendendo moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada de um anticorpo que se liga de maneira específica a um segundo antígeno,

em que,

na cadeia leve do anticorpo que se liga a um segundo antígeno, o domínio variável de cadeia leve (VL) é substituído pelo

domínio variável de cadeia pesada (VH) de um anticorpo e o domínio de cadeia leve constante CL é substituído pelo domínio de cadeia pesada constante CH1 do anticorpo; e

na cadeia pesada do anticorpo que se liga a um segundo antígeno, o domínio variável de cadeia pesada (VH) é substituído pelo domínio variável de cadeia leve (VL) de um anticorpo e o domínio de cadeia pesada constante CH1 é substituído pelo domínio de cadeia leve constante CL do anticorpo.

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

c) recuperação da molécula de anticorpo da cultura.

11. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende anticorpo biespecífico, bivalente, como definido na reivindicação 1 e pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável.

12. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo biespecífico, bivalente, como definido na reivindicação 2, e pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável.

13. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo biespecífico, bivalente, como definido na reivindicação 6, e pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável.

14. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo biespecífico, bivalente, como definido na reivindicação 9, e pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável.

Figura 1

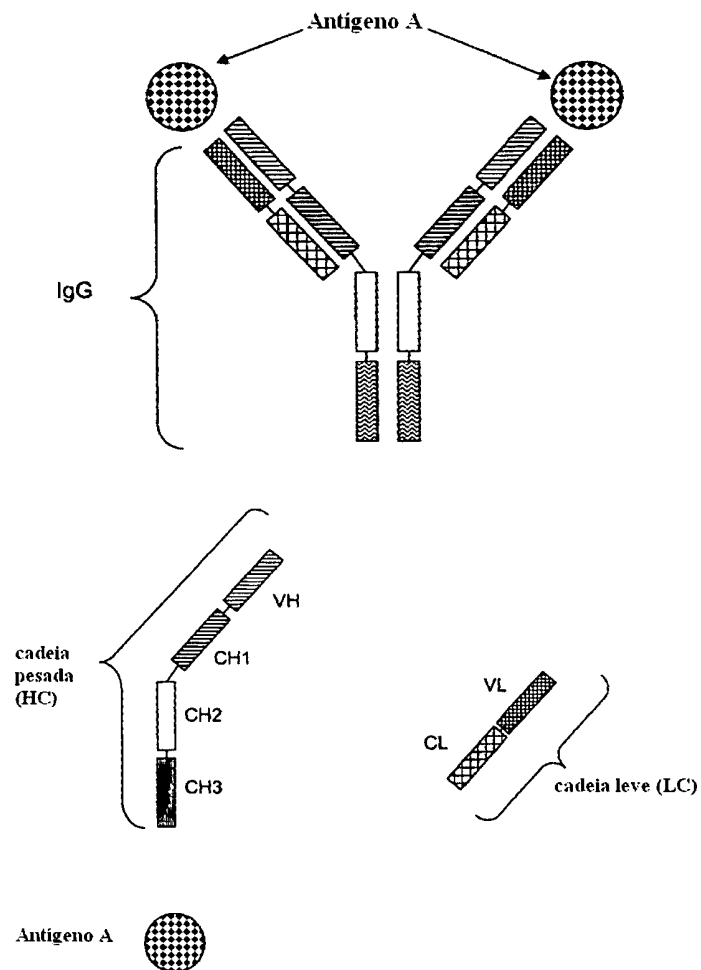


Figura 2

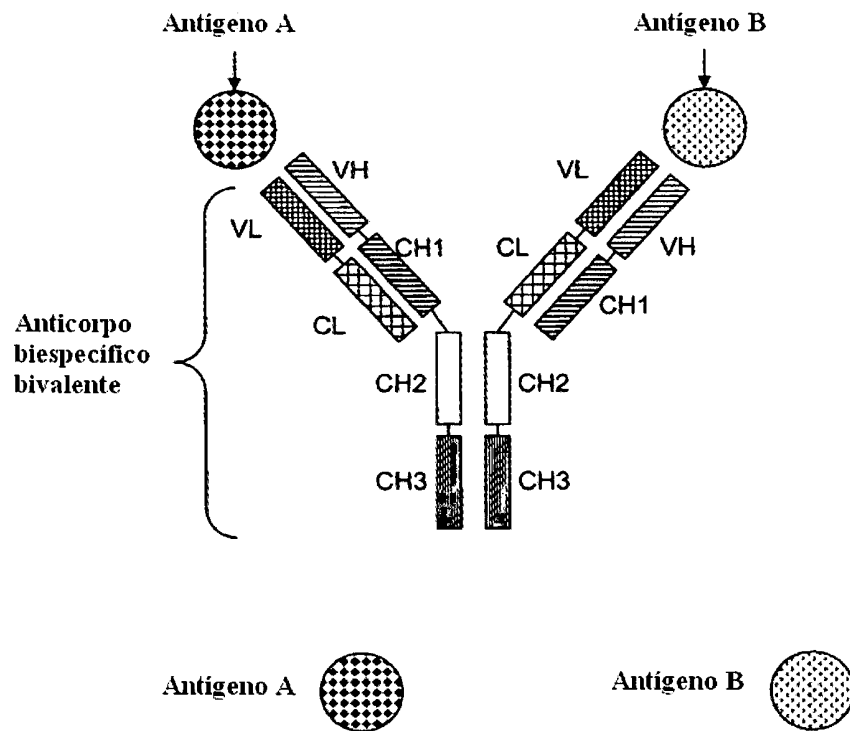


Figura 3

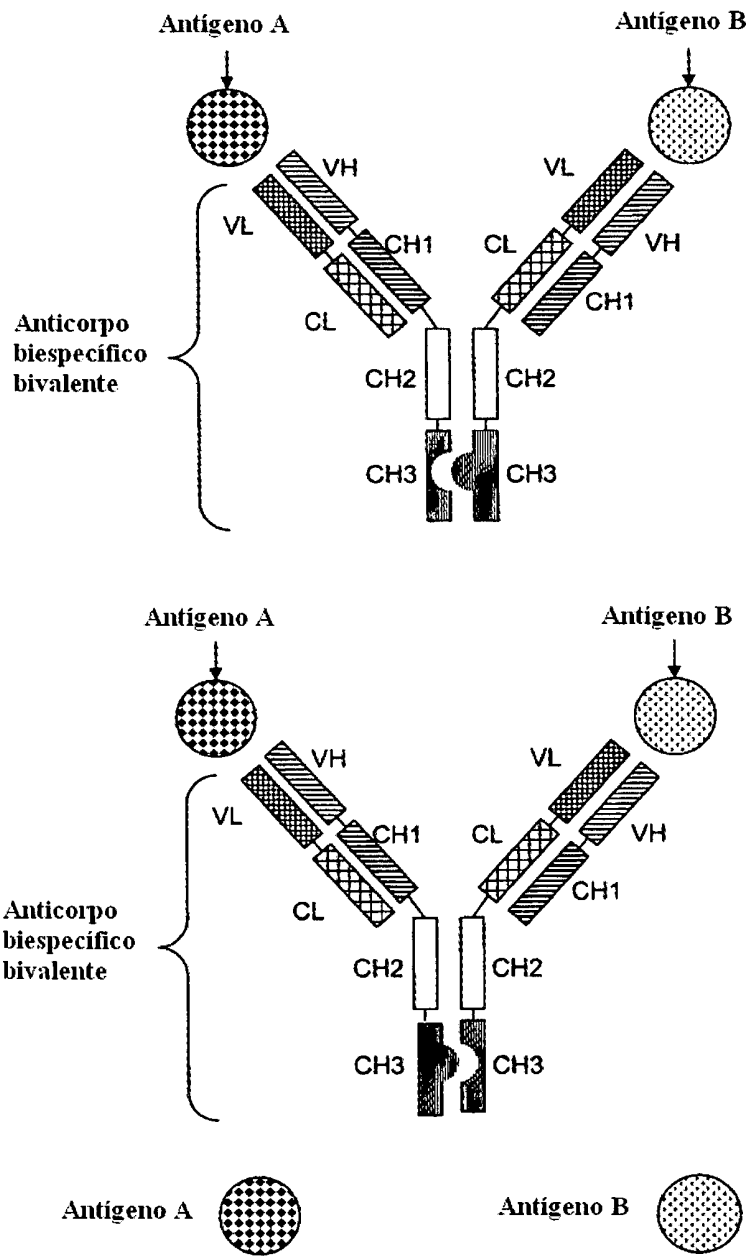


Figura 4

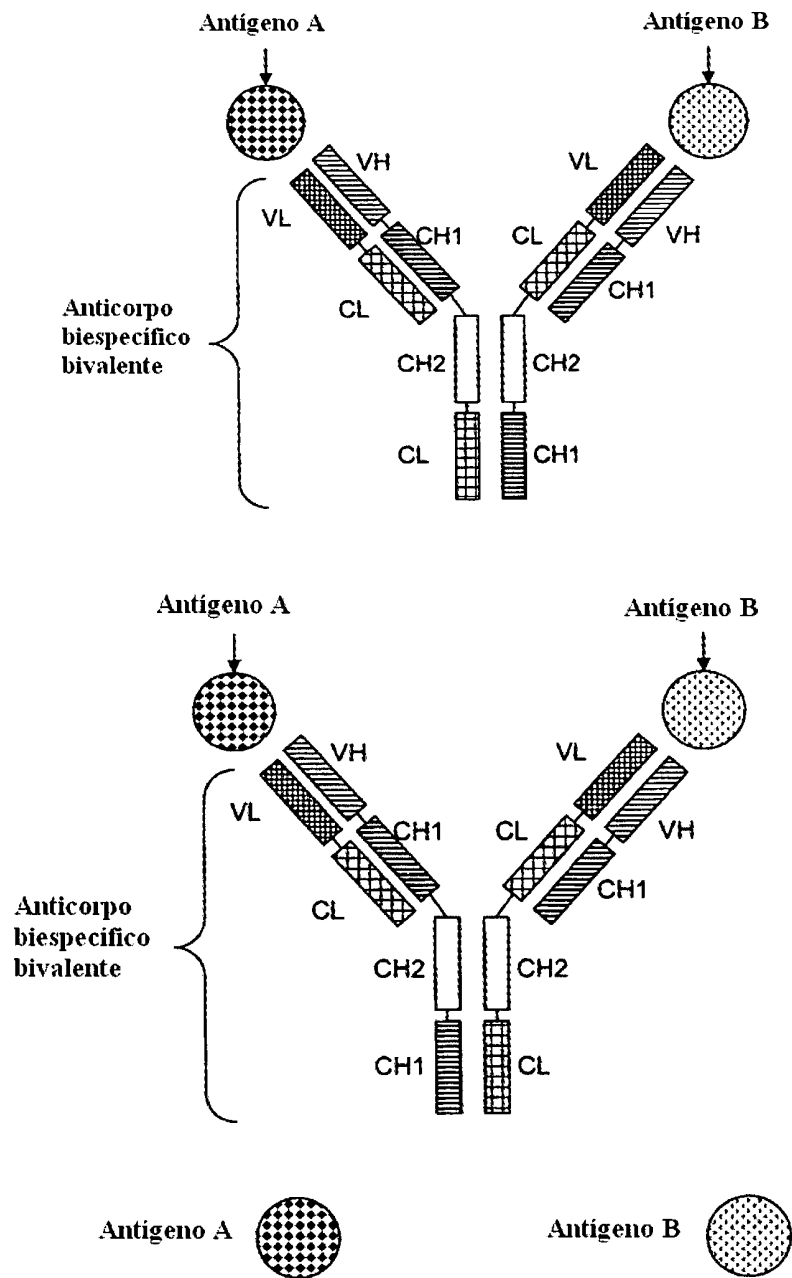


Figura 5

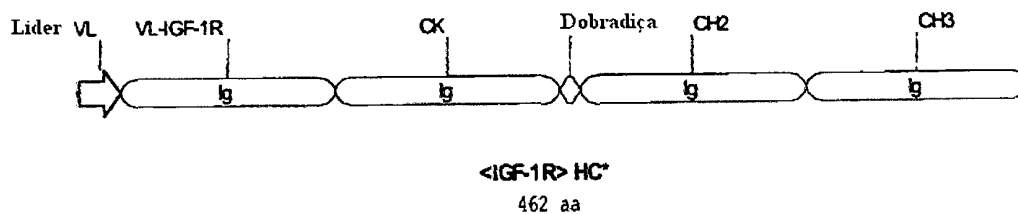
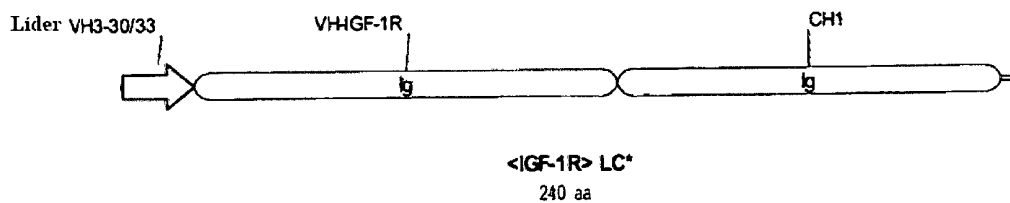


Figura 6



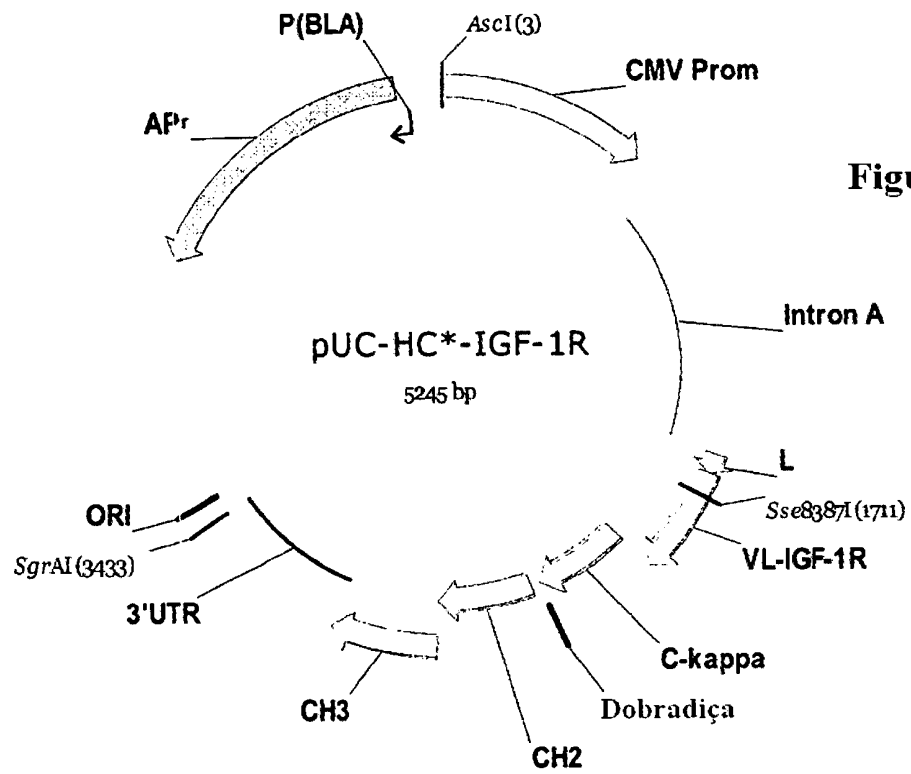
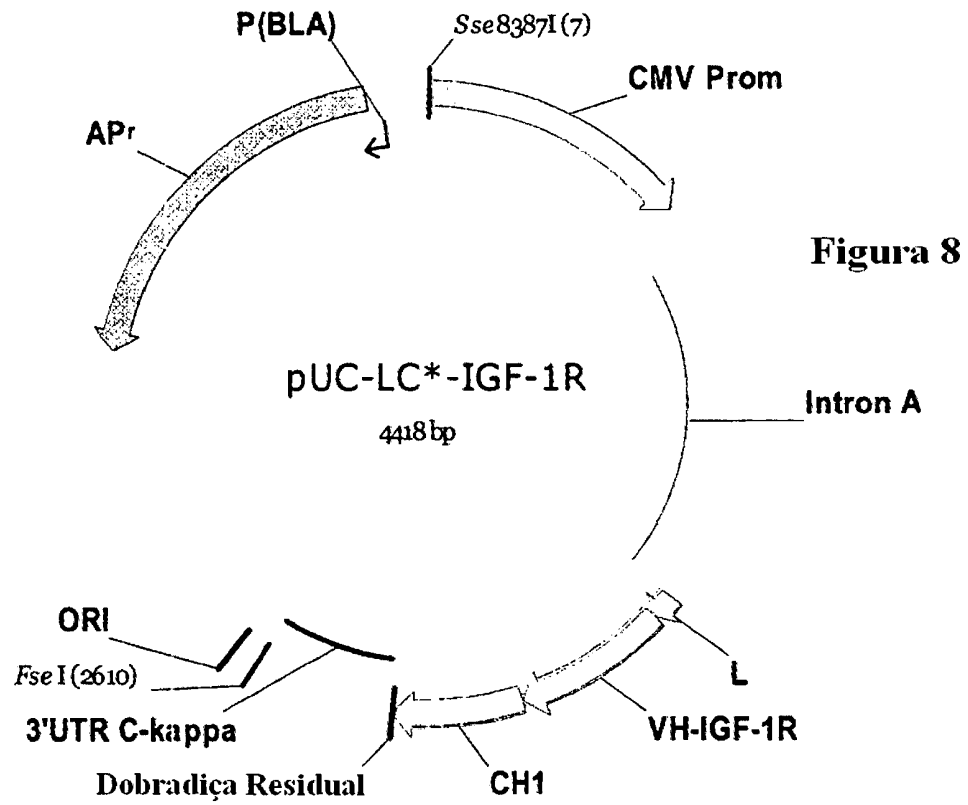
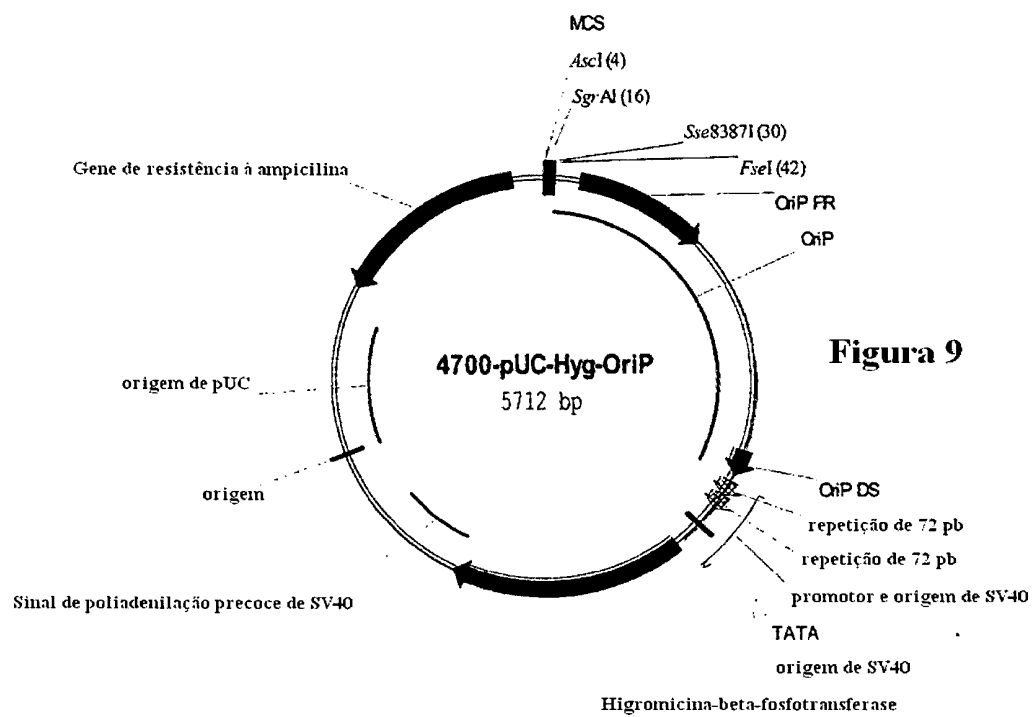


Figura 7





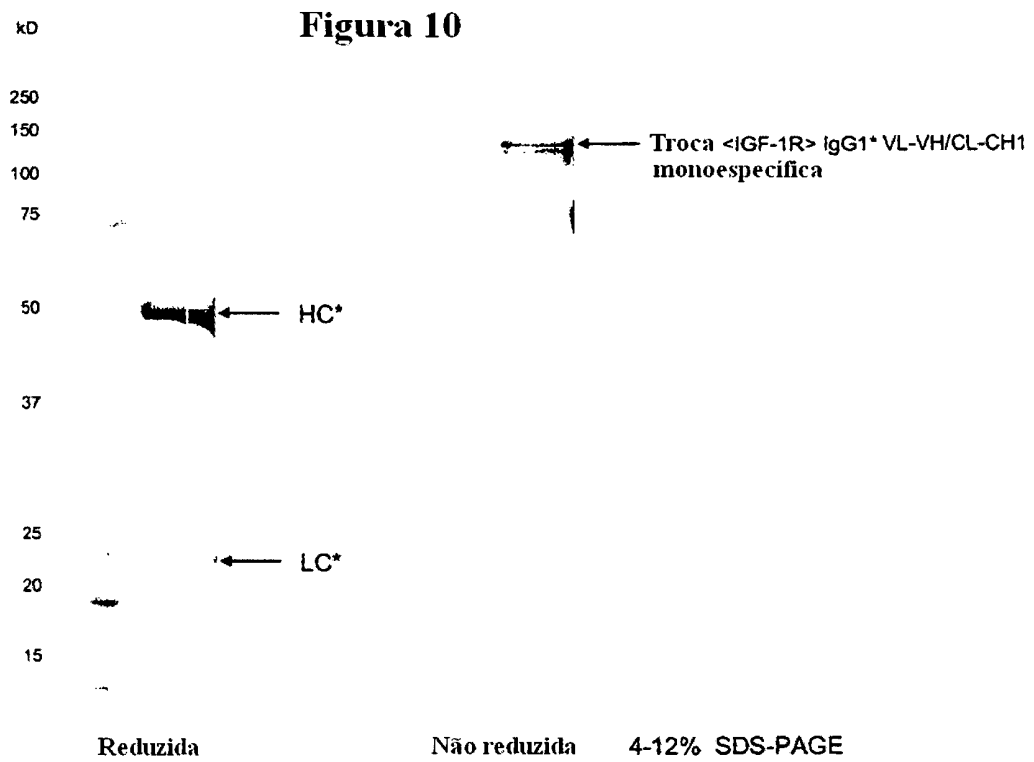
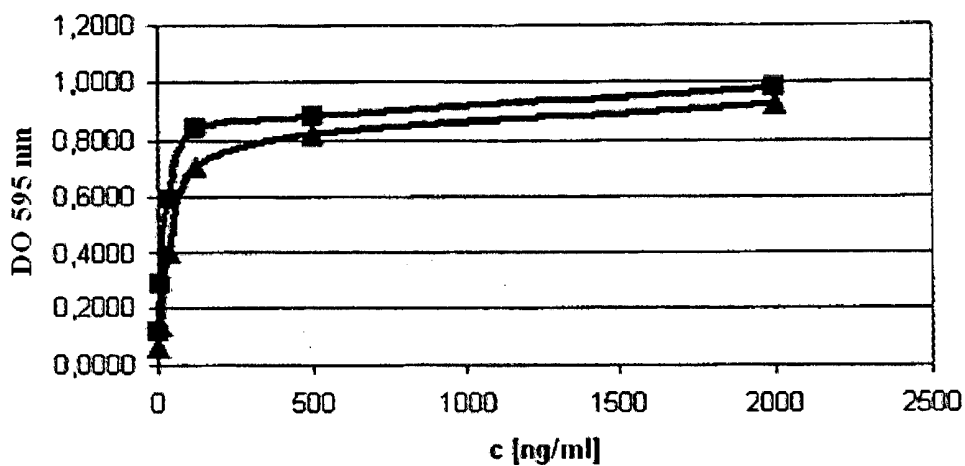


Figura 11

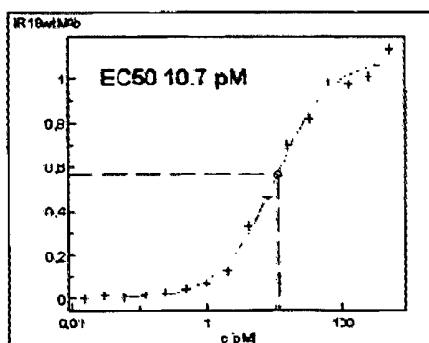
A



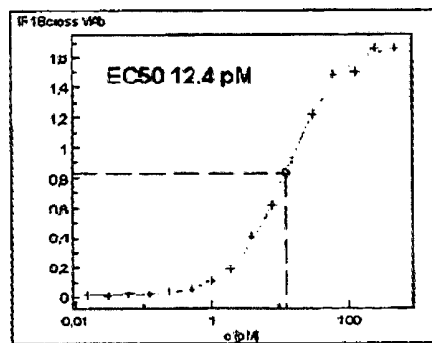
anticorpo de tipo selvagem <IGF-1R>

▲ anticorpo de troca
<IGF-1R> VL-VH/CL-CH1

B



Ligação de anticorpo <IGF-1R> de tipo selvagem a IGF-1R-ECD



Ligação de anticorpo de troca <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 a IGF-1R-ECD

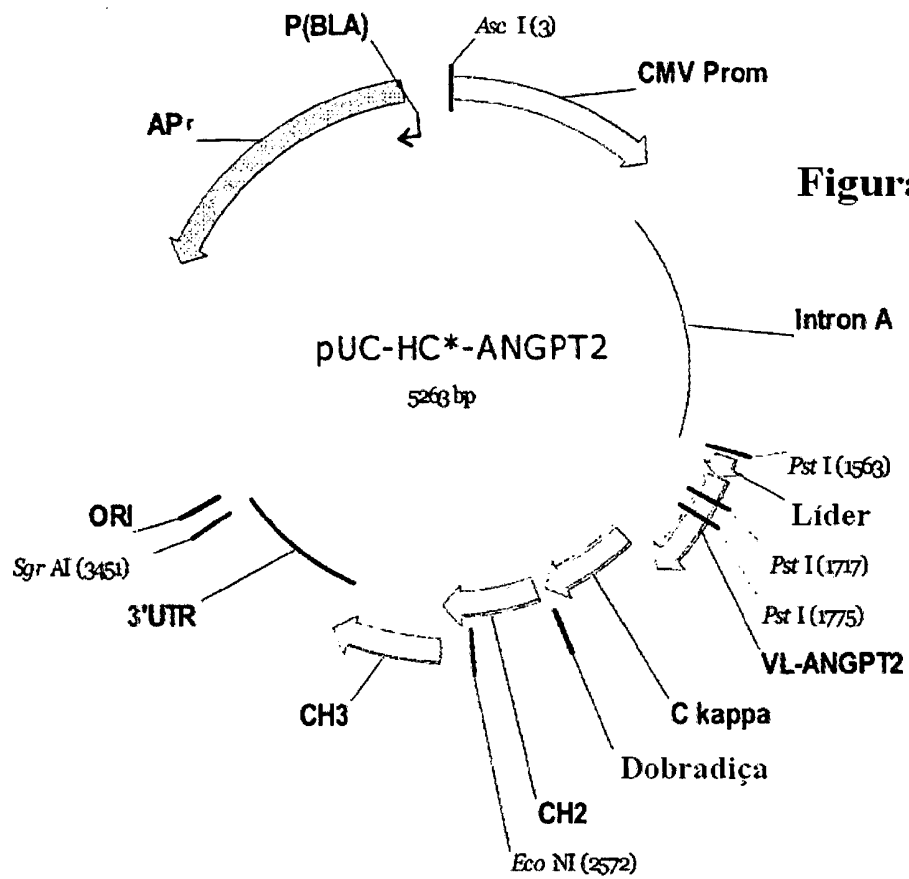
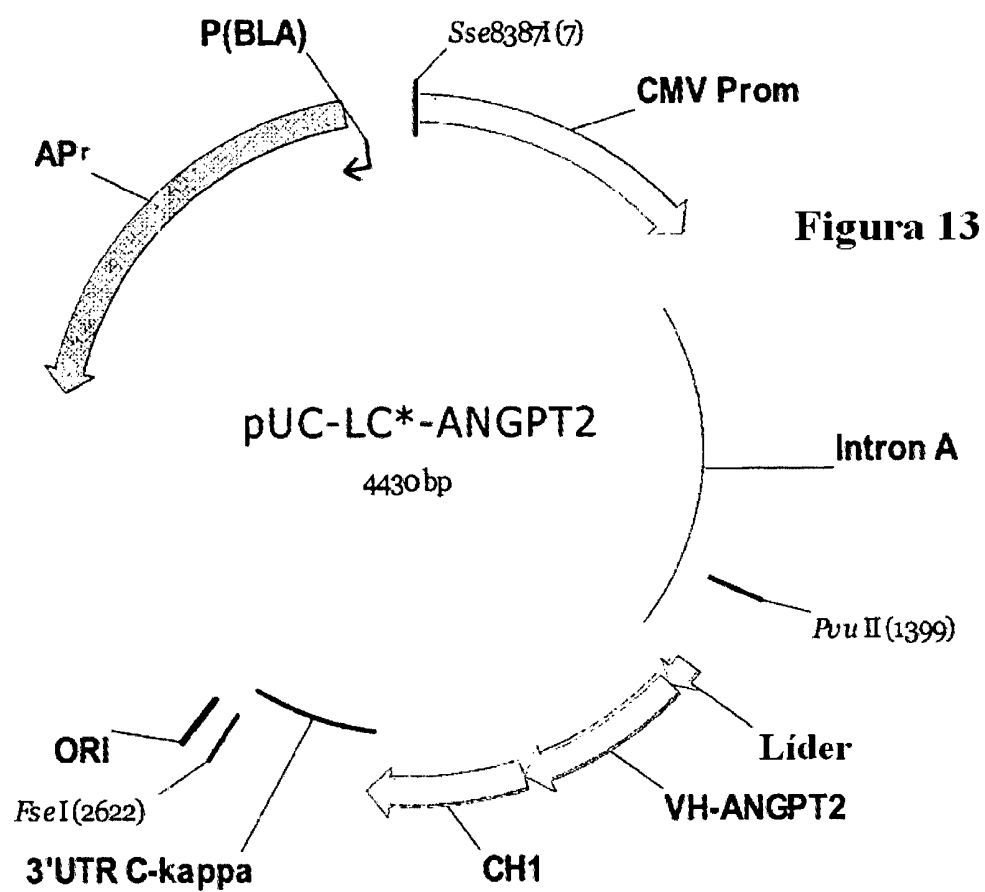


Figura 12



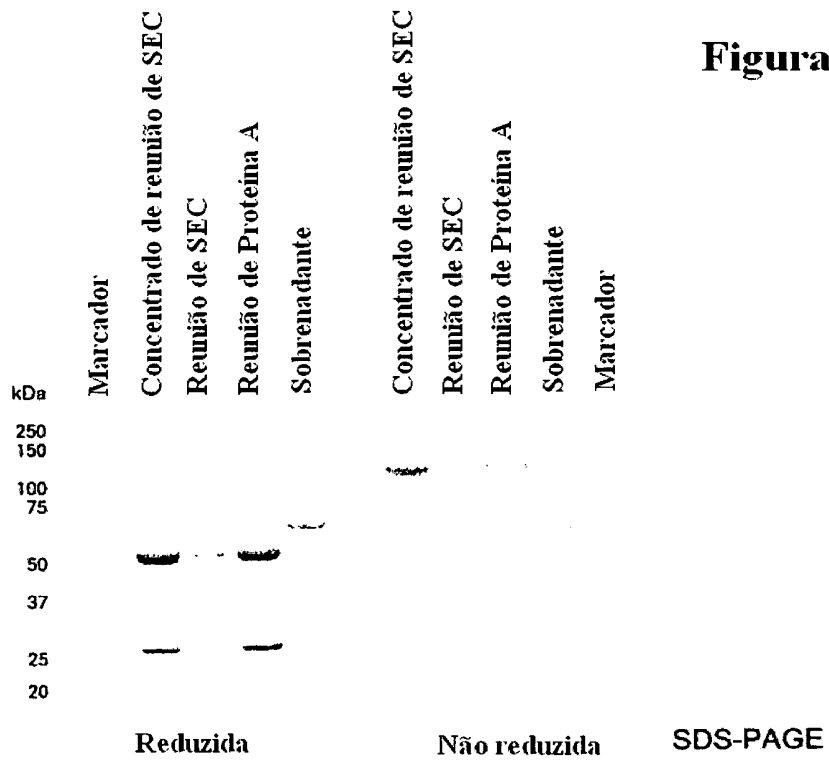


Figura 15

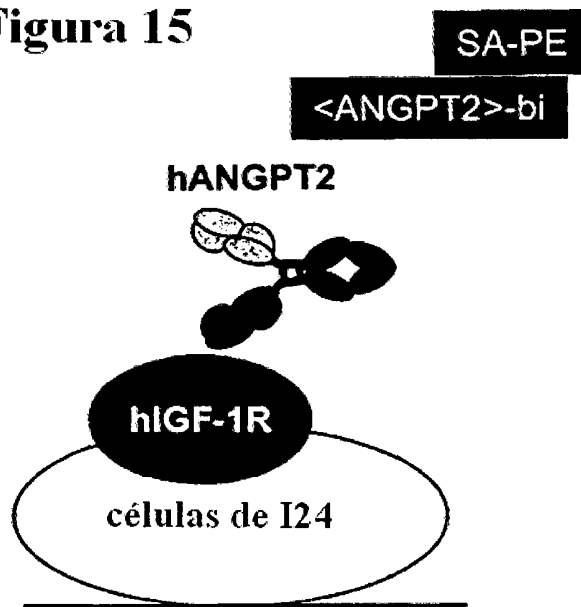


Figura 16

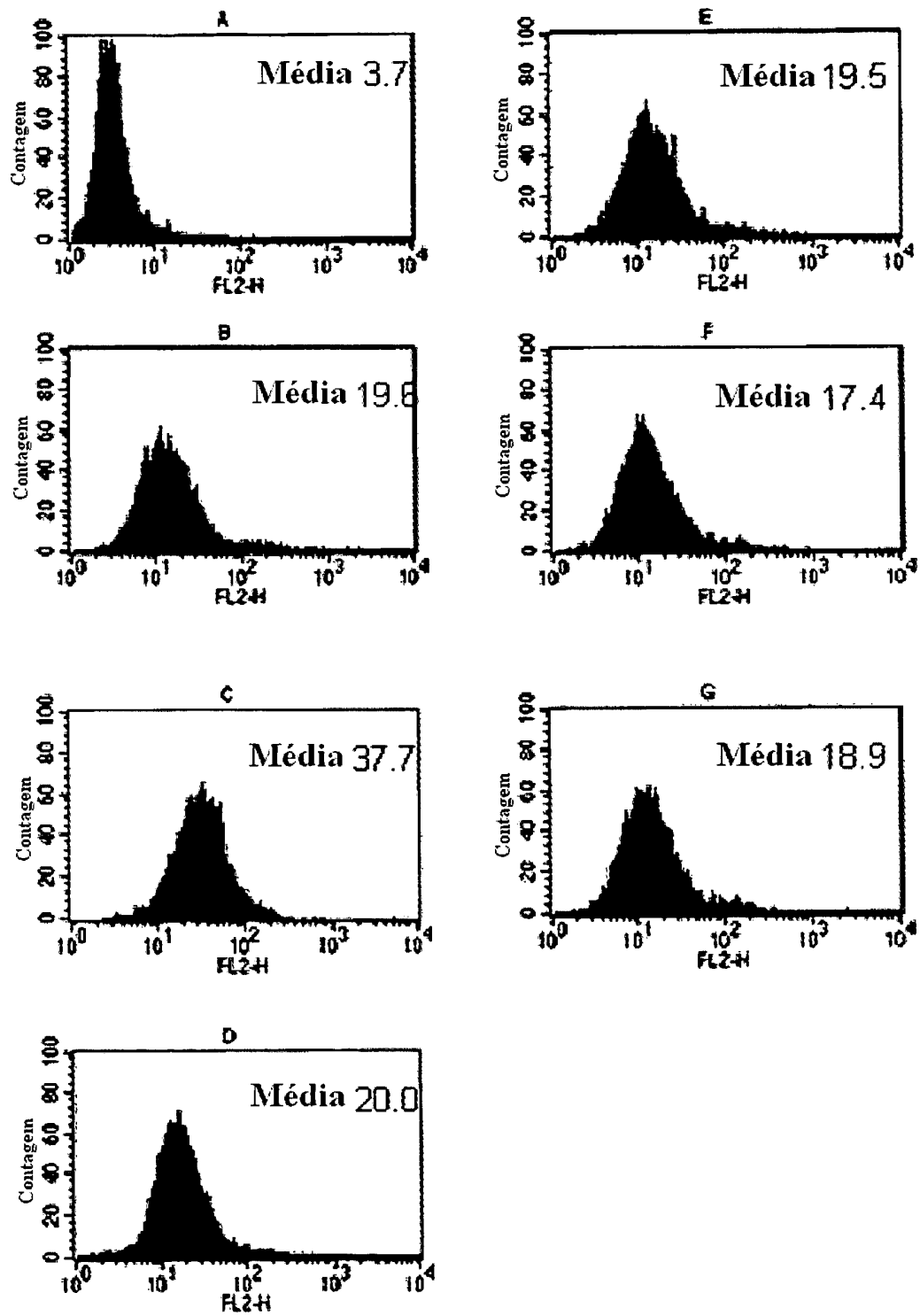


Figura 17

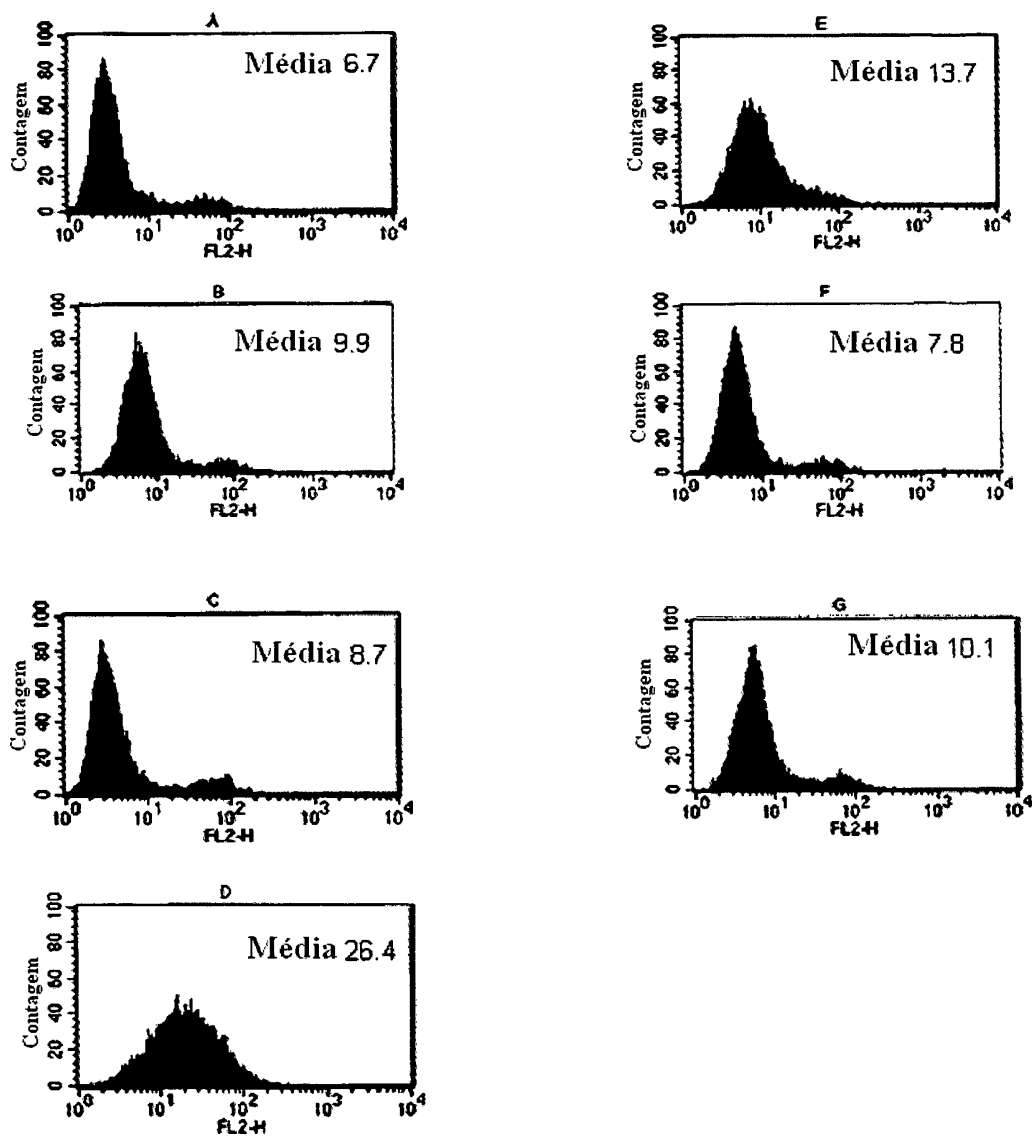


Figura 18

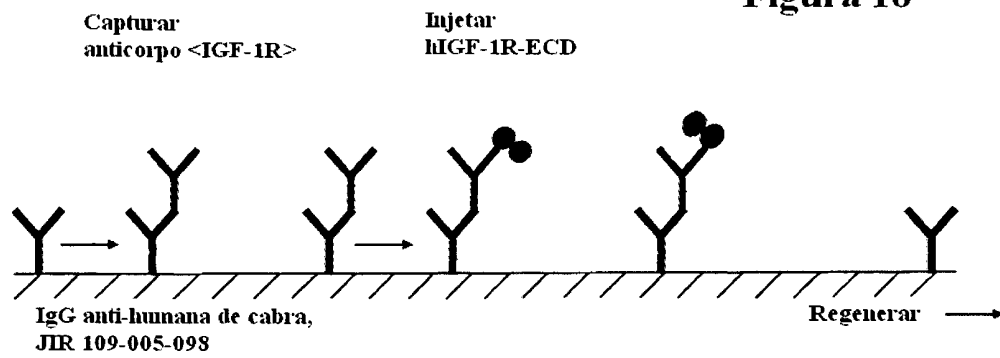


Figura 19

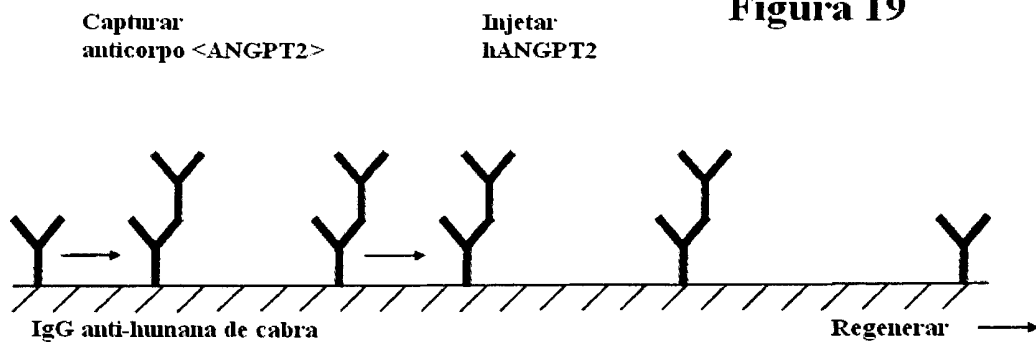


Figura 20

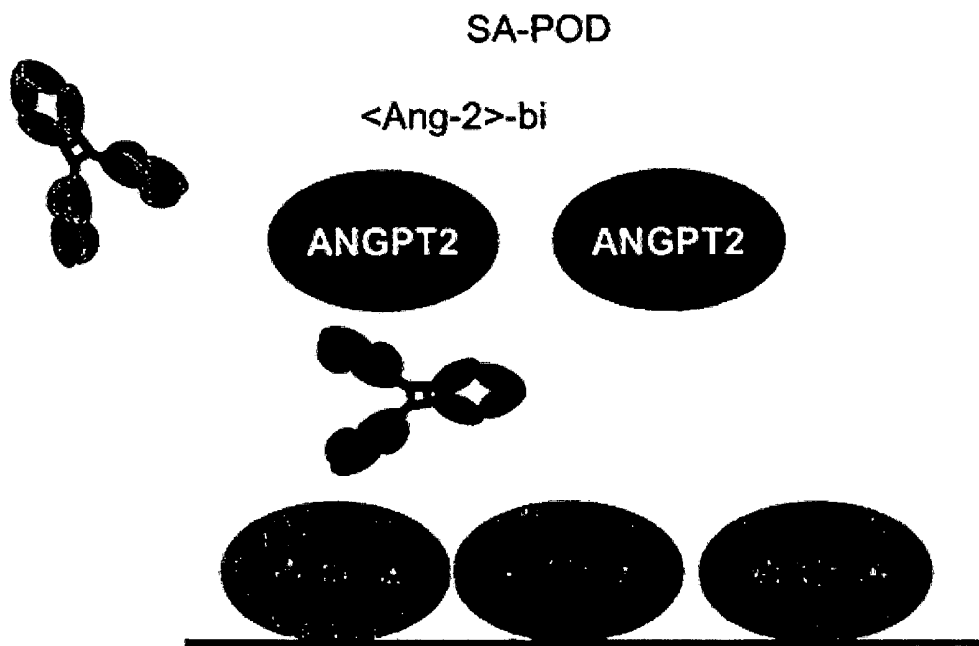
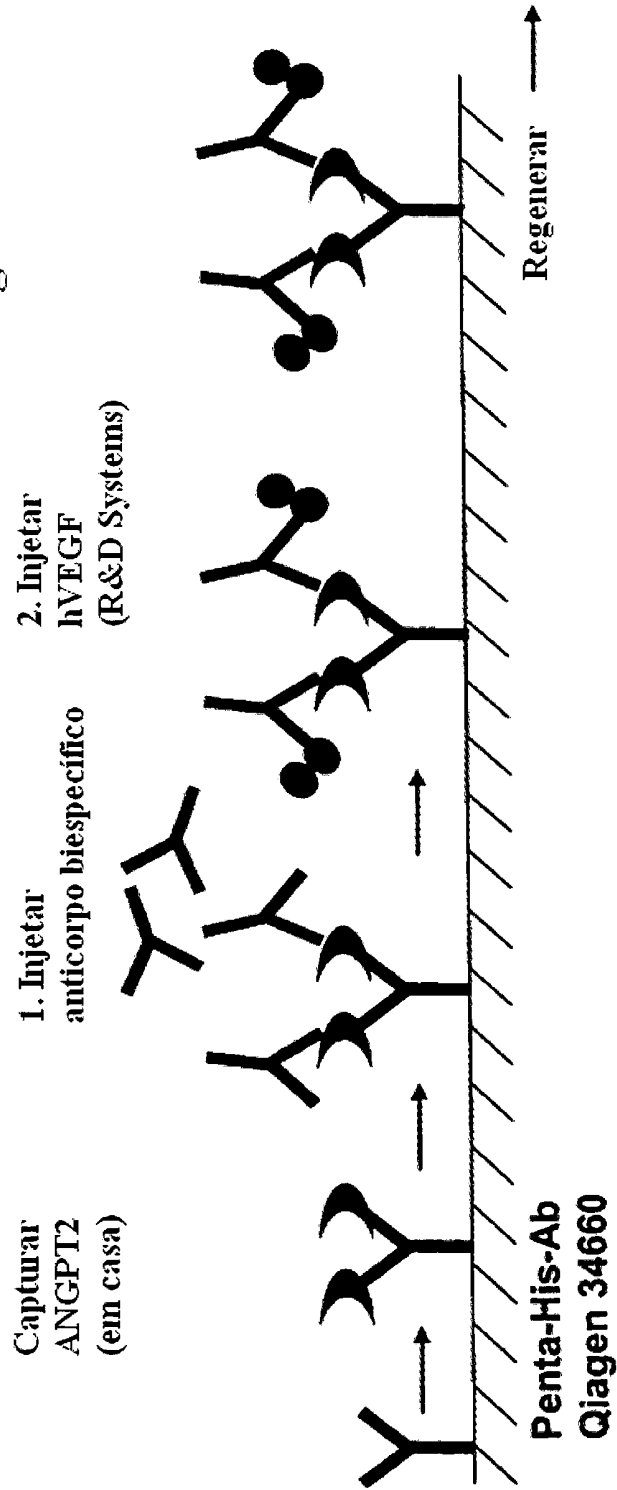


Figura 21



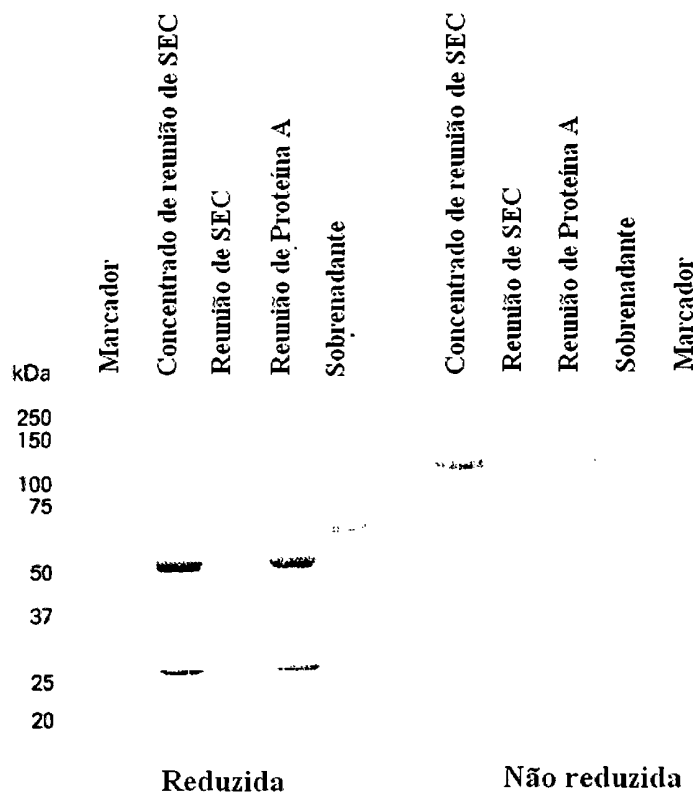
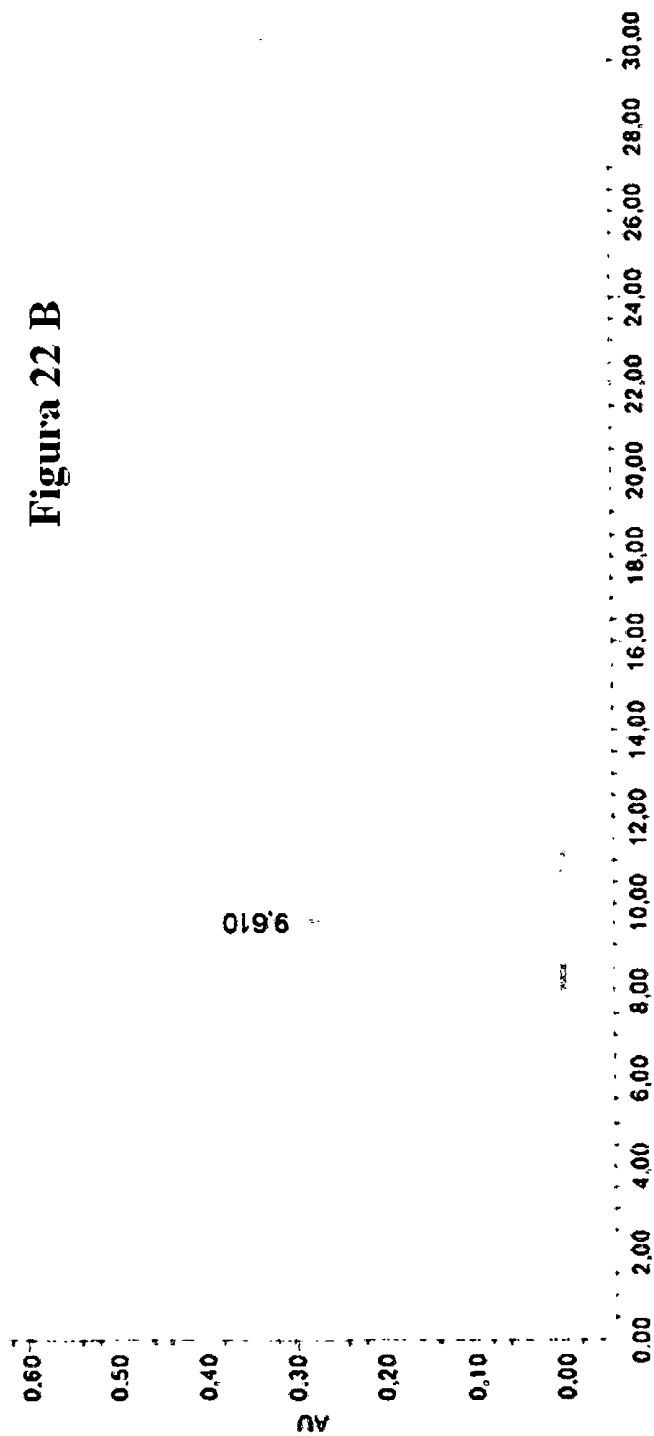


Figura 22 A

Figura 22 B



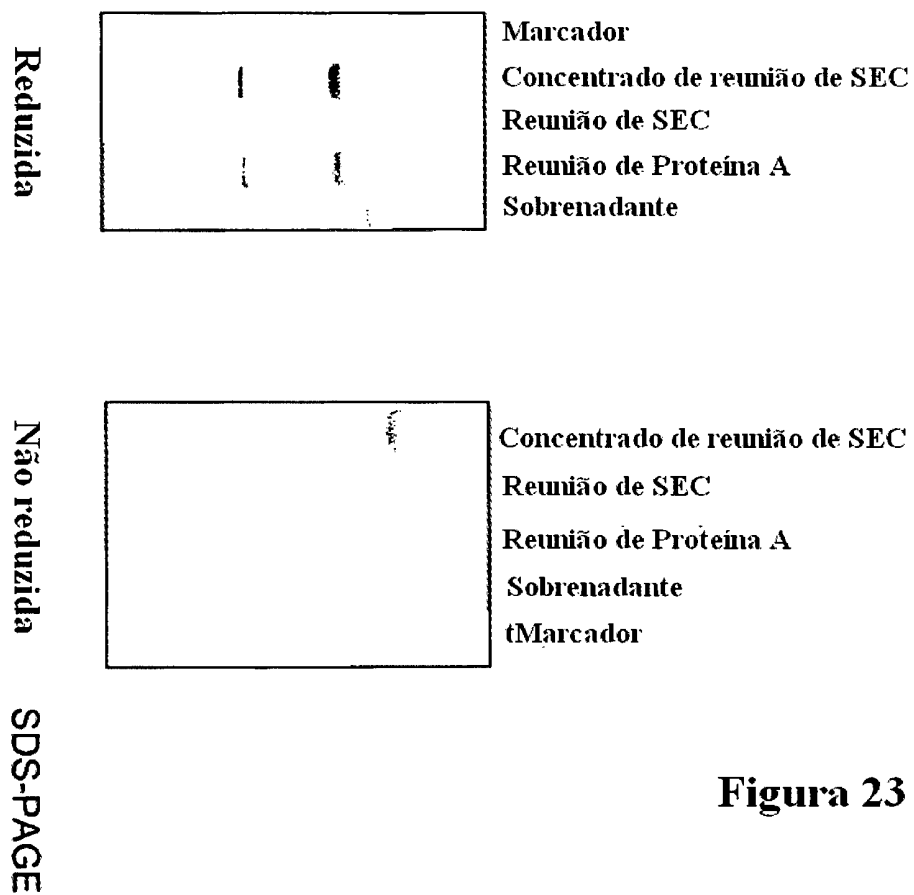


Figura 23 A

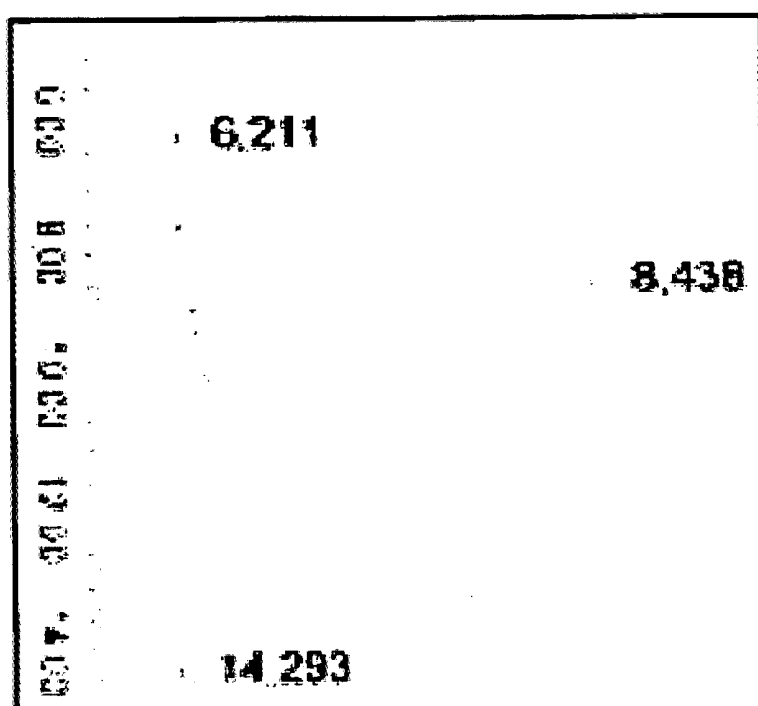
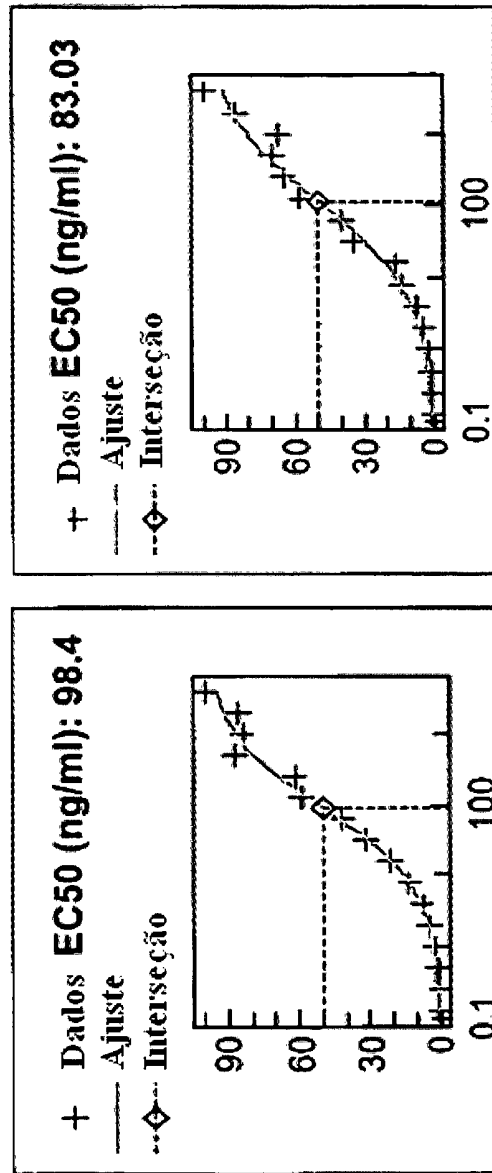
Figura 23 B

Figura 24

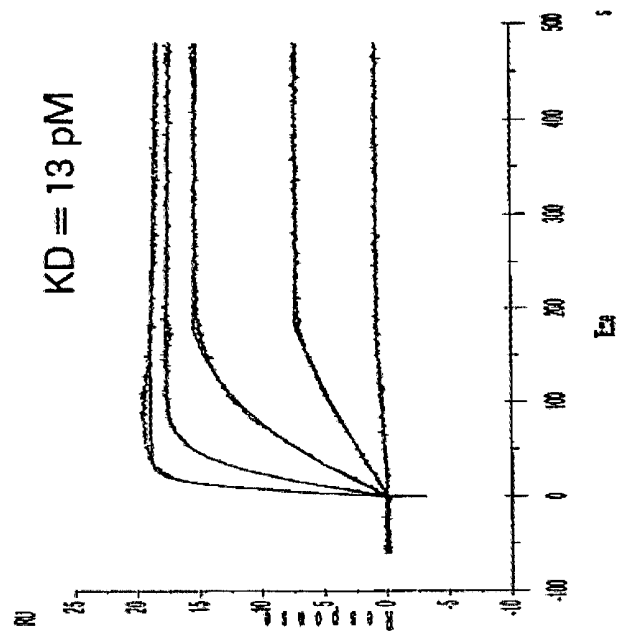


anticorpo
<ANGPT2>

anticorpo de troca
<ANGPT2> VL-VH/CL-CH1

Figura 25

Ligação de anticorpo de troca
<ANGPT2> VL-VH/CL-CH1
a ANGPT2



Ligação de anticorpo <ANGPT2>
a ANGPT2

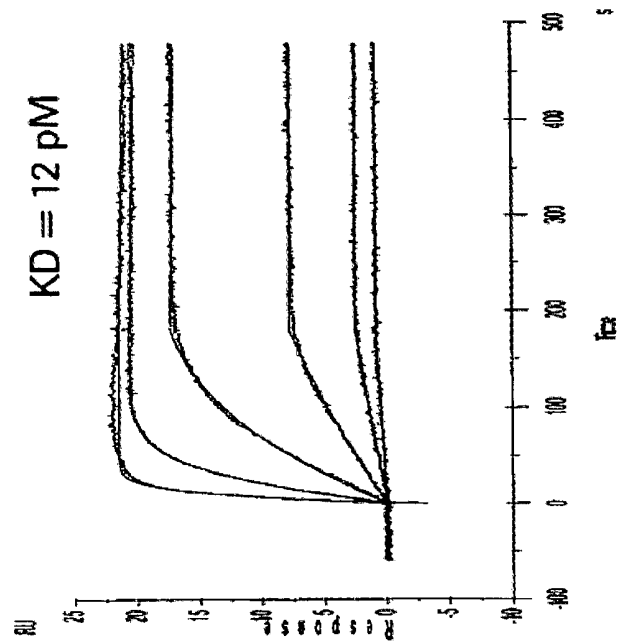
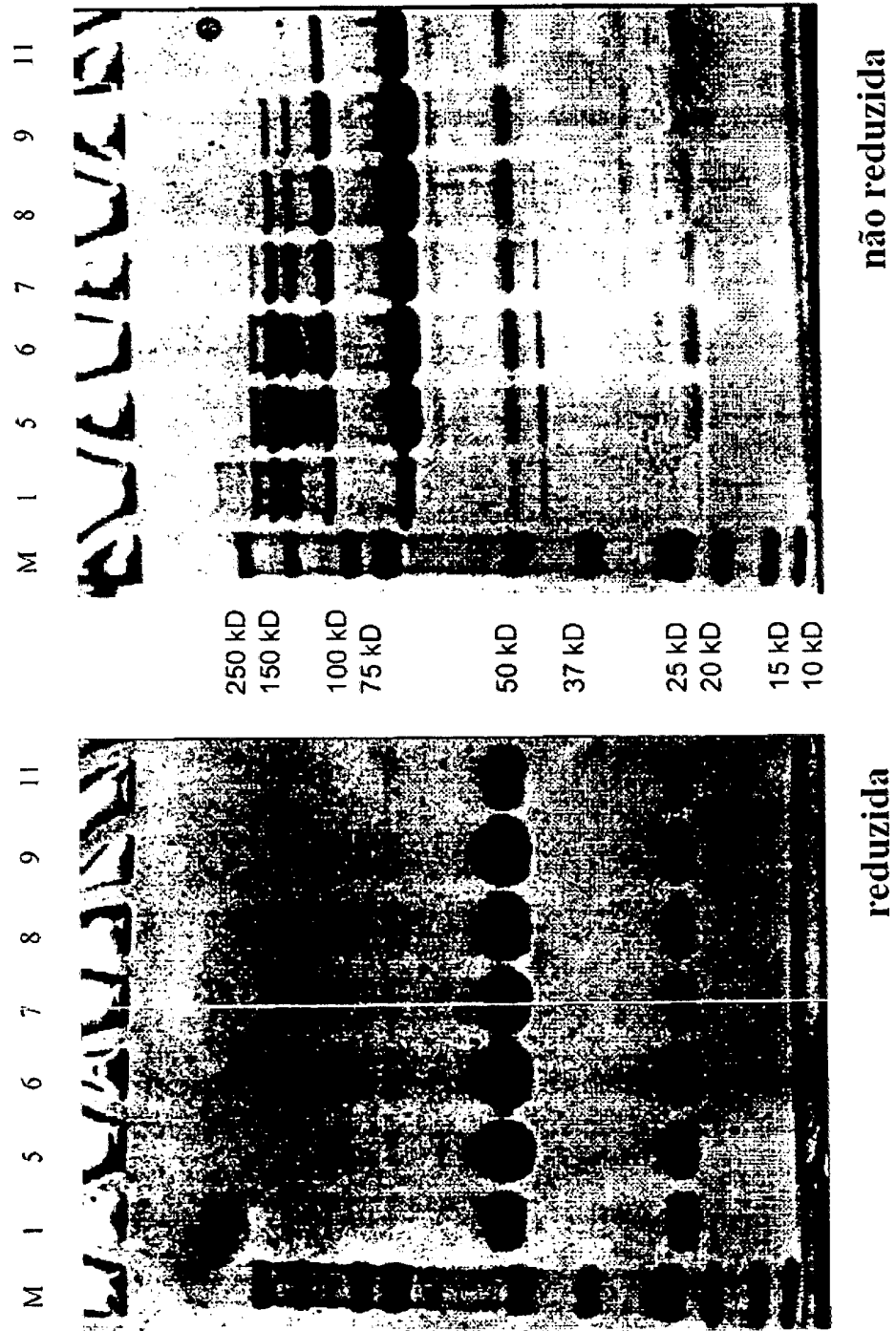


Figura 26



Designação de bandas em SDS-PAGE por espectrometria de massa de frações nativas

Figura 27

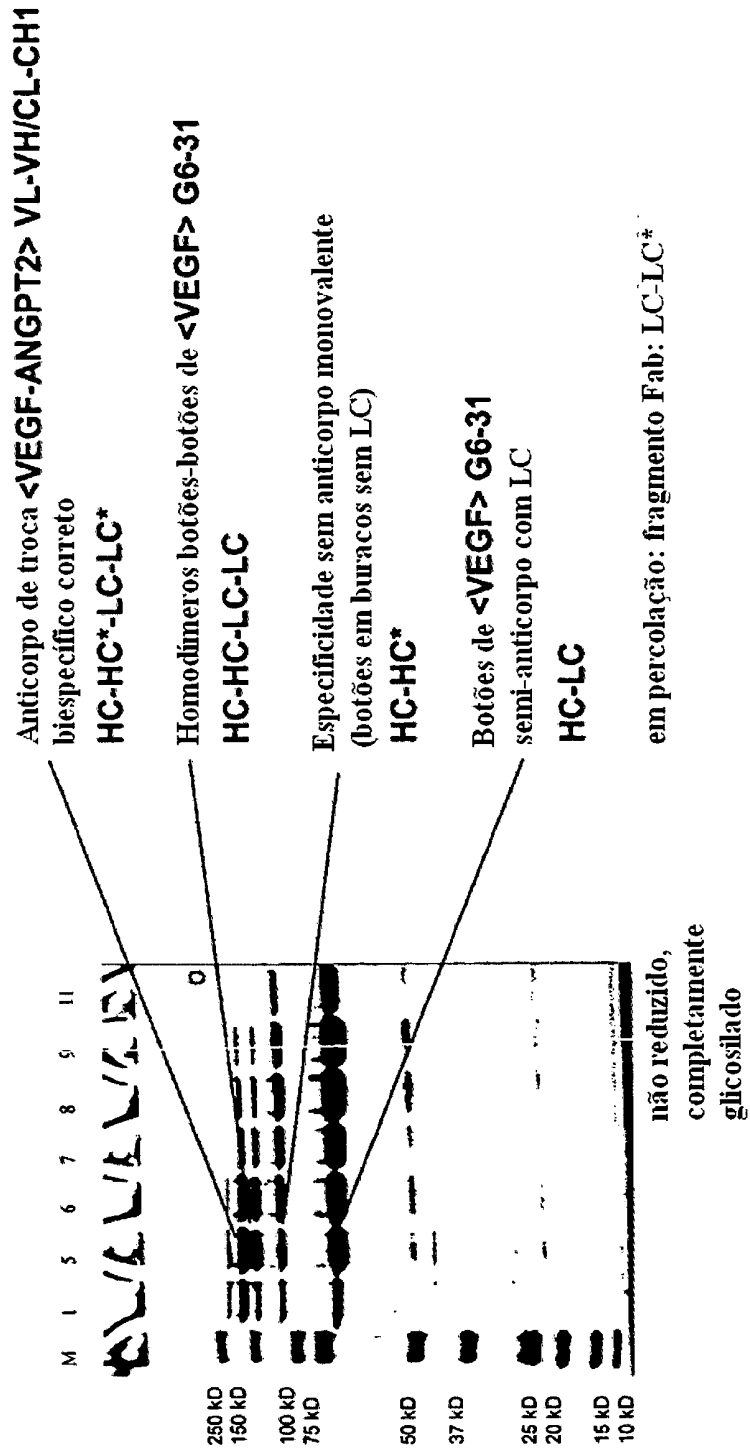
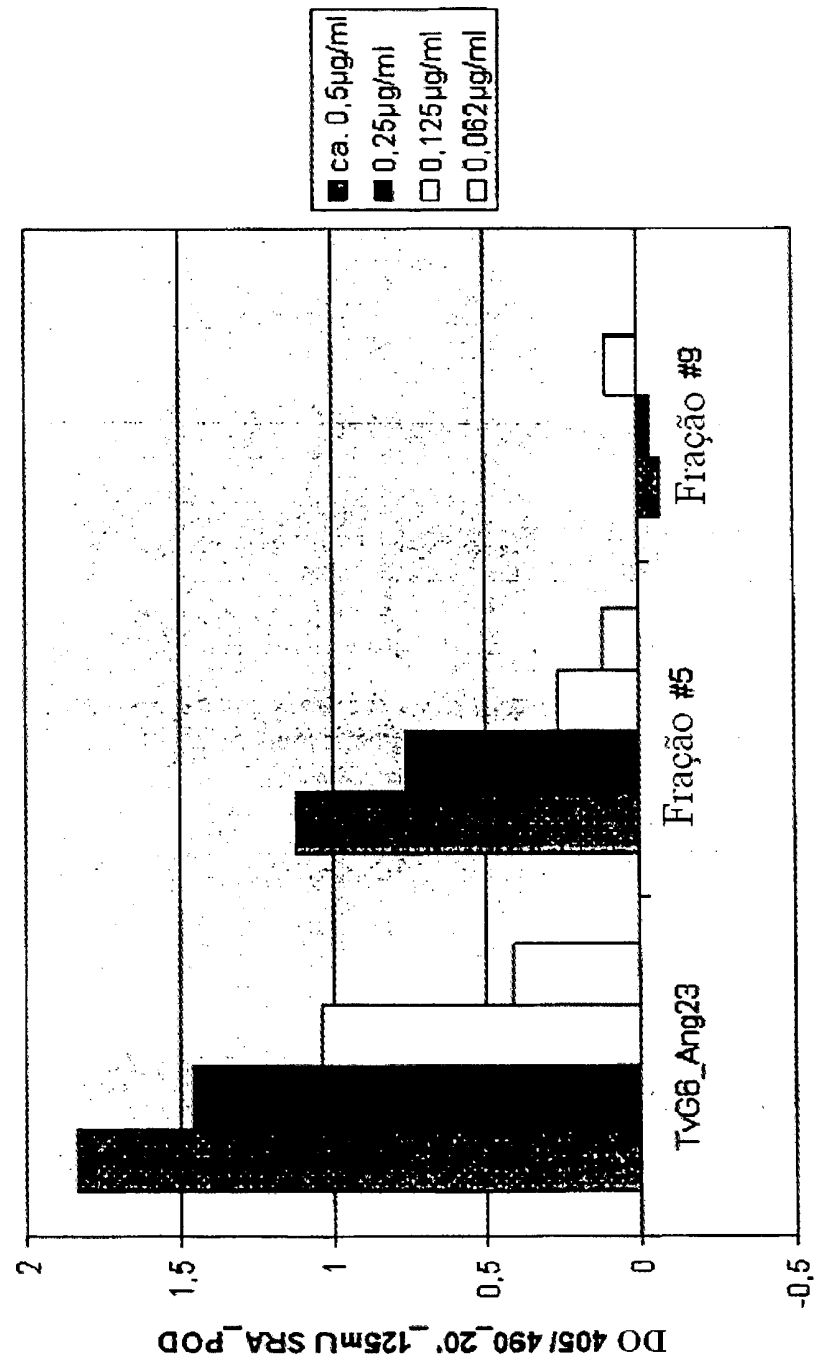


Figura 28



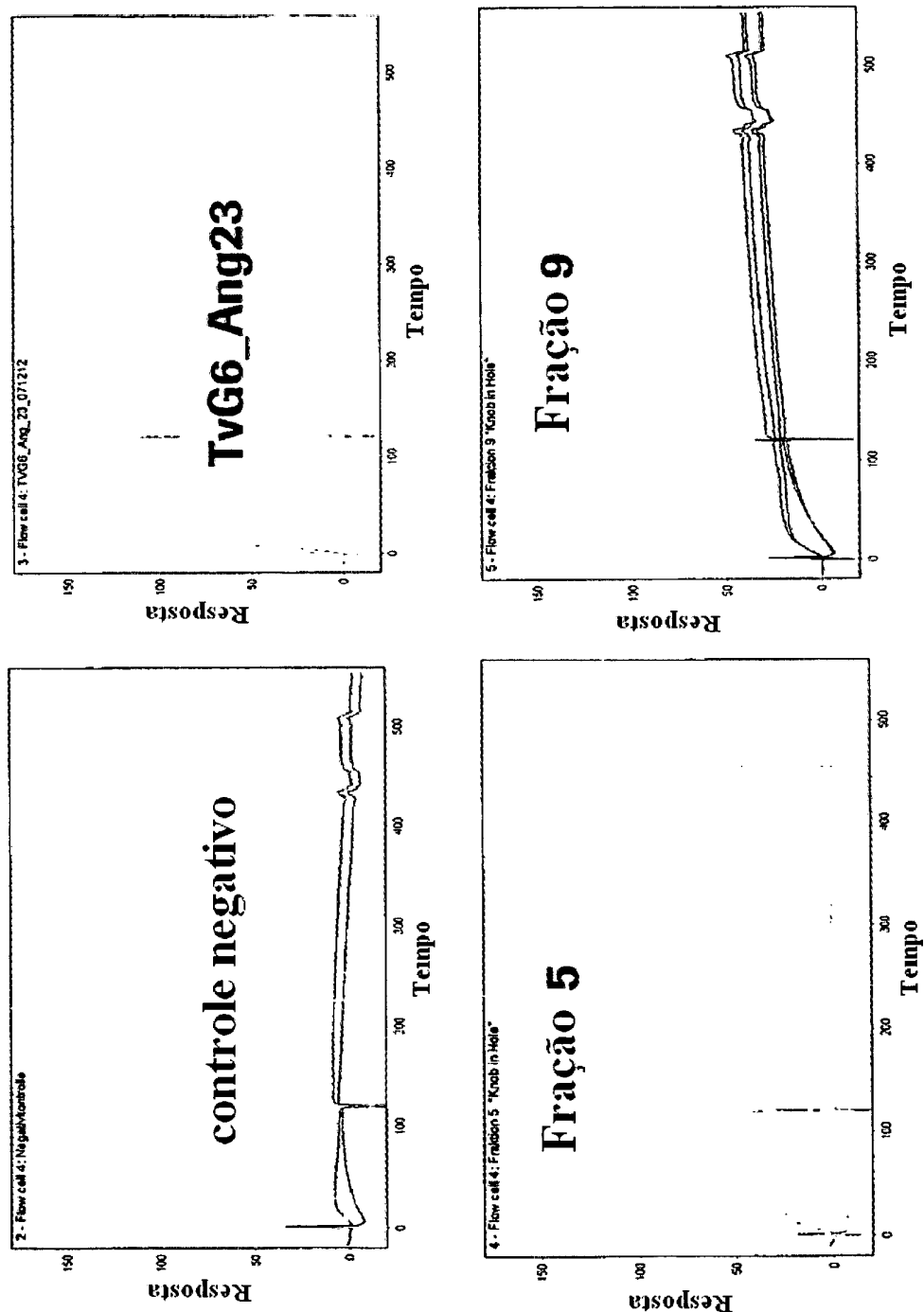


Figura 29

Figura 30

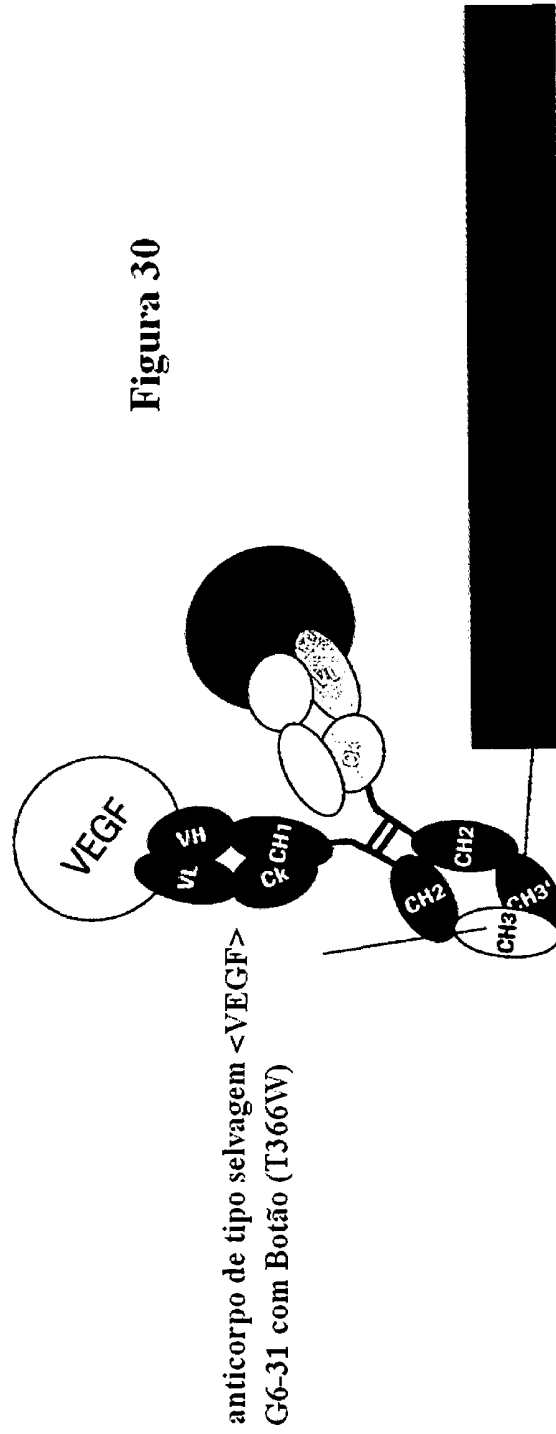


Figura 31

