



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

**(11) BR 112012015740-0 B1**



**(22) Data do Depósito:** 23/12/2010

**(45) Data de Concessão:** 29/09/2020

---

**(54) Título:** ANTICORPO ANTI-FLT3, SEU USO, BEM COMO COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O REFERIDO ANTICORPO E MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO

**(51) Int.Cl.:** C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 35/00; A61P 35/02.

**(30) Prioridade Unionista:** 23/12/2009 US 61/289,529.

**(73) Titular(es):** SYNIMMUNE GMBH.

**(72) Inventor(es):** LUDGER GROSSE-HOVEST; HANS-JÖRG BÜHRING; MARTIN HOFMANN; STEFFEN AULWURM; GRUNDRAM JUNG.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2010070659 de 23/12/2010

**(87) Publicação PCT:** WO 2011/076922 de 30/06/2011

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 25/06/2012

**(57) Resumo:** ANTICORPOS DE ANTI-FLT3 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a anticorpos de anti-FLT3 com uma região de Fc modificada compreendendo as substituições de aminoácidos 239D e 332E para aumentar citotoxicidade de célula dependente de anticorpo (ADCC) desses anticorpos. A invenção ulteriormente refere-se a composições farmacêuticas contendo esses anticorpos, ácidos nucleicos que codificam esses anticorpos bem como métodos de uso de tais anticorpos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANTI-CORPO ANTI-FLT3, SEU USO, BEM COMO COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O REFERIDO ANTICORPO E MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO"**.

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção está no campo de anticorpos e refere-se a anticorpos específicos de FLT3 com uma região de Fc modificada para gerar ou aumentar citotoxicidade de célula dependente de anticorpo (ADCC) bem como métodos de usando-se tais anticorpos.

Antecedentes da Invenção

[0002] O receptor de tirosina quinase FLT3 expresso sobre a superfície de célula de células progenitoras hematopoiéticas desempenha um papel importante em hematopoiese precoce. Devido a seu papel essencial na regulação de sobrevivência, proliferação, e diferenciação de células hematopoiéticas (células B e T), atividade de FLT3 anômala está envolvida no desenvolvimento e progressão de cânceres do sistema hematopoiético. Por exemplo, duplicações tandem internas de FLT3 são as mutações mais comuns associadas a leucemia mielógena aguda (AML). Há assim necessidade na técnica para anticorpos que podem especificamente direcionar e destruir células de expressão de FLT3.

[0003] Assim, um objetivo dos inventores da presente invenção foi prover anticorpos de anti-FLT3 que podem se ligar a e matar Células de expressão de FLT3 in vivo.

Sumário da Invenção

[0004] A presente invenção refere-se a anticorpos dirigidos contra tirosina quinase de receptor humano FLT3 e métodos de uso dos mesmos. Em certos aspectos, os anticorpos incluem uma região de Fc de variante. Em outras concretizações, os anticorpos são anticorpos quiméricos ou humanizados. A presente invenção ulteriormente refere-

se a composições farmacêuticas compreendendo esses anticorpos e métodos de uso dos anticorpos em várias indicações de doença.

[0005] Em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a um anticorpo que liga tirosina quinase de receptor humano FLT3, em que o dito anticorpo compreende uma cadeia pesada e/ou uma cadeia leve e tem pelo menos uma substituição de aminoácido na região constante em relação a um anticorpo de anti-FLT3 de origem, em que a dita pelo menos uma substituição de aminoácido inclui a substituições de aminoácidos 239D e 332E, em que a numeração posicional está de acordo com o índice de EU (Kabat e outros, 1983). Em um aspecto específico, as substituições são S239D e I332E.

[0006] Em uma concretização da invenção, o anticorpo de anti-FLT3 tem atividade de matar célula, tal como, por exemplo, função efetora de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC). Aquele significa que no contato com células de expressão de FLT3, o anticorpo é capaz de facilitar morte de célula, por exemplo, por disparo da ativação do sistema de complemento, fagocitose ou apoptose.

[0007] Em uma concretização, o anticorpo compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve. A cadeia pesada pode compreender uma região de CDR1 de VH, de CDR2 de VH, e de CDR3 de VH e/ou a cadeia leve pode compreender uma região de CDR1 de VL, de CDR2 de VL, e/ou a CDR3 de VL.

[0008] Em uma concretização específica, uma CDR1 de VL compreende, consiste essencialmente em ou consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 7; uma CDR2 de VL compreende, consiste essencialmente em ou consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 8; uma CDR3 de VL

compreende, consiste essencialmente em ou consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 e SEQ ED NO: 9; uma CDR1 de VH compreende, consiste essencialmente em ou consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 10; a CDR2 de VH compreende, consiste essencialmente em ou consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 11; e a CDR3 de VH compreende, consiste essencialmente em ou consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 12.

[0009] Em uma outra concretização específica, a CDR1 de VL compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 1; a CDR2 de VL compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 2; a CDR3 de VL compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 3; a CDR1 de VH compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 4; a CDR2 de VH compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 5; e a CD3 de VH compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 6.

[00010] Em ainda uma outra concretização específica, a CD1 de VL compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 7; a CDR2 de VL compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 8; a CDR3 de VL compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada

na SEQ ID NO: 9; a CDR1 de VH compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 10; a CDR2 de VH compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 11; e a CDR3 de VH compreende, consiste essencialmente em ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 12.

[00011] Em uma concretização da invenção, a cadeia pesada do anticorpo inventado compreende um domínio de VH compreendendo, que consiste essencialmente em ou que consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 14 e/ou a cadeia leve do anticorpo inventado compreende um domínio de VL compreendendo, que consiste essencialmente em ou que consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 13.

[00012] Em uma outra concretização da invenção, a cadeia pesada do anticorpo inventado compreende um domínio de VH compreendendo, que consiste essencialmente em ou que consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 30 e/ou a cadeia leve do anticorpo inventado compreende um domínio de VL compreendendo, que consiste essencialmente em ou que consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 29.

[00013] Em uma outra concretização da invenção, o anticorpo reivindicado é um anticorpo quimérico e compreende uma cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 27 e/ou uma cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 23.

[00014] Em uma outra concretização da invenção, o anticorpo reivindicado é um anticorpo quimérico e compreende uma cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 43 e/ou uma cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 39.

[00015] Em certas concretizações da invenção, o anticorpo da invenção compreendendo substituições de aminoácidos S239D/I332E se liga com afinidade aumentada para o receptor de FcR11a ou tem função efetora ADCC aumentada quando comparada com o anticorpo de origem sem a dita substituição. Neste contexto, o termo "aumentado" inclui argumentos onde o anticorpo de origem não mostra qualquer função efetora de ADCC experimentalmente verificável de modo que o anticorpo otimizado por Fc precocemente gerado exhibe, pela primeira vez e em contraste com o anticorpo de origem a partir do qual ele pode ser derivado, função efetora de ADCC.

[00016] Em outras concretizações, o anticorpo compreende uma ou mais outras modificações de aminoácido a uma posição selecionada do grupo que consiste em 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 336, e 337, em que a numeração posicional está de acordo com o índice de EU. Essas uma ou mais outras modificações de aminoácido podem ser selecionadas do grupo de substituições de aminoácidos que consiste em 221K, 221Y, 222E, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225K, 225W, 227E, 227G, 227K, 227Y, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231E, 231G, 231K, 231P, 231Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 233A, 233D, 233F, 233G, 233H, 233I, 233K, 233L, 233M, 233N, 233Q, 233R, 233S, 233T, 233V, 233W, 233 Y, 234A, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234P, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234V, 234W, 234Y, 235A, 235D, 235E, 235F, 235G, 235H, 235I, 235K, 235M, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235T, 235V, 235W, 235Y, 236A, 236D,

236E, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236N, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 237D, 237E, 237F, 237H, 237I, 237K, 237L, 237M, 237N, 237P, 237Q, 237R, 237S, 237T, 237V, 237W, 237Y, 238D, 238E, 238F, 238G, 238H, 238I, 238K, 238L, 238M, 238N, 238Q, 238R, 238S, 238T, 238V, 238W, 238Y, 240A, 240I, 240M, 240T, 241D, 241E, 241L, 241R, 241S, 241W, 241Y, 243E, 243H, 243L, 243Q, 243R, 243W, 243Y, 244H, 245A, 246D, 246E, 246H, 246Y, 247G, 247V, 249H, 249Q, 249Y, 255E, 255Y, 258H, 258S, 258Y, 260D, 260E, 260H, 260Y, 262A, 262E, 262F, 262I, 262T, 263A, 263I, 263 M, 263T, 264A, 264D, 264E, 264F, 264G, 264H, 264I, 264K, 264L, 264M, 264N, 264P, 264Q, 264R, 264S, 264T, 264W, 264Y, 265F, 265G, 265H, 265I, 265K, 265L, 265M, 265N, 265P, 265Q, 265R, 265S, 265T, 265V, 265W, 265Y, 266A, 266I, 266M, 266T, 267D, 267E, 267F, 267H, 267I, 267K, 267L, 267M, 267N, 267P, 267Q, 267R, 267T, 267V, 267W, 267Y, 268D, 268E, 268F, 268G, 268I, 268K, 268L, 268M, 268P, 268Q, 268R, 268T, 268V, 268W, 269F, 269G, 269H, 269I, 269K, 269L, 269M, 269N, 269P, 269R, 269S, 269T, 269V, 269W, 269Y, 270F, 270G, 270H, 270I, 270L, 270M, 270P, 270Q, 270R, 270S, 270T, 270 W, 270 Y, 271 A, 271 ID, 271 E, 271F, 271G, 271H, 271I, 271K, 271L, 271 M, 271N, 271Q, 271R, 271S, 271T, 271V, 271W, 271Y, 272D, 272F, 272G, 272H, 272I, 272K, 272L, 272M, 272P, 272R, 272S, 272T, 272V, 272W, 272Y, 273I, 274D, 274E, 274F, 274G, 274H, 274I, 274L, 274M, 274N, 274P, 274R, 274T, 274V, 274W, 274Y, 275L, 275W, 276D, 276E, 276F, 276G, 276H, 276I, 276L, 276M, 276P, 276R, 276S, 276T, 276V, 276W, 276Y, 278D, 278E, 278G, 278H, 278I, 278K, 278L, 278M, 278N, 278P, 278Q, 278R, 278S, 278T, 278V, 278W, 280G, 280K, 280L, 280P, 280W, 281D, 281E, 281K, 281N, 281P, 281Q, 281 Y, 282E, 282G, 282K, 282P, 282Y, 283G, 283H, 283K, 283L, 283P, 283R, 283Y, 284D, 284E, 284L, 284N, 284Q, 284T,

284Y, 285D, 285E, 285K, 285Q, 285W, 285Y, 286E, 286G, 286P, 286Y, 288D, 288E, 288 Y, 290D, 290H, 290L, 290N, 290W, 29 ID, 291E, 291 G, 291H, 2911, 291Q, 291T, 292D, 292E, 292T, 292Y, 293F, 293G, 293H, 2931, 293L, 293M, 293N/293P, 293 R, 293S, 293T, 293V, 293 W, 293 Y, 294F, 294G, 294H, 2941, 294K, 294L, 294M, 294P, 294R, 294S, 294T, 294V, 294W, 294Y, 295D, 295E, 295F, 295G, 295H, 2951, 295M, 295N, 295P, 295R, 295S, 295T, 295V, 295W, 295 Y, 296A, 296D, 296E, 296G, 296H, 2961, 296K, 296L, 296M, 296N, 296Q, 296R, 296S, 296T, 296V, 297D, 297E, 297F, 297G, 297H, 2971, 297K, 297L, 297M, 297P, 297Q, 297R, 297S, 297T, 297V, 297W, 297Y, 298A, 298D, 298E, 298F, 298H, 2981, 298K, 298M, 298N, 298Q, 298R, 298T, 298W, 298Y, 299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 2991, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W, 299Y, 300A, 300D, 300E, 300G, 300H, 300K, 300M, 300N, 300P, 300Q, 300R, 300S, 300T, 300V, 300W, 301D, 301E, 301H, 301Y, 3021, 303D, 303E, 303Y, 304D, 304H, 304L, 304N, 304T, 305E, 305T, 305Y, 313F, 317E, 317Q, 318H, 318L, 318Q, 318R, 318Y, 320D, 320F, 320G, 320H, 3201, 320L, 320N, 320P, 320S, 320T, 320V, 320W, 320Y, 322D, 322F, 322G, 322H, 322[lota], 322P, 322S, 322T, 322V, 322W, 322Y, 3231, 324D, 324F, 324G, 324H, 3241, 324L, 324M, 324P, 324R, 324T, 324V, 324W, 324Y, 325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H, 3251, 325K, 325L, 325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V, 325W, 325 Y, 326E, 3261, 326L, 326P, 326T, 327D, 327E, 327F, 327H, 3271, 327K, 327L, 327M, 327, 327P, 327R, 327S, 327T, 327V, 327W, 327Y, 328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 3281, 328K, 328M, 328N, 328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 329D, 329E, 329F, 329G, 329H, 329I, 329K, 329L, 329M, 329N, 329Q, 329R, 329S, 329T, 329V, 329, 329Y, 330E, 330F, 330G, 330H, 330I, 330L, 330M, 330N, 330P, 330R, 330S, 330T, 330V, 330W, 330Y, 331D, 331F, 331H, 331I,



331L, 331M, 331Q, 331R, 331T, 331V, 331W, 331Y, 333A, 333F, 333H, 333I, 333L, 333M, 333P, 333T, 333Y, 334A, 334F, 334I, 334L, 334P, 334T, 335D, 335F, 335G, 335H, 335I, 335L, 335M, 335N, 335P, 335R, 335S, 335V, 335W, 335Y, 336E, 336K, 336Y, 337E, 337H, e 337N, em que a numeração posicional está de acordo com o índice de EU.

[00017] Em uma outra concretização, a uma ou mais outras modificações de aminoácido estão a uma posição selecionada do grupo que consiste em 221, 222, 223, 224, 225, 228, 230, 231, 232, 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 299, 302, 304, 313, 323, 325, 328, e 336, em que a numeração posicional está de acordo com o índice de EU. Em tal concretização, a(s) uma ou mais outras modificações de aminoácidos podem ser selecionadas do grupo de substituições de aminoácidos que consiste em 221K, 221Y, 222E, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225K, 225W, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231 E, 231 G, 231 K, 231 P, 231 Y, 232E, 232G, 232K, 232 Y, 240A, 240I, 240M, 240T, 244H, 245A, 247G, 247V, 262 A, 262E, 262F, 262I, 262T, 263A, 263I, 263M, 263T, 266A, 266I, 266M, 266T, 271 A, 271 D, 271 E, 271 F, 271G, 271 H, 271I, 271K, 271 L, 271M, 271N, 271Q, 271R, 271S, 271T, 271V, 271W, 271Y, 273I, 275L, 275W, 281 D, 281 E, 281 K, 281 N, 281P, 281Q, 281 Y, 284D, 284E, 284L, 284N, 284Q, 284T, 284Y, 291D, 291E, 291G, 291H, 291I, 291Q, 291T, 299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W, 299Y, 304D, 304H, 304L, 304N, 304T, 313F, 323I, 325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H, 325I, 325K, 325L, 325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V, 325 W, 325 Y, 328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 328I, 328K, 328M, 328N, 328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 336E, 336K, e 336Y.

[00018] Em uma concretização específica, o anticorpo compreende

uma ou mais outras modificações de aminoácido selecionada do grupo que consiste em: 236 A, 268D, 268E, 330Y, e 330L.

[00019] Em um outro aspecto, a presente invenção retrata moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia pesada e/ou a cadeia leve de um anticorpo da invenção. Essas moléculas de ácido nucleico podem compreender uma sequência de nucleotídeos que codifica o domínio variável da cadeia leve, tal como aquela indicada na SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 33, ou uma sequência de nucleotídeos que codifica o domínio variável da cadeia pesada, tal como aquela indicada na SEQ ID NO: 18 ou SEQ ID NO: 34.

[00020] Em um aspecto específico, o ácido nucleico que codifica a cadeia leve do anticorpo da invenção tem uma sequência de nucleotídeos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nos. 24 e 40.

[00021] Em uma outra concretização específica, o ácido nucleico que codifica a cadeia pesada do anticorpo da invenção tem uma sequência de nucleotídeos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nos. 28 e 44.

[00022] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de tratamento de um distúrbio ou uma doença relacionada com FLT3 de tirosina quinase de receptor humano, em que o dito método inclui administração do anticorpo da invenção a um indivíduo que necessita do mesmo. O indivíduo pode, por exemplo, ser um animal ou ser humano, de preferência um mamífero, tal como um ser humano.

[00023] Em uma concretização, a dita distúrbio ou doença é um distúrbio ou doença proliferativa de célula.

[00024] Em uma outra concretização, a doença ou o distúrbio é um tumor de origem hematopoiética, tal como um linfoma ou leucemia. O linfoma ou leucemia pode ser selecionado do grupo que consiste em: linfomas de não Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia/linfoma linfoblástica aguda de célula B (B-ALL), linfoma de

célula de manto (MCL), leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia mieloide crônica (CML), leucemia mieloide aguda, e mieloma múltiplo (MM). Em uma concretização preferida, o linfoma é leucemia mieloide aguda (AML).

[00025] Em uma outra concretização, a doença ou distúrbio é uma síndrome mielodisplasia (MDS).

[00026] Em várias concretizações, o linfoma ou leucemia está no estágio de doença residual mínima (MRD), por exemplo, alcançado depois da quimioterapia convencional com ou sem o transplante de células-tronco.

[00027] Em certas concretizações dos métodos inventados, o anticorpo pode ser administrado em combinação com pelo menos um agente selecionado do grupo que consiste em um agente citotóxico, um agente quimioterapêutico, uma citocina, um agente inibitório de crescimento, um agente anti-hormonal, um inibidor de quinase, um agente anti-angiogênico, um cardioprotetor, um agente imunoestimulatório, um agente imunossupressivo, um inibidor de angiogênese, um inibidor de tirosina quinase de proteína, e anticorpo secundário.

[00028] Em ainda um outro aspecto, a presente invenção também inclui uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo de acordo com a invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável.

[00029] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de inibição de proliferação de uma célula que expressa FLT3, em que o dito método compreende o contato da dita célula com um anticorpo de acordo com a invenção. O método pode ser um método in vitro.

[00030] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de aumento de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo em relação a uma célula que expressa FLT3, em que o dito método compreende o contato da dita célula com um anticorpo de

acordo com a invenção.

[00031] Ainda um outro aspecto da invenção é um método de depleção de um mamífero de pelo menos uma célula que expressa FLT3, em que o dito método compreende administração ao mamífero de um anticorpo de acordo com a invenção.

[00032] A presente invenção também refere-se ao usando-se um anticorpo de acordo com a presente invenção para o tratamento de um distúrbio ou doença relacionada com FLT3. O distúrbio ou doença relacionada com FLT3 pode ser uma doença ou distúrbio proliferativo de célula, tal como tumor de origem hematopoiética, por exemplo um linfoma ou leucemia, ou síndrome mielodisplasia (MDS). O linfoma ou leucemia pode ser selecionado do grupo que consiste em: linfomas de não Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma de leucemia linfoblástica aguda de célula B (B-ALL), linfoma de célula de manto (MCL), leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia mieloide crônica (CML), leucemia mieloide aguda (AML), e mieloma múltiplo (MM) e de preferência é leucemia mieloide aguda.

[00033] Em uma outra concretização, a invenção refere-se ao usando-se um anticorpo de acordo com a invenção para o direcionamento de uma célula que expressa FLT3. O direcionamento pode incluir o uso do anticorpo para fornecer um fármaco ou uma toxina à célula de expressão de FLT3.

[00034] Em ainda um outro aspecto, a invenção inclui o usando-se um anticorpo de acordo com a invenção para a detecção de uma célula que expressa FLT3 em uma amostra biológica. Para tal uso, o anticorpo pode ser marcado com uma porção detectável, tais como fluoróforo, cromóforo, etiqueta imunogênica e similares.

[00035] A presente invenção também refere-se a um anticorpo monoclonal contra FLT3, em que o anticorpo é produzido por uma linha de célula produtora transfectada, tal como CHO ou Sp2/0.

[00036] Em ainda um outro aspecto, a invenção retrata uma linha de célula transfectada que produz um anticorpo de acordo com a invenção.

#### Breve Descrição dos Desenhos

[00037] A invenção será melhor entendida com referência à descrição detalhada quando considerada em combinação com os exemplos não limitantes e os desenhos anexos.

[00038] Figura 1 mostra uma representação esquemática do procedimento de clonagem para quimerização de anticorpos monoclonais. Caixas representam éxons, círculo indicam elementos aumentadores e regiões de UT de linhas finas e sequências de íntrons. P, promotor; Li e L2, sequências líder codificadas por dois éxons diferentes; E, aumentador; V, região variável; D, região de diversidade; J, região de união; C(1-3) éxons da região constante; H, região principal.

[00039] Figura 2 mostra o vetor parental contendo a região VJ da cadeia leve de camundongo e a região C de gene kapa de ser humano. A região relevante para a troca de fragmentos é mostrada aumentada na Figura 2A. O contexto de sequência gerado na inserção da região VJ de anticorpos monoclonais BV10 ou 4G8 para dentro do vetor de expressão chimFLT3 -leve é mostrado na Figura 2B. O sítio de clivagem para peptídeos de sinal secretórios é indicado por |; e fronteiras de éxon-íntron por [, ].

[00040] Figura 3 mostra o vetor original contendo a cadeia pesada de Ig de isótipo de  $\gamma$  1 de ser humano. A região relevante para a clonagem do fragmento de VDJ é mostrada aumentada (a). O fragmento de M $\mu$ l-Spel a ser trocado (mostrado aumentado como b) contém a região constante inteira da cadeia pesada de  $\gamma$  1 de ser humano e duas modificações de aminoácido no domínio de CH2 como indicadas (Ser239-Asp; Iso332-Glu). Figura 3B mostra o contexto de sequência gerado na inserção da região VDJ da cadeia pesada de anticorpos

monoclonais BV10 ou 4G8 para dentro do vetor de expressão de cadeia pesada chimFLT3-pesada. O sítio de clivagem para peptídeos de sinal secretórios é indicado por |; e fronteiras de éxon-íntron por [, ].

[00041] Figura 4 mostra os efeitos de matança de célula dos anticorpos quiméricos otimizados por Fc chim4G8-SDIE (A) e chimBVIO-SDIE (B) respectivamente e PBMCs de ser humano não estimuladas contra células de leucemia de NALM16 de ser humano de expressão de FLT3 cultivadas em comparação com os anticorpos quiméricos não modificados chim4G8 e chimBVIO. Fig. 4 C mostra os efeitos de matança de célula de anticorpos quiméricos dirigidos a NG2 que foi otimizado por Fc nas mesmas posições como os anticorpos acima chim4G8-SDIE e chimBVIO-SDIE sobre células de SKMel63-melanoma de ser humano. Citotoxicidade foi determinada usando-se um ensaio de liberação de cromo, duração do ensaio e razões efetoras alvo são indicadas.

[00042] Figura 5 mostra o efeito de matança de célula pelos 4G8-SDIE e PBMCs de anticorpo de anti-FLT3 otimizados de ser humano não estimulados em células precursoras imaturas de AML em comparação com o anticorpo de camundongo parental não modificado.

[00043] Figura 6 mostra um alinhamento de sequência de aminoácidos das regiões de cadeia variáveis do anticorpo de cadeia leve (A) e pesada (B) de clones 4G8 e BV10 de anti-FLT3.

[00044] Figura 7 mostra a ligação de 4G8 e BV10 otimizado e quimérico de camundongo a FLT3. Células de NALM16 (B, C) ou células de Sp2/0 transfectadas com mock e FLT3 (A) foram incubadas com os anticorpo indicados e foram analisadas por imunofluorescência indireta e citometria de fluxo. Histogramas abertos e sombreados em (A) representam manchamento com controle de isótipo e os anticorpos de FLT3 indicados (10 µg/ml), respectivamente. MFI=intensidade de fluorescência média.

[00045] Figura 8 mostra o efeito de 4G8SDIEM sobre proliferação e ligação de ligante de FLT3 (FLT3L) de células leucêmicas. (A) células de NALM16 foram incubadas com 4G8SDIEM ou BV10SDIEM a 1 g/ml na presença das concentrações indicadas do ligante de FLT3 recombinante e a quantidade de anticorpo ligado foi determinada por citometria de fluxo e imunofluorescência indireta. (B) Células precursoras imaturas de AML isoladas do sangue periférico dos três pacientes diferentes por densidade, centrifugação de gradiente foram incubadas com as concentrações indicadas de 4G8SDIEM por 24 horas e proliferação foi avaliada usando-se um ensaio de captação de 3[H]-timidina. Barras à direita representam proliferação na ausência do anticorpo.

[00046] Figura 9 mostra atividade de ADCC de versões modificadas por SDIEM e não modificadas dos anticorpos de FLT3 4G8 e BV10. Células de NALM16 marcadas com 51 [Cr] foram incubadas por 4 horas com PBMCs de um doador saudável (#4) na presença das concentrações indicadas das versões modificadas por SDIEM ou quiméricas ( $\chi$ ) não modificadas de 4G8 e BV10 em uma razão de PBMC: célula alvo 50:1. Morte das células alvo foi determinada usando-se ensaio de liberação 51 [Cr] padrão. Um resultado representativo resulta de 6 experiência independentes com PBMCs oriundos de doadores saudáveis é mostrada.

[00047] Figura 10 mostra a atividade de ADCC de 4G8SDIEM contra células leucêmicas. Atividade citolítica das PBMCs de três doadores saudáveis diferentes (PBMC #1, #2, #3) contra células de NALM16 (A) e das PBMCs de doador #2 contra células precursoras imaturas leucêmicas dos três pacientes diferentes (AML #1, #2, #7) (B) foi determinada em um ensaio de liberação de 51 [Cr] por 4 horas e 8 horas, respectivamente. No (C) a atividade citolítica depois de 8 horas contra AML células precursoras imaturas #1 e #15 é mostrada usando-se PBMCs autólogas dos pacientes respectivos como células efectoras.



Símbolos enchidos ou abertos indicam ADCC mediada por 4G8SDIEM e anticorpo de controle de não ligação 9.2.27SDIE, respectivamente. Barras enchidas à direita (NK) indicam atividade de NK na ausência de anticorpo. Observar que PBMC #1-3 referem-se a PBMCs de doadores saudáveis e não estão relacionados com células precursoras imaturas de AML #1-3.

[00048] Figura 11 mostra mudança de antígeno e expressão de FLT3 em células leucêmicas de células de NALM16 de origem diferente (A) e células precursoras imaturas de dois pacientes de AML diferentes foram incubadas com as concentrações indicadas de 4G8SDIEM. Depois de 48 horas células foram incubadas, foram reincubadas com 2 µg/ml de 4G8SDIEM e foram analisadas por citometria de fluxo e imunofluorescência indireta. Expressão de FLT3 mostradas nas células pré-incubadas sem anticorpos foi definida como 100%. (B) Células precursoras imaturas AML oriundas de 15 pacientes foram incubadas com 4G8 de camundongo (10 g/ml), foram lavadas e foram analisadas por citometria de fluxo e imunofluorescência indireta. A quantidade de moléculas de anticorpo ligadas foi determinada por comparação com contas calibradas (QIFIKIT). (C) A célula precursora imatura de AML usada em (B) foi incubada com anticorpo de 9.2.27SDIE conjugado por PE de não ligação ou 4G8SDIEM conjugado por PE (10 µg/ml) foi analisado por citometria de fluxo de imunofluorescência direta. SFI=índice de fluorescência específica. O SFI de quatro amostras não foi determinado (n.d.) por causa da alta ligação do anticorpo de controle de 9.2.27SDIE.

[00049] Figura 12 mostra a expressão de FLT3 em DCs e células de medula óssea normais. (A) DCs isolados do sangue periférico de doadores saudáveis por separação de célula magnética foram incubados com 4G8 de camundongos, foram lavados, foram manchados com um anticorpo secundário marcado, foram lavados novamente e foram



incubados com uma mistura de anticorpos de CD11c- e CD303 diferentemente marcados. Células foram então analisadas por citometria de fluxo. Ligação de 4G8 ao CD303+ pDC e a subpopulação de CD11c+ niDC é mostrada em (B) e (C), respectivamente. (D,E) Similar a células de medula óssea normais (A-C) isoladas por densidade centrifugação de gradiente foram incubadas com 4G8 de camundongo, foram lavadas, foram manchadas com anticorpo secundário marcado e uma mistura de anticorpos de CD34 e CD45 diferentemente marcados. Ligação de 4G8 à baixa subpopulação de CD34+ é mostrada em (E). Histogramas sombreados representam manchamento primário com controle de isótopo, histogramas abertos com 4G8 de camundongo. Resultados representativos de uma das três experiências com DCs e células de medula óssea oriundas de diferentes doadores saudáveis são mostradas.

[00050] Figura 13 mostra a atividade citotóxica de 4G8SDIEM contra células normais. (A) Células de medula óssea de ser humano oriundas de dois doadores saudáveis diferentes (barras pretas e sombreadas) foram incubadas com 5 µg/ml de 4G8 SDIEM e unidades formadoras de colônia determinadas depois de 12 dias de incubação de meio semissólido. Números de CFUs estavam relacionados com controles não tratados. (B) DCs isolados das PBMCs de doadores saudáveis por separação de célula magnética e células de NALM16 foram usadas como alvos para 4G8 SDIEM em um ensaio de liberação de <sup>51</sup>[Cr] por quatro horas (razão de PBMC:alvo 100:1). Uma experiência representativa das três com DCs e PBMCs autólogas oriundas de doadores diferentes é mostrada.

[00051] Figura 14 mostra os efeitos in vitro de anticorpo de 4G8 em um paciente alvo e células efetoras. (A) PBMC de paciente foram analisadas por FACS quanto a expressão de FLT3 usando-se o controle de isótopo e anticorpo de 4G8 de camundongo parental seguido por

conjugado de PE de anticamundongo e manchamento duplo para CD34. (B, C) PBMC de paciente foram incubadas com células de NALM16 positivas a FLT3 marcadas com cromo (B) ou células precursoras imaturas de paciente isoladas por seleção de CD34+ (C). Células alvo foram pré-tratadas com as concentrações indicadas of 4G8-SDIEM ou o anticorpo de 4G8 quimérico, não modificado (4G8-ch). Indução de ADCC foi determinada por ensaios de liberação de cromo em uma razão de PBM:alvo de 50:1. Observar que PBMC e células de NK não purificadas foram utilizadas.

[00052] Figura 15 mostra a semivida e características de ligação de 4G8-SDIEM in vivo. (A) Semivida de soro de 4G8-SDIEM foi determinada por incubação de células de NALM16 de expressão de FLT3 com amostras de soro em pontos de tempo diferentes de aplicação clínica. A quantidade de anticorpo especificamente ligado foi determinada por FACS e comparação com atividade de ligação de amostras de soro contendo níveis definidos de 4G8-SDIEM. ND, não determinada. (B) Para detectar ligação de 4G8-SDIEM in vivo, BM células precursoras imaturas obtidas antes da terapia (d0) e 1 h depois da aplicação da dose de 10 mg (d5) foram incubadas com o anticorpo de camundongo de 4G8 parental, um segundo anticorpo de anti-FLT3 de não cruzadamente reativo (BV10) como indicado, ou controle de isótipo (picos abertos) a 10 µg /ml, seguido por um conjugado por um conjugado de PE de anticamundongo absorvido de ser humano. Inibição completa de 4G8 de camundongo, mas não ligação de BV10 como determinada por FACS indica saturação de ligação de 4G8-SDIEM.

[00053] Figura 16 mostra os efeitos clínicos de 4G8-SDIEM. (A, B) As percentagens de células precursoras imaturas CD34+ (círculos aberto) e células de (CD69+) CD56+CD3-NK ativadas (diamantes) entre células mononucleares em sangue periférico (PB) (A) ou medula óssea (BM) (B) foram determinadas por FACS no tempo indicado du-

rante o tratamento de leucemia evidente (C) Níveis de soro de TNF nos tempos indicados durante o tratamento de leucemia evidente foram determinados por medição de IMMULITE<sup>(R)</sup>. (D) A percentagem de células de NK ativadas entre células mononucleares em PB (diamantes) e níveis de soro de TNF (círculos) foram determinados como descritos acima nos tempos indicados durante a aplicação de 4G8-SDIEM na remissão completa (CR).

#### Descrição Detalhada da Invenção

[00054] Os termos usados aqui têm, a não ser de outra maneira explicitamente afirmado, os seguintes significados.

[00055] Por "ADCC" ou "citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo" como usado aqui quer se dizer que a reação mediada por célula em que células citotóxicas que expressam FcRs reconhecem anticorpo ligado em uma célula alvo e subsequentemente causam lise da célula alvo.

[00056] Por "ADCP" ou "fagocitose mediada por célula dependente de anticorpo" como usado aqui quer se dizer que a reação mediada por célula em que células citotóxicas não específicas que expressam FcRs reconhecem anticorpo ligado em uma célula alvo e subsequentemente causam fagocitose da célula alvo.

[00057] Por "aminoácido" e "identidade de aminoácido" como usado aqui quer se dizer que um dos 20 aminoácido de ocorrência natural ou quaisquer análogos não naturais que podem estar presentes em uma posição definida, específica. Assim "aminoácido" como usado aqui é tanto aminoácidos de ocorrência natural ou sintéticos. Por exemplo, homofenilalanina, citrulina e noreleucina são consideradas aminoácidos para as finalidades da invenção. "Aminoácido" também inclui resíduos de iminoácido tais como prolina e hidroxiprolina. A cadeia lateral pode estar ou na configuração (R) ou (S). Em uma concretização, os aminoácidos estão na configuração (S) ou L. Se cadeias laterais de

ocorrência não natural forem carregadas, substituintes de não aminoácido podem ser usados, por exemplo, para prevenir ou retardar degradação in vivo.

[00058] Por "anticorpo" aqui quer se dizer que uma proteína que consiste em um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados pela totalidade ou parte dos genes de imunoglobulina reconhecidos. Os genes de imunoglobulina reconhecidos, por exemplo, em seres humanos, incluem os locais genéticos capa ( $\kappa$ ), lambda ( $[\lambda]$ ), e locais genéticos de cadeia pesada, que juntos compreendem os genes de região variável de miríade, e os genes de região constante mu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ), gama ( $\gamma$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), e alfa ( $\alpha$ ) que codificam os isótipos de Ig, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), IgE, e IgA (IgA1 e IgA2) respectivamente. Anticorpo aqui destina-se a incluir anticorpos de comprimento total e fragmentos de anticorpo, e podem referir-se a anticorpo natural a partir de qualquer organismo, um anticorpo engenheirado, ou um anticorpo gerado recombinantemente para as finalidades experimentais, terapêuticas ou outras finalidades.

[00059] Por "célula B" ou "linfócito B" como usado aqui quer se dizer que um tipo de linfócito desenvolvido na medula óssea que circula no sangue e na linfa, e provê imunidade humoral. Células B reconhecem moléculas de antígeno livres e diferenciam ou maturam em células de plasma que secretam imunoglobulina (anticorpos) que inativam os antígenos. Células de memória são também geradas para produzir a imunoglobulina específica (anticorpo) nos encontros subsequentes com tal antígeno. Células B são também conhecidos como "células beta" na ilhota de Langerhans.

[00060] Por "célula T" ou "linfócito T" como usado aqui quer se dizer que um tipo de linfócito desenvolvido na medula óssea que circula no sangue e na linfa, e provê imunidade celular. Células T compreendem um receptor de célula T que reconhece moléculas de antígeno ligadas

à célula. Células T podem amadurecer em células T auxiliares que secretam citocinas e ativam outros tipos de célula ou células T citotóxicas que se ligam a e destroem outras células.

[00061] Por "FLT3" (receptor-3 de tirosina quinase de tipo fms), "FLK2" (quinase-2 de fígado fetal), e "CD 135" são usados intercambiavelmente aqui quer se dizer que um receptor de citocina expresso na superfície de células progenitoras hematopoiéticas. FLT3 é um marcador de superfície de célula usado para identificar certos tipos de progenitores hematopoiéticos (sangue) na medula óssea. Especificamente, progenitores multipotentes (MPP) e progenitores linfoides comuns (CLP) expressam altos níveis de superfície de FLT3. O receptor de FLT3 está ligado pelo ligante de Flt3 de citocina (Flt3L). FLT3 é uma tirosina quinase de receptor tipo III. Quando esse receptor é ligado por Flt3L ele forma um dímero (homodímero) que ativa sinalização de segundo mensageiro. Sinalização de FLT3 desempenha um papel importante na sobrevivência, proliferação, e diferenciação de célula de desenvolvimento linfócitos (célula B e célula T). Como desregulação de sinalização de FLT3 pode causar doenças proliferativas, tal como câncer, e em particular leucemia, FLT3 é classificado como um proto-oncogene. De fato, duplicações tandem internas de FLT3 são as mutações mais comuns associadas à leucemia mielógena aguda (AML). O uso de FLT3 aqui destina-se a incluir todos os alelos conhecidos ou ainda não revelados e formas polimórficas de FLT3. A sequência de antígeno de FLT3 de ser humano é provida na SEQ ID NO: 65.

[00062] Por "CDC" ou "citotoxicidade dependente de complemento" como usado aqui quer se dizer que a reação em que um ou mais componentes de proteína complementar reconhecem anticorpo ligado em uma célula alvo e subsequentemente causam lise da célula alvo.

[00063] Por "região constante" de um anticorpo como definida aqui quer se dizer que a região do anticorpo que é codificada por um dos

genes constantes de região de imunoglobulina de cadeia leve ou pesada.

[00064] Por "cadeia leve constante" ou "região constante de cadeia leve" como usado aqui quer se dizer que a região de um anticorpo codificada pelas cadeias leves  $\kappa$  (C $\kappa$ ) ou  $\lambda$  (C $\lambda$ ). A cadeia leve constante tipicamente compreende um único domínio, e como definida aqui refere-se a posições 108-214 de C $\kappa$  ou  $\lambda$ , em que a numeração está de acordo com o índice de EU.

[00065] Por "cadeia pesada constante" ou "região constante de cadeia pesada" como usado aqui quer se dizer que a região de um anticorpo codificada pelos genes  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , ou  $\epsilon$  para definir o isótipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, ou IgE, respectivamente. Para anticorpos de IgG de comprimento total, a cadeia pesada constante, como definida aqui, refere-se ao N- terminal do domínio de CH1 ao C-terminal do domínio de CH3, assim compreendendo posições 118-447, em que a numeração está de acordo com o índice de EU.

[00066] Por "função efetora" como usado aqui quer se dizer que um evento bioquímico que resulta da interação de uma região de Fc de anticorpo com um receptor ou ligante de Fc. Funções de efector incluem funções de efector mediadas por FcR tais como ADCC e ADCP, e funções de efector mediadas por complemento tal como CDC.

[00067] Por "célula efetora" como usado aqui quer se dizer que uma célula do sistema imune que expressa um ou mais receptores de Fc e media uma ou mais funções de efector. Células de efector incluem mas não são limitadas a monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos, plaquetas, células B, linfócitos granulares grandes, células de Langerhans, células assassinas naturais (NK), e células T e podem ser de qualquer organismo incluindo mas não limitados a seres humanos, camundongos, ratos coelhos, e macacos.

[00068] Por "Fab" ou "região de Fab" como usado aqui quer se dizer que os polipeptídeos que compreendem os domínios de imunoglobulina de VH, CH1, VH, e CL. Fab podem referir-se a essa região no isolamento, ou essa região no contexto de um anticorpo de comprimento total ou fragmento de anticorpo.

[00069] Por "Fc" ou "região de Fc", como usado aqui quer se dizer que o polipeptídeo compreendendo a região constante de um anticorpo excluindo o primeiro domínio de imunoglobulina de região constante. Assim Fc refere-se aos últimos dois domínios de imunoglobulina de região constante de IgA, IgD, e IgG, e os últimos três domínios de imunoglobulina de região constante de IgE e IgM, e N-terminal de articulação flexível a esses domínios. Para IgA e IgM, Fc pode incluir a cadeia J. Para IgG, Fc compreende domínios de imunoglobulina Cy2 e Cy3 e a articulação entre Cy1 e Cy2. Embora os limites da região de Fc possam variar, a região de Fc de cadeia pesada de IgG de ser humano é usualmente definida para conter resíduos C226 ou P230 ao seu terminal de carboxila, em que a numeração está de acordo com o índice de EU como em Kabat. Fc pode referir-se a essa região no isolamento, ou essa região no contexto de um polipeptídeo de Fc, por exemplo um anticorpo.

[00070] Por "polipeptídeo de Fc" como usado aqui quer se dizer que um polipeptídeo que compreende a totalidade ou parte de uma polipeptídeos de Fc de região de Fc incluem fragmentos de Fc, Fcs isolados e fusões de Fc de anticorpos.

[00071] Por "receptor gama de Fc" ou "FcR" como usado aqui quer se dizer que qualquer membro da família de proteínas que se ligam a região de Fc de anticorpo de IgG e são substancialmente codificadas pelo genes de FcR. Em seres humanos essa família inclui mas não é limitada a FcRI (CD64), incluindo isoformas FcRIa, FcRIb, e FcRIc; FcRII (CD32), incluindo isoformas FcRIIa (incluindo alótipos H131 e



R131 ), FcRIIb (incluindo FcRIIb-I e FcRIIb-2), e FcRIIc; e FcRIII (CD 16), incluindo isoformas FcRIIIa (incluindo alótipos V158 e F158) e FcRIIIb (incluindo alótipos FcRIIIb-NA1 e FcRIIIb-NA2) (Jefferis e outros, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65), bem como quaisquer isoformas ou alótipos de FcRs ou FcR de ser humano não revelados. FcyRs de camundongo incluem mas não são limitados a FcRI (CD64), FcyRII (CD32), FRIII (CD16), e FcRIII-2 (CD16-2), bem como quaisquer isoformas ou alótipos FcRs ou FcR de camundongo não revelados. Um FcR pode ser de qualquer organismo, incluindo mas não limitado a seres humanos, camundongos, ratos, coelhos, e macacos.

[00072] Por "ligante de Fc" ou "receptor de Fc" como usado aqui quer se dizer que uma molécula, por exemplo, um polipeptídeo, oriundo de qualquer organismo que liga à região de Fc de um anticorpo para formar um complexo de ligante de Fc. Ligantes de Fc incluem mas não são limitados a FcRs, FcRn, Clq, C3, lecitina de ligação de raan, receptor de manose, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica, e FcR viral. Ligantes de Fc também incluem homólogos de receptor de Fc (FcRH), que são uma família de receptores de Fc que são homólogos aos FcRs (Davis e outros, 2002, *Immunological Reviews* 190:123-136). Ligantes de Fc podem incluir moléculas não reveladas que ligam Fc.

[00073] Por "IgG" como usado aqui quer se dizer que um polipeptídeo que pertence à classe de anticorpos que são substancialmente codificados por um gene de imunoglobulina gama reconhecido. Em seres humanos essa classe compreende IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Em camundongos essa classe compreende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.

[00074] Por "imunoglobulina (Ig)" aqui quer se dizer que uma proteína que consiste em um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados por genes de imunoglobulina. Imunoglobulinas incluem, mas não são limitadas a anticorpos. Imunoglobulinas podem ter numerosas



formas estruturais, incluindo, mas não limitadas a anticorpos de comprimento total, fragmentos de anticorpo, e domínios de imunoglobulina individuais.

[00075] Por "domínio de imunoglobulina (Ig) " aqui quer se dizer que uma imunoglobulina que existe como uma entidade estrutural distinta como determinada por aquele versado na técnica da estrutura de proteína. Domínio de Ig tipicamente têm uma topologia de dobramento de sanduíche beta característico. Os domínios de Ig conhecidos na classe IgG de anticorpos são VH, CI, C2, C3, VL, e CL.

[00076] Por "modificação de aminoácido" aqui quer se dizer que uma substituição de aminoácido, inserção e/ou deleção em uma sequência de polipeptídeos.

[00077] Por "substituição de aminoácido" ou "substituição" aqui quer se dizer que a substituição de um aminoácido a uma posição particular em uma sequência de polipeptídeos de origem com um outro aminoácido. Por exemplo, a substituição I332E refere-se a um polipeptídeo de variante, nesse caso a variante constante de cadeia pesada, em que a isoleucina na posição 332 é substituída com ácido glutâmico. O resíduo de tipo selvagem pode ou não pode ser designado. Para o exemplo precedente, 332E indica a substituição da posição 332 com um ácido glutâmico. Para as finalidades aqui, múltiplas substituições são tipicamente separadas por um corte. Por exemplo, 239D/332E refere-se a uma variante dupla compreendendo as substituições 239D e 332E.

[00078] Por "inserção de aminoácido" ou "inserção" como usado aqui quer se dizer que a adição de um aminoácido a uma posição particular em uma sequência de polipeptídeos de origem. Por exemplo, inserto-236G designa uma inserção de glicina na posição 236.

[00079] Por "deleção de aminoácido" ou "deleção" como usado aqui quer se dizer que a remoção de um aminoácido a uma posição particu-

lar em uma sequência de polipeptídeos de origem. Por exemplo, G236 designa a deleção de glicina na posição 236.

[00080] Por "polipeptídeo de origem", "proteína de origem", "polipeptídeo de precursor", ou "proteína de precursor" como intercambiavelmente usado aqui quer se dizer que um polipeptídeo que é subsequentemente modificado para gerar uma variante, por exemplo, qualquer polipeptídeo que serve como um modelo e/ou base para pelo menos uma modificação de aminoácido descrita aqui. O polipeptídeo de origem pode ser polipeptídeo de ocorrência natural, ou uma variante ou versão engenheirada de um polipeptídeo de ocorrência natural. Polipeptídeo de origem pode referir-se ao próprio polipeptídeo, composições que compreendem o polipeptídeo de origem, ou a sequência de aminoácidos que o codifica. Correspondentemente, por "anticorpo de origem" ou "imunoglobulina de origem" como usado aqui quer se dizer que um anticorpo ou imunoglobulina que é modificado para gerar uma variante (por exemplo, um anticorpo de origem pode incluir, mas não é limitado a, uma proteína compreendendo a região constante de uma Ig de ocorrência natural).

[00081] Por "proteína" ou "polipeptídeo" como usado aqui quer se dizer que pelo menos dois aminoácidos covalentemente ligados, que inclui proteínas, polipeptídeos, oligopeptídeos e peptídeos. A proteína pode ser formada de aminoácido de ocorrência natural e ligações de peptídeo, ou estruturas peptidomiméticas sintéticas, isto é, "análogos", tais como peptídeos.

[00082] Por "posição" como usado aqui quer se dizer que uma localização na sequência de uma proteína. Posições podem ser numeradas sequencialmente, ou de acordo com um formato estabelecido, por exemplo, o índice de EU como em Kabat (Kabat e outros, 1983). Se não indicado de outra maneira, todas as posições mencionadas são numeradas de acordo com o índice de EU. Posições correspondentes

são determinadas como delineadas aqui, em geral através de alinhamento com outras sequências de origem.

[00083] Por "resíduo" como usado aqui quer se dizer que uma posição em uma proteína em sua identidade de aminoácido associada. Por exemplo, Serina 239 (também chamada de Ser239 e S239) é um resíduo na posição 239 na IgG1 de anticorpo de ser humano.

[00084] Por "antígeno alvo" ou "alvo" ou "antígeno" como usado aqui quer se dizer que a molécula que é ligada especificamente pela região variável de um dado anticorpo. Um antígeno alvo pode ser uma proteína, carboidrato, lipídio, ou outro composto químico.

[00085] Por "célula alvo" como usado aqui quer se dizer que uma célula que expressa um antígeno alvo.

[00086] Por "região variável" como usado aqui quer se dizer que a região de uma imunoglobulina que compreende um ou mais domínios de Ig substancialmente codificados por qualquer um dos genes V $\kappa$ , V $\lambda$ , e/ou V $H$  que formam os locais genéticos de imunoglobulina capa, lambda, e de cadeia pesada respectivamente.

[00087] Por "proteína de variante", "variante de proteína", "polipeptídeo de variante", ou "variante de polipeptídeo" como usado aqui quer se dizer que uma sequência de polipeptídeos que difere daquele de uma sequência polipeptídeos de origem em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. Polipeptídeo de variante pode referir-se ao próprio polipeptídeo, uma composição compreendendo o polipeptídeo, ou a sequência de amino que a codifica. Em uma concretização, o polipeptídeo de variante tem pelo menos uma modificação de aminoácido em comparação com o polipeptídeo de origem, por exemplo, de cerca de um a cerca de dez modificações de aminoácido, por exemplo, de cerca de um a cerca de cinco modificações de aminoácido em comparação com a origem. A sequência de polipeptídeos de variante aqui pode possuir pelo menos cerca de 80% de homologia

com a sequência polipeptídica de origem, por exemplo, pelo menos cerca de 90% de homologia, pelo menos cerca de 95% de homologia, etc.. Correspondentemente, por "anticorpo de variante" ou "variante de anticorpo" como usado aqui quer se dizer que uma sequência de anticorpos que difere daquele de uma sequência de anticorpos de origem em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. Anticorpo de variante ou variante de anticorpo pode referir-se ao próprio anticorpo polipeptídico, composições compreendendo o polipeptídico de variante de anticorpo, ou a sequência de aminoácidos que o codifica. Correspondentemente, por "variante constante de cadeia pesada" ou "variante constante de cadeia leve" ou "variante de Fc" como usado aqui quer se dizer que a cadeia pesada constante, cadeia leve constante, ou polipeptídico ou sequência de região de Fc, respectivamente, que difere na sequência daquela de uma sequência de origem em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido.

[00088] Por "tipo selvagem" ou "WT" aqui quer se dizer que uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de nucleotídeos que é encontrada na natureza, incluindo variações alélicas. Uma proteína de tipo selvagem, polipeptídico, anticorpo, imunoglobulina, IgG, etc., tem uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de nucleotídeos que não foi intencionalmente modificada.

[00089] Para a totalidade de posições de região constante de cadeia pesada de imunoglobulina discutidas na presente invenção, numeração está de acordo com o índice de EU como em Kabat (Kabat e outros, 1991, Sequências of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). O "índice de EU como em Kabat" refere-se à numeração do resíduo do anticorpo de IgG1 EU de ser humano, como descrito em Edelman e outros, 1969, Biochemistry 63 78-85).

[00090] "Antígenos" são macromoléculas capazes de gerar uma

resposta de anticorpo em um animal e sendo reconhecidos pelo anticorpo resultante. Tanto antígenos quanto haptenos compreendem pelo menos um determinante antigênico ou "epitopo", que é a região do antígeno ou hapteno que se liga ao anticorpo. Tipicamente, o epitopo em um hapteno é a molécula inteira.

[00091] O termo "amostra", como usado aqui, refere-se a uma alíquota de material, frequentemente matrizes biológicas, uma solução aquosa ou uma suspensão aquosa derivada do material biológico. Materiais podem ser avaliadas quanto à presença de análito pelos métodos da presente invenção incluem, por exemplo, células, tecidos, homogenatos, lisados, extratos, e proteínas purificadas ou parcialmente purificadas e outras moléculas biológicas e suas misturas.

[00092] Exemplos não limitantes de amostras tipicamente usados nos métodos da invenção incluem fluidos de corpo de animal e de ser humano tais como sangue total, soro, plasma, fluido cerebroespinal, escarro, lavagem brônquica, aspirações brônquicas, urina, sêmen, fluidos de linfa e várias outras secreções externas dos tratos respiratório, intestinais e genitourinário, lágrimas, saliva, leite, leucócitos, mielomas e semelhantes; fluidos biológicos tais como sobrenadantes de cultura de células; espécie de tecido que pode ou não pode fixada; e espécies de células que podem ou não podem ser fixas. As amostras usadas nos métodos da presente invenção variarão no formato de ensaio e na natureza dos tecidos, células, extratos ou outros materiais, materiais especialmente biológicos, a serem analisados. Métodos para a preparação de extratos de proteína a partir de células ou amostras são bem conhecidos na técnica e podem ser prontamente adaptados a fim de se obter uma amostra que é compatível com os métodos da invenção.

[00093] "Especificamente ligação" e "ligação específica", como usado aqui, quer se dizer que um anticorpo se liga a seu alvo (análito) com base no reconhecimento de um epitopo na molécula alvo. O anti-

corpo de preferência reconhece e se liga à molécula alvo com uma afinidade de ligação mais alta do que ela se liga a outros compostos que podem estar presentes. Em várias concretizações da invenção, "especificamente ligação" pode significar que um anticorpo se liga à molécula alvo com pelo menos cerca de a  $10^6$  vezes de afinidade maior, de preferência pelo menos cerca de a  $10^7$  vezes de afinidade maior, mais de preferência pelo menos cerca de a  $10^8$  vezes de afinidade maior, e mais de preferência pelo menos cerca de uma afinidade  $10^9$  vezes maior do que ele liga moléculas não relacionada com a molécula alvo. Tipicamente, ligação específica refere-se a afinidades na faixa de cerca de  $10^6$  vezes a cerca de  $10^9$  vezes maior do que ligação não específica. Em algumas concretizações, ligação específica pode ser caracterizada por afinidades maior do que  $10^9$  vezes sobre ligação não específica. A afinidade de ligação pode ser determinada por qualquer método adequado. Tais métodos são conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, ressonância de plasmônio de superfície e colorimetria de titulação isotérmica. Em uma concretização específica, o anticorpo exclusivamente reconhece e se liga ao alvo anárito.

[00094] O termo "anticorpo monoclonal", como usado aqui, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades menores. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único sítio antigênico. Além do mais, em contraste com preparações de anticorpo convencionais (policlonais) que tipicamente incluem anticorpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antígeno. Além de sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos pelo fato de que eles podem ser

sintetizados por cultura de hibridoma, não contaminados por outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como produção de exigência do anticorpo por qualquer método particular. Os anticorpos monoclonais podem incluir anticorpos "quiméricos" (a patente U.S. No. 4.816.567; e Morrison e outros (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855) e anticorpos humanizados (Jones e outros (1986) Nature, 321 : 522-525; eichmann e outros (1988) Nature, 332: 323- 329; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596).

[00095] Anticorpos monoclonais podem ser obtidos por qualquer técnica que provê a produção de moléculas de anticorpo por linhas de células contínuas na cultura. Essas incluem, mas não são limitadas à técnica de hibridoma de Koehler and Milstein (1975), Nature, 256: 495-7; e a patente de U.S. no. 4.376.110), a técnica de hibridoma de célula B de ser humano (osbor, e outros (1983), Immunology Today, 4: 72; Cote, e outros (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026-30), e a técnica de hibridoma de EBV (Cole, e outros (1985), in Anticorpos monoclonais And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 77-96). A preparação de anticorpos monoclonais específicos para um composto alvo é também descrito em Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 6. Tais anticorpos podem ser qualquer classe de imunoglobulina incluindo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD e qualquer sua subclasse. A produção de hibridoma do inAb pode ser cultivada *in vitro* ou *in vivo*. Produção de títulos altos de mAbs *in vivo* produz esse um método muito eficaz de produção.

[00096] "Anticorpos policlonais" são populações heterogêneas de moléculas de anticorpo derivadas dos soros de animais imunizados com um antígeno, ou um seu derivado funcional antigênico. Para a



produção de anticorpos policlonais, animais hospedeiros tais como coelhos, camundongos e cabras, podem ser imunizados por injeção com um antígeno ou conjugado de veículo de hapteno opcionalmente suplementado com auxiliares.

[00097] Técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia simples (a patente de U.S. no. 4.946.778; Bird (1988), Science 242: 423-26; Huston, e outros (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-83; e Ward, e outros (1989), Nature, 334: 544-46) podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia simples de gene. Anticorpos de cadeia simples são tipicamente formados por ligação dos fragmentos de cadeia leve e pesada da região de Fv via uma ponto de aminoácido, resultando em um polipeptídeo de cadeia simples.

[00098] Fragmentos de anticorpo que reconhecem epítopos específicos podem ser gerados por técnicas conhecidas. Por exemplo, tais fragmentos incluem mas não são limitados a: os fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> que podem ser produzidos por digestão de pepsina do anticorpo molécula e os fragmentos de Fab que podem ser gerados por redução das pontes de dissulfeto dos fragmentos de F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, bibliotecas de expressão de Fab podem ser construídas (Huse, e outros (1989), Science, 246: 1275-1281) para permitir identificação rápida e fácil de fragmentos de Fab monoclonais com a especificidade desejada.

[00099] Os termos "polinucleotídeo" e "(molécula) de ácido nucleico" são usados intercambiavelmente aqui para referir-se a formas poliméricas de nucleotídeos de qualquer comprimento, incluindo ácidos nucleicos de ocorrência natural e de não ocorrência natural. Os polinucleotídeos podem conter desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos e/ou seus análogos. Métodos para a seleção e preparação de ácidos nucleicos são diversos e bem descritos nos protocolos biomolecular padrão. Um modo típico seria PCR preparativo PCR e purificação



cromatográfica que parte dos DNAs de modelo existentes ou síntese por etapas ácidos nucleicos artificiais. Tipicamente, as moléculas de ácido nucleico mencionadas aqui são moléculas de DNA.

[000100] O termo "pelo menos uma" como usado aqui com relação a substituições de aminoácidos refere-se a pelo menos 1, mas de preferência pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou uma pluralidade de substituições de aminoácidos.

[000101] Os termos "contato" ou "incubação", como usado intercambiavelmente aqui, referem em geral a provisão de acesso de um componente, reagente, anárito ou amostra a um outro.

[000102] O termo "detecção" como usado aqui refere-se a qualquer método de verificação da presença de uma dada molécula. As técnicas usadas para realizar isso podem incluir, mas não são limitadas a, imunoensaios, tais como ELISA e Immuno PCR (IPCR).

[000103] Malignidades hematológicas são câncer tipos de câncer que afetam sangue, medula óssea, e linfonodos. Malignidades hematológicas podem derivar de ou das duas linhagens de células de sangue principais: linhas de células mieloides e linfoides. A linha de célula mieloide normamalmente produz granulócitos, eritrócitos, trombócitos, macrófagos e mastócitos; a linha de célula linfoide produz células B, T, NK e plasma. Linfomas, leucemia linfocítica, e mieloma são oriundas da linha linfoide, enquanto leucemia mielógena crônica e aguda, síndromes mielodisplásicas e doença mieloproliferativas são de origem mieloide.

[000104] Leucemia é um câncer do sangue ou medula óssea e é caracterizada por uma proliferação anormal de células de sangue, usualmente células branca de sangue (leucócitos). Leucemia é clinicamente e patologicamente subdividida em uma variedade de grandes grupos. Leucemia aguda é caracterizada pelo rápido aumento de células de sangue imaturas. Essa aglomeração forma uma medula óssea

incapaz de produzir células de sangue saudáveis. Tratamento imediato é exigido em leucemia aguda devido à rápida progressão e acúmulo das células malignas, que então derramam para dentro da corrente sanguínea e espalham para outros órgãos do corpo. Formas agudas de leucemia são as formas mais comuns de leucemia em crianças. Leucemia crônica é distinguida pela construção excessiva de células branca de sangue relativamente maduras, mas ainda anormais. Tipicamente levando meses ou anos para progredir, as células são produzidas em uma taxa muito mais alta do que células normais, resultando em muitas células branca de sangue anormais no sangue. Enquanto que leucemia aguda deve ser tratada imediatamente, formas crônicas são algumas vezes monitoradas por algum tempo antes do tratamento para assegurar máxima eficácia de terapia. Leucemia crônica principalmente ocorre em pessoas mais velhas, mas pode teoricamente ocorrer em qualquer grupo de idade. Adicionalmente, as doenças são subdivididas de acordo com que espécie de célula de sangue é afetada. Essa divisão divide leucemias em leucemia linfoblástica ou linfocítica e leucemias mieloide ou mielógena: Na leucemia linfoblástica ou linfocítica, a mudança cancerosa ocorre em um tipo de célula de medula que normalmente segue para formar linfócitos, que são células do sistema imune de combate de infecção. A maior parte da leucemia linfocítica envolve um subtipo específico de linfócito, a célula B. Em leucemias mieloide ou mielógena, a mudança cancerosa ocorre em um tipo de célula de medula que normalmente segue para formar hemácias, alguns outros tipos de células brancas e plaquetas.

[000105] Leucemia mieloide aguda (AML), também conhecidas como leucemia mielógena aguda, é um câncer da linha mieloide de células de sangue, caracterizada pelo rápido crescimento de células branca de sangue anormais que se acumulam na medula óssea e interferem com a produção de células de sangue normais. AML é a leucemia

aguda mais comum que afeta adultos, e sua incidência aumenta com a idade. Embora AML seja uma doença relativamente rara, representando cerca de 1,2% de mortes de câncer nos Estados Unidos, sua incidência é esperada aumentar quando a população envelhece.

[000106] Os sintomas de AML são causados por substituição da medula óssea normal com células leucêmicas, que causa uma queda nas hemáceas, plaquetas, e células brancas normais de sangue. Esses sintomas incluem fadiga, brevidade de respiração, machucamento fácil e sangramento, e risco aumentado de infecção. Embora vários fatores de risco para AML terem sido identificados, a causa específica da doença permanece não clara. Uma vez que uma leucemia aguda, AML progride rapidamente e é fatal no período de semanas ou meses se não for tratada.

[000107] AML tem vários subtipos; tratamento e prognóstico variam entre subtipos. Sobrevida de cinco anos varia de 15-70%, e taxa de recaída varia de 78-33%, dependendo do subtipo.

[000108] Anticorpos monoclonais são uma classe de proteínas terapêuticas que podem ser usadas para tratar doenças e desordens proliferativas de células, em particular aquelas que afetam o sistema hematopoiético. Numerosas propriedades favoráveis de anticorpos, incluindo mas não limitadas a especificidade por alvo, capacidade de mediar mecanismos de efetor imune, e semivida longa no soro, torna terapêuticas poderosas de anticorpos. A presente invenção descreve anticorpos contra a proto-oncogene FLT3.

[000109] FLT3 demonstrou desempenhar um papel significativo no início e progressão de leucemias, em particular AML, e primeiras experiências com inibidores de FLT3 em pacientes com AML mostram resultados promissores. No entanto, ainda existe a necessidade de anticorpos de anti-FLT3 que são úteis no tratamento de leucemias, tal como AML.

[000110] O sucesso clínico de anticorpos dirigidos contra FLT3 depende de seu(s) mecanismo(s) potencial(ais) de ação. Há numerosos mecanismos possíveis pelos quais anticorpos medeiam efeitos celulares, incluindo antiproliferação via bloqueio das trajetórias de crescimento necessárias, sinalização intracelular que leva a apoptose, regulação para baixo e/ou mudança aumentada de receptores, citotoxicidade dependente de complemento (CDC), citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), fagocitose mediada por célula dependente de anticorpo (ADCP) e promoção de uma resposta imune adaptativa (Cragg e outros, 1999, *Curr Opin Immunol* 11 541-547, Glennie e outros, 2000, *Immunol Today* 21 403- 410). Eficácia de anticorpo pode ser devido a uma combinação desses mecanismos, e sua importância relativa na terapia clínica para oncologia parece ser dependente de câncer.

[000111] A importância de funções de efector mediadas por FcR para a atividade de alguns anticorpos foi demonstrada em camundongos (Clynes e outros, 1998, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 652-656, Clynes e outros, 2000, *Nat Med* 6 443-446,), e de correlações observadas entre a eficácia clínica em seres humanos e seu alótipo de formas polimórficas alfa (VI 58) ou baixa (F158) afinidade de FcRIIIa (Cartron e outros, 2002, *Blood* 99 754- 758, Weng & Levy, 2003, *Journal of Clinical Oncology*, 21 3940-3947). Juntos esses dados sugerem que um anticorpo que são otimizados para a ligação a certos FcRs podem melhor mediar funções de efector, e desse modo destruindo células alvo mais eficazmente em pacientes Assim um meio promissor para o aumento da potência de anti-tumor de anticorpos é via aumento de sua capacidade de mediar funções de efector citotóxicas tais como ADCC, ADCP, e CDC Adicionalmente, anticorpos podem mediar mecanismos de anti-tumor via crescimento inibitório ou sinalização apoptótica que pode ocorrer quando um anticorpo se liga a seu alvo nas células de

tumor. Tal sinalização pode ser potencializada quando anticorpos são apresentados a células de tumor ligadas a células imunes via FcR. Portanto afinidade aumentada de anticorpos para FcRs pode resultar em efeitos antiproliferativos aumentados.

[000112] Algum sucesso foi alcançado na modificação de anticorpos com ligação seletivamente aumentada a FcRs para prover função efetora aumentada. Engenharia de anticorpo para função efetora otimizada foi alcançada usando-se modificações de aminoácido (vide, por exemplo, pedido de patente US 2004-0132101 ou pedido de patente US 2006- 0024298).

[000113] Infelizmente, não é conhecido a priori que mecanismos de ação podem ser ótimos para um dado antígeno alvo. Além do mais, não é conhecido que anticorpos podem ser capazes de mediar um dado mecanismo de ação contra a célula alvo. Em alguns casos uma falta de atividade de anticorpo, ou mediado por Fv ou mediado por Fc, pode ser devido ao direcionamento de um epítipo no antígeno alvo que é pobre para a mediação de tal atividade. Em outros casos, o epítipo direcionado pode ser receptivo a uma atividade mediada por Fc ou mediada por Fv desejada, ainda a afinidade (afinidade da região de Fv para o antígeno ou afinidade da região de Fc para receptores de Fc) pode ser insuficiente em relação ao tratamento desse problema, a presente invenção descreve modificações em anticorpos de anti-FLT3 que proveem atividades mediadas por Fc, por exemplo de novo atividade mediada por Fc otimizada ou gerada.

[000114] Anticorpos são proteínas imunológicas que ligam um antígeno específico. Na maioria dos mamíferos, incluindo seres humanos e camundongos, anticorpos são construídos a partir de cadeias de polipeptídeo leve e pesada emparelhadas. As regiões de cadeia variáveis leve e pesada mostram diversidade de sequência significativa entre anticorpos, e são responsáveis pela ligação do antígeno alvo. Cada

cadeia é formada e domínio de imunoglobulina individual (Ig), e assim o termo genérico imunoglobulina é usado para tais proteínas.

[000115] Unidades estruturais de anticorpo naturais tipicamente compreendem a tetrâmero. Cada tetrâmero é tipicamente constituído de dos pares idênticos de cadeias de polipeptídeo, cada par tendo uma cadeia "leve" (tipicamente tendo um peso molecular de cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" (tipicamente tendo um peso molecular de cerca de 50-70 kDa). Cada uma das cadeias leve e pesada são formadas de duas regiões distintas, chamadas das regiões variáveis e constantes. Para a classe de IgG de imunoglobulinas, a cadeia pesada é constituída de quatro domínios de imunoglobulina ligados de N- a C-terminal na ordem VH-CH1-CH2-CH3, fazendo-se referência a um domínio variável de cadeia pesada, domínio 1 constante de cadeia pesada, domínio 2 constante de cadeia pesada, e domínio 3 constante de cadeia pesada respectivamente (também chamada de VH-C $\gamma$ 1-C $\gamma$ 2-C $\gamma$ 3, fazendo-se referência a um domínio variável de cadeia pesada, domínio 1 gama constante, domínio 2 gama constante, e domínio 3 gama constante respectivamente). A cadeia leve de IgG é constituída de dois domínios de imunoglobulina ligados de N- a C-terminal na ordem VL-CL, fazendo-se referência ao domínio variável de cadeia leve e o domínio constante de cadeia leve. As regiões constantes mostram menos diversidade de sequência, e são responsáveis pela ligação de numerosas proteínas naturais para eliciar eventos bioquímicos importantes.

[000116] A região variável de um anticorpo contém os determinantes de ligação de antígeno da molécula, e assim determina a especificidade de um anticorpo para seu antígeno alvo. A região variável é assim chamada porque ela é a mais distinta na sequência de outros anticorpos dentro da mesma classe. Na região variável, três laços são reunidos para cada um dos domínios de V da cadeia pesada e da cadeia

leve para formar um sítio de ligação de antígeno. Cada um dos laços é chamado de uma região de determinação de complementaridade (aqui em seguida de chamada de uma "CDR"), em que a variação na sequência de aminoácidos é mais significativa. Há 6 CDRs total, três cada uma por cadeia leve e pesada, designada CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, e CDR3 de VL. A região variável do lado de fora das CDRs é chamada da região de estrutura (FR). Embora não tão diversa quanto as CDRs, variabilidade de sequência não ocorre na região de FR entre anticorpos diferentes. além de tudo, essa arquitetura de característica de anticorpos provê um armazém estável (a região de FR) na qual diversidade de antígeno substancial (as CDRs) pode ser explorada pelo sistema imune para se obter especificidade para um amplo conjunto de antígenos. numerosas estruturas de alta resolução estão disponíveis dos fragmentos de região variável de diferentes organismos, alguns não ligados e alguns em complexo com antígeno. Sequência e características estruturais das regiões variáveis de anticorpo são reveladas, por exemplo, em Morea e outros, 1997, *Biophys Chem* 68:9-16; Morea e outros, 2000, *Methods* 20:267- 279, e as características conservadas de anticorpos são reveladas por exemplo, em Maynard e outros, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-376.

[000117] Anticorpos são agrupados em classes, também chamadas de isotipos, como determinados geneticamente pela região constante. Cadeia leve constante de ser humano são classificadas como cadeias leve kappa ( $\kappa$ ) e lambda ( $\lambda$ ). cadeias pesadas de ser humano são classificadas como mu, delta, gama, alfa, ou épsilon, e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. A classe de IgG é a mais comumente usada para as finalidades terapêuticas.

[000118] Por "IgG" como usado aqui quer se dizer que um polipeptí-



deo que pertence à classe de anticorpos que são substancialmente codificados por um gene de imunoglobulina gama reconhecido. Em seres humanos essa classe compreende subclasses IgG 1, IgG2, IgG3, e IgG4. Em camundongos essa classe compreende subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. IgM tem subclasses, incluindo, mas não limitadas a, IgM1 e IgM2. IgA tem várias subclasses, incluindo mas não limitadas a IgA1 e IgA2. Assim, "isótipo" como usado aqui quer se dizer que qualquer uma das classes ou subclasses de imunoglobulinas definidas pelas características química e antigênicas de suas regiões constantes. Os isótipos de imunoglobulina de ser humano conhecidos são IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE.

[000119] Também úteis para a invenção podem ser IgGs que são composições híbridas dos isótipos de IgG de ser humano natural. Funções de efector tais como ADCC, ADCP, CDC, e semivida de soro diferem significativamente entre as diferentes classes de anticorpos, incluindo, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4s IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, e IgM de ser humano (Michaelson e outros, 1992, *Molecular Immunology*, 29(3): 319-326). Numerosos estudos exploraram variantes de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 a fim de investigar as determinantes das diferenças de função efectora entre elas. Vide por exemplo Canfield & Morrison, 1991, *J. Exp. Med.* 173: 1483-1491 ; Chappel e outros, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(20): 9036-9040; Chappel e outros, 1993, *Journal of Biological Chemistry* 268:25124- 25131 ; Tao e outros, 1991, *J. Exp. Med.* 173: 1025-1028; Tao e outros, 1993, *J. Exp. Med.* 178: 661-667; Redpath e outros, 1998, *Human Immunology*, 59, 720-727.

[000120] Como descrito no pedido de patente 2006-0134105 intitulado "IgG Immunoglobulin Variants with Optimized Effector Function", é possível engenheirar modificações de aminoácido em um anticorpo que compreendem regiões constantes de outras classes de imunoglo-



bulina. Tais composições de IgG híbridas engenheiradas podem prover propriedades de função efetora aperfeiçoadas, incluindo ADCC, fagocitose, CDC, e semivida de soro aperfeiçoadas.

[000121] Como é bem conhecido na técnica, polimorfismos de imunoglobulina existem na população de ser humano. Polimorfismo de Gm é determinado pelos genes de IGHG1, IGHG2 e IGHG3 que têm alelos que codificam determinantes antigênicos alotípicos chamados de alótipos de G1m, G2m, e G3m para marcadores das moléculas de IgG1, IgG2 e IgG3 de ser humano (nenhum alótipos de Gm foram encontrados na cadeia 4 gama). Marcadores podem ser classificados em "alótipos" e "isoalótipos". Esses são distinguidos em bases sorológicas diferentes dependentes das homologias de sequência fortes entre isótipos. Alótipos são determinantes antigênicos específicos por formas alélicas dos genes de Ig. Alótipos representam leves diferenças nas sequências de aminoácidos de cadeias pesada ou leve de diferentes individuais. Ainda uma única diferença de aminoácido pode originar um determinante alotípico, embora em muitos casos houve várias substituições de aminoácido que ocorreram. Alótipos são diferenças de sequência entre alelos de uma subclasse pelo que o antissoro reconhece apenas as diferenças alélicas. Um isoalótipo é um alelo em um isótipo que produz um epitopo que é compartilhado com uma região homóloga não polimórfica de um ou mais outros isótipos e por causa disso o anti-soro reagirá com tanto os alótipos relevantes quanto isótipos homólogos relevantes (Clark, 1997, IgG effector mechanisms, Chem. Immunol. 65-88-110, Gorman & Clark, 1990, Semin. Immunol. 2(6):457-66).

[000122] Formas alélicas de imunoglobulinas de ser humano foram bem caracterizadas. Adicionalmente, outros polimorfismos foram caracterizados (Kim, e outros, 2001, J. Mol. Evol. 54 1-9, incorporados aqui em sua totalidade por referência) No momento, 18 alótipos de Gm

são conhecidos: G1m (1, 2, 3, 17) ou G1m (a, x, f, z), G2m (23) ou G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) ou G3m (b1, c3, b5, bO, b3, b4, s, t, gl, c5, u, v, g5) (Lefranc, e outros. as subclasses de IgG de ser humano: análise molecular da estrutura, função e regulação Pergamon, Oxford, pp 43-78 (1990), Lefranc, G e outros, 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Alótipos que são herdados em combinações fixas são chamados de haplótipos de Gm. Os anticorpos da presente invenção podem ser substancialmente codificados por qualquer alótipo, isoalótipo, ou haplótipo de quaisquer anticorpos de gene de imunoglobulina da presente invenção podem ser substancialmente codificados por genes de qualquer organismo, por exemplo, mamíferos, incluindo, mas não limitados a seres humanos, roedores incluindo mas não limitados a camundongos e ratos, lagomorpha incluindo mas não limitados a coelhos e lebres, camelidae incluindo mas não limitados a camelos, lhamas, e dromedários e primatas não humanos, incluindo mas não limitados a Prosimians, Platyrrhini (macacos do Novo Mundo), Cercopithecoidea (macacos do Velho Mundo), e Hominoidea incluindo os Gibbons e Lesser e Great Apes.

[000123] Em uma concretização, os anticorpos da presente invenção são substancialmente humanos. Os anticorpos da presente invenção podem ser substancialmente codificados por genes de imunoglobulina que pertence a qualquer uma das classes de anticorpo. Em uma concretização, os anticorpos da presente invenção compreendem sequências que pertencem à classe de IgG de anticorpos, incluindo subclasses de ser humano IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Em uma concretização substituta, os anticorpos da presente invenção compreendem sequências que pertencem a IgA (incluindo subclasses IgA1 e IgA2 de ser humano), classes de anticorpos de IgD, IgE, IgG, ou IgM. Os anticorpos da presente invenção podem compreender mais do que uma cadeia de proteína. Isto é, a presente invenção pode encontrar uso em

um anticorpo que é um monômero ou um oligômero, incluindo um homô- ou hetero-oligômero.

[000124] Em uma concretização, os anticorpos da invenção são com base na sequências de IgG de ser humano, e assim sequências de IgG de ser humano são usadas como as sequências de "base" contra as quais outras sequências são comparadas, incluindo mas não limitadas a sequências de outros organismos, por exemplo, sequências de roedor e de primata, bem como sequências de outras classes de imunoglobulina tais como IgA, IgE, IgD, IgM, e semelhantes. É contemplado que, embora os anticorpos da presente invenção sejam engenheirados no contexto de um anticorpo de origem, as variantes podem ser engenheiradas em "transferidas para o contexto de um outro, segundo anticorpo de origem. Isso é feito por determinação dos resíduos "equivalentes" ou "correspondentes" e substituições entre os primeiros e segundos anticorpos, tipicamente com base na sequência ou homologia estrutural entre as sequências dos dois anticorpos. A fim de estabelecer homologia, uma sequência de aminoácidos de um primeiro anticorpo delineado aqui está diretamente em comparação com a sequência de um anticorpo secundário. Depois de alinhamento das sequências, usando-se um ou mais dos programas de alinhamento de homologia conhecidos na técnica (por exemplo usando-se conservados as entre espécies), permitindo inserções e deleções necessárias a fim de manter o alinhamento (isto é, evitando a eliminação de resíduos conservados através de inserção e deleção arbitrária), os resíduos equivalentes para particular aminoácidos na sequência primária do primeiro anticorpo são definidos. Alinhamento de resíduos conservados podem conservar 100% de tais resíduos. No entanto, alinhamento de mais do que 75% ou tão pouco quanto 50% de resíduos conservados é também adequado definir resíduos equivalentes. Resíduos equivalentes podem também ser definidos por determinação de homologia estrutural entre um primeiro e segundo

anticorpo que está no nível da estrutura terciária para anticorpos cujas estruturas foram determinadas. Nesse caso, resíduos equivalentes são definidos como aqueles para os quais as coordenadas atômicas de dois ou mais dos átomos de cadeia principal de um resíduo de aminoácido particular de uma origem ou precursor (em N, CA em CA, C em C e O em O) estão dentro de 0,13 nm, por exemplo, 0,1 nm, depois do alinhamento. Alinhamento é alcançado depois do melhor modelo foi orientado e foi posicionado para dar a máxima sobreposição de coordenadas atômicas de átomos de proteína de não hidrogênio das proteínas. Independentemente de como resíduos equivalentes ou correspondentes são determinados, e independentemente da identidade do anticorpo de origem em que os anticorpos foram feitos, que destina-se a ser transportados é que os anticorpos revelados pela presente invenção podem ser engenheiradas em qualquer segundo anticorpo de origem que tem sequência significativa ou homologia estrutural com o anticorpo. Assim por exemplo, se um anticorpo de variante é gerado em que o anticorpo de origem é IgG1 de ser humano, por uso dos métodos descritos e outros métodos para a determinação de resíduos equivalentes, o anticorpo de variante pode ser engenheirado em um IgG2 anticorpo de origem de IgG2 de ser humano, um IgA anticorpo de origem de IgA de ser humano, um anticorpo de origem de IgG2 ou IgG2b de camundongo, e semelhantes. Novamente, como descrito acima, o contexto do anticorpo de origem não afeta a capacidade de transferir os anticorpos da presente invenção para outros anticorpos de origem. Por exemplo, os anticorpos de variante que são engenheirados em um anticorpo de IgG1 de ser humano que direciona um epítipo de antígeno pode ser transferido em um anticorpo de IgG2 de ser humano que direciona um epítipo de antígeno diferente, e assim por diante.

[000125] Na classe de IgG de imunoglobulinas, há vários domínios de imunoglobulina na cadeia pesada. Por "domínio de imunoglobulina

(Ig)" aqui quer se dizer que uma região de uma imunoglobulina tendo uma estrutura terciária distinta. De interesse na presente invenção são os domínios da cadeia pesada constante, incluindo, o domínio pesado constante (CH) e uma articulação. No contexto de anticorpos de IgG, os isótipos de IgG cada um tem três regiões de CH: "CH1" refere-se a posições 118-220, "CH2" refere-se a posições 237-340, e "CH3" refere-se a posições 341-447 de acordo com o índice de EU como em Kabat. Por "articulação" ou "região principal" ou "região principal do anticorpo" ou "região principal de imunoglobulina" aqui quer se dizer que o polipeptídeo flexível compreendendo os aminoácidos entre o primeiro e segundo domínios constantes de um anticorpo. Estruturalmente, o domínio de IgG de CH1 teminal em EU posição 220, e o domínio de IgG CH2 começa no resíduo EU posição 237. Assim para IgG uma articulação é aqui definida incluir posições de 221 (D221 em IgG1) a 236 (G236 em IgG1), em que a numeração está de acordo com o índice de EU como em Kabat. Em algumas concretizações, por exemplo, no contexto de uma região de Fc, a articulação inferior está incluída, com a "articulação inferior" em geral fazendo-se referência a posições 226 ou 230. A cadeia pesada constante, como definida aqui, refere-se ao N-terminal do domínio de CH1 ao C-terminal do domínio de CH3, assim compreendendo posições 118-447, em que a numeração está de acordo com o índice de EU. A cadeia leve constante compreende um único domínio, e como definido aqui refere-se a posições de 108-214 de C ou CK, em que a numeração está de acordo com o índice de EU.

[000126] Especificamente incluída dentro da definição de "anticorpo" são anticorpos de comprimento total. Por "anticorpo de comprimento total" aqui quer se dizer que a estrutura que constitui a forma biológica natural de um anticorpo, incluindo regiões variáveis e constantes. Por exemplo, na maioria dos mamíferos, incluindo seres humanos e ca-

mundongos, o anticorpo de comprimento total da classe de IgG é um tetrâmero e consiste dos pares idênticos de duas cadeias de imunoglobulina, cada par tendo uma cadeia leve e pesada, cada cadeia leve compreendendo domínios de imunoglobulina VL e CL, e cada cadeia pesada compreendendo domínios de imunoglobulina VH, CH1 (C $\gamma$ 1), CH2 (C $\gamma$ 2), e CH3 (C $\gamma$ 3). Em alguns mamíferos, por exemplo, em camelos e lhamas, anticorpos de IgG podem consistir de apenas duas cadeias pesadas, cada cadeia pesada compreendendo um domínio variável ligado à região de Fc.

[000127] Alternativamente, os anticorpos podem ter uma variedade de estruturas, incluindo, mas não limitadas a fragmentos de anticorpo. Fragmentos de anticorpo incluem, mas não são limitadas anticorpos biespecíficos, minicorpos, anticorpos de domínio, anticorpos sintéticos, miméticos de anticorpo, anticorpos quiméricos, fusões de anticorpo (algumas vezes chamados de "conjugados de anticorpo"), e fragmentos de cada, respectivamente. Fragmentos de anticorpo específicos incluem, mas não são limitadas a, (i) o fragmento de Fab que consiste em VL, VH, CL e domínios de CH1, (ii) o fragmento de Fd que consiste na VH e domínios de CH1, (iii) o fragmento de Fv que consiste dos domínios de VL e VH de um anticorpo simples; (iv) o fragmento de dAb, que consiste em uma única região variável, (v) regiões de CDR isoladas, (vi) fragmentos de F(ab')<sub>2</sub>, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos de Fab ligados (vii) moléculas de Fv de cadeia simples (scFv), em que um domínio de VH e um domínio de VL estão ligados por um ligante de peptídeo que permite que os dois domínios se associem para formar um sítio de ligação de antígeno (viii) dímeros de Fv de cadeia simples biespecíficos e (ix) "diacorpos" ou "triacorpos", fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos por fusão de gene. Os fragmentos de anticorpo podem ser modificados. Por exemplo, as moléculas podem ser estabilizadas pela incorpo-

ração de pontes de dissulfeto que ligam os domínios de VH e de VL. Exemplos de arquiteturas e formatos de anticorpo são descritos em Holliger & Hudson, 2006, *Nature Biotechnology* 23(9):1126- 1136, and Carter 2006, *Nature Reviews Immunology* 6:343-357 e referências citadas aqui.

[000128] Anticorpos da invenção podem incluir anticorpos multiespecíficos, anticorpos notavelmente biespecíficos, também algumas vezes chamados de "diacorpos". Há anticorpos que se ligam a dois (ou mais) antígenos diferentes. Diacorpos podem ser fabricados em variedade de meios conhecidos na técnica, por exemplo, preparados quimicamente ou a partir de hibridomas híbridos. Em uma concretização, o anticorpo é um minicorpo. Minicorpos são proteínas de tipo anticorpo minimizadas compreendendo i, scFv unido a um domínio de CFI3. Em alguns casos, o scFv pode ser unido à região de Fc, e pode incluir alguma ou a totalidade da região principal. Para uma descrição de anticorpos multiespecíficos vide Holliger & Hudson, 2006, *Nature Biotechnology* 23(9): 1126-1136 e referência citada aqui.

[000129] Em uma concretização, o anticorpo da invenção é um fragmento de anticorpo. De interesse particular são anticorpos que compreendem regiões de Fc, fusões de Fc, e a região constante da cadeia pesada (CH1-articulação-CH2-CH3). Anticorpos da presente invenção podem compreender fragmentos de Fc. Um fragmento de Fc da presente invenção pode compreender de 1 - 90% da região de Fc, por exemplo, 10 - 90%, 30 - 90%, etc Assim por exemplo, um fragmento de Fc da presente invenção pode compreender um domínio de IgG1 Cy2, um domínio de IgG1 Cy2 e região principal, um domínio de IgG1 Cy3, e assim por diante. Em uma concretização, um fragmento de Fc da presente invenção adicionalmente compreende um par de fusão, eficazmente tornando-o uma fusão de fragmento de Fc. Fragmentos de Fc podem ou não podem conter sequências de polipeptídeos extra.



[000130] Imunogenicidade é o resultado de uma série de complexos de respostas a uma substância que é percebida como estranha, e pode incluir produção de anticorpos de neutralização e de não neutralização, formação de complexos imune, ativação de complemento, ativação de mastócito, inflamação, respostas de hipersensibilidade e anafilaxia. Vários fatores podem contribuir para imunogenicidade de proteína, incluindo, mas não limitada uma sequência de proteínas, rota e frequência de administração, e população de paciente. Imunogenicidade pode limitar a eficácia e segurança de uma terapêutica de proteína de múltiplos modos. Eficácia pode ser reduzida diretamente pela formação de anticorpos de neutralização. Eficácia pode também ser reduzida indiretamente, como ligação a ou anticorpos de não neutralização ou anticorpos de neutralização tipicamente leva a rápida depuração dos efeitos colaterais severos no soro e ainda morte pode ocorrer quando uma reação imune é aumentada. Assim em uma concretização, engenhejamento de proteína é usada para reduzir a imunogenicidade dos anticorpos da presente invenção.

[000131] Em algumas concretizações, os componentes de armação podem ser misturados a partir de diferentes espécies. Tal anticorpo pode ser um anticorpo quimérico e/ou um anticorpo humanizado. Em geral, tanto "anticorpos quiméricos" quanto "anticorpos humanizados" referem-se a anticorpos que combinam regiões de mais do que uma espécie. "Anticorpos quiméricos" tradicionalmente compreendem região(ões) variável(eis) de um camundongo (ou rato, em alguns casos) e as região(ões) constante(s) de um ser humano (Morrison e outros, 1984, Proc Natl Acad Sci USA 81 6851-6855).

[000132] Por anticorpo "humanizado" como usado aqui quer se dizer que um anticorpo compreendendo uma região de estrutura de ser humano (FR) e uma ou mais regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de um anticorpo de não ser humano (usualmente ca-

mundongo ou rato). O anticorpo de não ser humano provendo as CDRs é chamado o "doador" e a imunoglobulina de ser humano provendo a estrutura é chamada o "aceitante". Humanização está principalmente no enxerto de CDRs de doador sobre estruturas VL e VH de aceitante (ser humano) (Winter US 5.225.539). Essa estratégia é chamada de "enxerto de CDR ". "Retromutação" de resíduos de estrutura de aceitante selecionados para os resíduos de doador correspondentes é frequentemente exigido recuperar afinidade que é perdida no construto enxertado inicial (US 5.693.762). O anticorpo humanizado também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana, e assim tipicamente compreenderá uma região de Fc de ser humano. Uma variedade de técnicas e métodos para humanização e remodelação de anticorpos de não ser humano são bem conhecidos na técnica (Vide Tsurushita & Vasquez, 2004, humanization of Anticorpos monoclonais, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), e referências citadas aqui). Humanização ou outros métodos de redução da imunogenicidade de regiões variáveis de anticorpo de não ser humano podem incluir métodos de ressurgimento, como descritos, por exemplo, em Roguska e outros, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91 969-973). Em uma concretização, métodos à base de seleção podem ser empregados para humanizar e/ou regiões variáveis de anticorpo maduro por afinidade, que é, para aumentar a afinidade da região variável para seu antígeno alvo. Outros métodos de humanização podem envolver o enxerto de apenas partes das CDRs, incluindo mas não limitados a métodos descritos em, Tan e outros, 2002, J Immunol 169 1119 -1125, De Pascalis e outros, 2002, J Immunol 169 3076-3084. Métodos com base em estrutura podem ser empregados para maturação por afinidade e humanização, por exemplo, como descrito na patente de U.S. no. 7.117.096 e aplicações relacionadas.

[000133] Em certas variações, a imunogenicidade do anticorpo é reduzida usando-se um método descrito no pedido de patente US 2006-0008883, intitulado "Methods of Generating Proteína de variantes with Increased Host String Content and Composições Thereof, depositado em 3 de dezembro de 2004.

[000134] Modificações para reduzir imunogenicidade podem incluir modificações que reduzem ligação de peptídeos processados derivados de uma sequência de origem a proteínas de MHC. Por exemplo, modificações de aminoácido seriam engenheiradas tal que não há ou um número mínimo de epitopos imunes que são previstos como ligando, com alta afinidade, a quaisquer alelos de MHC prevalentes. Vários métodos de identificação de epitopos de ligação de MHC nas sequências de proteínas são conhecidas na técnica e podem ser usadas para classificar epitopos em um anticorpo da presente invenção. Vide, por exemplo, pedidos de patentes US 2002- 0119492, 2004-0230380 ou 2006-0148009 e referências citadas aqui.

[000135] Em uma concretização alternativa, os anticorpos da presente invenção podem ser totalmente humanos, que é as sequências dos anticorpos são totalmente ou substancialmente humanos. "Anticorpo totalmente de ser humano" ou "anticorpo de ser humano completo" refere-se a um anticorpo de ser humano tendo a sequência de genes de um anticorpo derivado de um cromossoma de ser humano com as modificações delineadas aqui. Numerosos métodos são conhecidos na técnica para geração de anticorpos totalmente humanos, incluindo o usando-se camundongos transgênicos (Bruggemann e outros, 1997, Curr Opin Biotechnol 8:455- 458,) ou bibliotecas de anticorpo de ser humano acopladas com métodos de seleção (Griffiths e outros, 1998, Curr Opin Biotechnol 9:102-108).

[000136] Os anticorpos da presente invenção alvo FLT3 e podem compreender as regiões variáveis (por exemplo, as CDRs) de qualquer

anticorpo de anti-FLT3 conhecido e não revelado. Anticorpos da invenção podem exibir seletividade para FLT3. Exemplos incluem comprimento total versus variantes de união, superfície de célula vs. Formas solúveis, seletividade para várias variantes polimórficas, ou seletividade para formas conformacionais específicas de um alvo. Um anticorpo da presente invenção pode ligar qualquer epitopo ou região em FLT3 e pode ser específico para fragmentos, formas mutantes, formas de união, ou formas anômalas dos antígenos. Numerosos anticorpos úteis foram revelados que FLT3 alvo que podem encontrar uso na presente invenção.

[000137] Anticorpos de FLT3 adequados incluem os anticorpos de anti-FLT3 4G8 e BVIO, como revelados na patente de U.S. no. 5.777.084 e na patente de U.S. no. 6.156.882.

[000138] Os anticorpos da presente invenção podem encontrar uso em uma ampla faixa de produtos. Em uma concretização o anticorpo da invenção é uma terapêutica, um diagnóstico, ou um reagente de pesquisa. Em uma concretização, um anticorpo da invenção é uma terapêutica. Um anticorpo da presente invenção podem encontrar uso em uma composição de anticorpo que é monoclonal ou policlonal. Em uma concretização, os anticorpos da presente invenção são usados para matar células alvo que portam o antígeno alvo, por exemplo, células de câncer. Em uma concretização substituta, os anticorpos da presente invenção são usados para bloquear, antagonizar ou agonizar o antígeno alvo. Em uma concretização substituta, os anticorpos da presente invenção são usados para bloquear, antagonizar ou agonizar o antígeno alvo e matar as células alvo que portam o antígeno alvo.

[000139] Será reconhecido que as sequências dos domínios variáveis incluindo as CDRs identificadas aqui podem ser combinadas em qualquer combinação em um anticorpo. Além disso, essas sequências podem independentemente modificadas por adição da totalidade ou

parte de uma região de Fc ou variante de Fc como revelado aqui. As sequências modificadas podem também ser combinadas em qualquer combinação em um anticorpo.

[000140] A presente invenção refere-se a anticorpos compreendendo modificações, em que as modificações alteram afinidade para um ou mais receptores de Fc, e/ou alteram a capacidade do anticorpo de mediar uma ou mais funções de efector. Modificações da invenção incluem modificações de aminoácido.

[000141] Os inventores da presente invenção surpreendentemente verificaram que por introdução da substituições de aminoácidos 239D e 332E no domínio de CH2 da parte de Fc de anticorpos de anti-FLT3 conhecidos, tais como 4G8 e BV10 (supra), a atividade de matar célula desses anticorpos pode significativamente ser aumentada ou ainda detectada e gerada pela primeira vez. Em uma concretização, a substituições de aminoácidos são S239D e I332E. Isso é surpreendente, como foi experimentalmente mostrado que as mesmas modificações em geral não aumentam atividade de matar célula. Em outras palavras, em anticorpos diferentes dirigidos a um antígeno alvo diferente, a introdução dessas substituições não tinha nenhum efeito mensurável na morte de células.

[000142] Além disso, tais anticorpos modificados podem compreender ulteriormente modificações de aminoácido na região constante de cadeia pesada posições 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 336, e 337, que demonstraram permitir modificação de propriedades de ligação de FcR, função efectora, e proprie-

dades potencialmente clínicas de anticorpos (Vide USSN 11/124.620, depositado em 5 de maio de 2005, intitulado "Optimized Fc Variants").

[000143] Em particular, variantes adicionais que alteram ligação a um ou mais receptores de Fc de ser humano podem compreender uma modificação de aminoácido na região constante de cadeia pesada, como descrita aqui, selecionada do grupo que consiste em 221K, 221 Y, 222E, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225K, 225W, 227E, 227G, 227K, 227Y, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231 E, 231 G, 231 K, 231 P, 231 Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 233A, 233D, 233F, 233G, 233H, 233I, 233K, 233L, 233M, 233N, 233Q, 233R, 233S, 233T, 233V, 233W, 233Y, 234A, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234P, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234V, 234W, 234Y, 235A, 235D, 235E, 235F, 235G, 235H, 235I, 235K, 235M, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235T, 235V, 235W, 235Y, 236A, 236D, 236E, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236N, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 237D, 237E, 237F, 237H, 237I, 237K, 237L, 237M, 237P, 237Q, 237R, 237S, 237T, 237V, 237W, 237Y, 238D, 238E, 238F, 238G, 238H, 238I, 238K, 238L, 238M, 238N, 238Q, 238R, 238S, 238T, 238V, 238W, 238Y, 240A, 240I, 240M, 240T, 241D, 241E, 241L, 241R, 241S, 241W, 241Y, 243E, 243H, 243L, 243Q, 243R, 243 W, 243Y, 244H, 245A, 246D, 246E, 246H, 246Y, 247G, 247V, 249H, 249Q, 249Y, 255E, 255Y, 258H1258S, 258Y, 260D, 260E, 260H, 260Y, 262A, 262E, 262F, 262I, 262T, 263 A, 263I, 263M, 263T, 264A, 264D, 264E, 264F, 264G, 264H, 264I, 264K, 264L, 264M, 264N, 264P, 264Q, 264R, 264S, 264T, 264 W, 264 Y, 265F, 265G, 265H, 265I, 265L, 265M, 265N, 265P, 265Q, 265R, 265S, 265T, 265V, 265W, 265Y, 266A, 266I, 266M, 266T, 267D, 267E, 267F, 267H, 267I, 267K, 267L, 267M, 267N, 267P, 267Q, 267R, 267T, 267V, 267W, 267Y, 268D, 268E, 268F, 268G, 268I, 268K, 268L, 268M,

268P, 268Q, 268R, 268T, 268V, 268W, 269F, 269G, 269H, 269I,  
 269K, 269L, 269M, 269N, 269P, 269R, 269S, 269T, 269V, 269 W, 269  
 Y, 270F, 270G, 270H, 270I, 270L, 270M, 270P, 270Q, 270R, 270S,  
 270T, 270W, 270Y, 271A, 271D, 271E, 271F, 271G, 271H, 271I, 271,  
 271L, 271M, 271N, 271Q, 271R, 271 S, 271T, 271V, 271 W, 271 Y,  
 272D, 272F, 272G, 272H, 272I, 272, 272L, 272M, 272P, 272R, 272S,  
 272T, 272V, 272W, 272Y, 273I, 274D, 274E, 274F, 274G, 274H,  
 274I, 274L, 274M, 274N, 274P, 274R, 274T, 274V, 274W, 274Y,  
 275L, 275W, 276D, 276E, 276F, 276G, 276H, 276I, 276L, 276M,  
 276P, 276R, 276S, 276T, 276V, 276W, 276Y, 278D, 278E, 278G,  
 278H, 278I, 278K, 278L, 278M, 278N, 278P, 278Q, 278R, 278S,  
 278T, 278V, 278W, 280G, 280K, 280L, 280P, 280W, 281D, 281E, 281  
 K, 281N, 281P, 281Q, 281Y, 282E, 282G, 282K, 282P, 282Y, 283G,  
 283H, 283K, 283L, 283P, 283R, 283Y, 284D, 284E, 284L, 284N,  
 284Q, 284T, 284Y, 285D, 285E, 285K, 285Q, 285W, 285Y, 286E,  
 286G, 286P, 286Y, 288D, 288E, 288Y, 290D, 290H, 290L, 290N,  
 290W, 29 ID, 29 IE, 291G, 291 H, 291I, 291Q, 291 T, 292D, 292E,  
 292T, 292Y, 293F, 293G, 293H, 293I, 293L, 293M, 293N, 293P,  
 293R, 293S, 293T, 293V, 293 W, 293 Y, 294F, 294G, 294H, 294I,  
 294K, 294L, 294M, 294P, 294R, 294S, 294T, 294V, 294W, 294 Y,  
 295D, 295E, 295F, 295G, 295H, 295I, 295M, 295N,  
 295P, 295R, 295S, 295T, 295V, 295W, 295Y, 296A, 296D, 296E,  
 296G, 296H, 296I, 296K, 296L, 296M,  
 296N, 296Q, 296R, 296S, 296T, 296V, 297D, 297E, 297F, 297G,  
 297H, 297I, 297K, 297L, 297M, 297P, 297Q, 297R, 297S, 297T,  
 297V, 297W, 297Y, 298A, 298D, 298E, 298F, 298H, 298I, 298,  
 298M, 298N, 298Q, 298R, 298T, 298 W, 298Y, 299A, 299D, 299E, 299F,  
 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S  
 299V, 299W, 299Y, 300A, 300D, 300E, 300G, 300H, 300K, 300M,  
 300N, 300P, 300Q, 300R, 300S, 300T, 300V, 300W, 301D, 301E,



301H, 301Y, 302I, 303D, 303E, 303Y, 304D, 304H, 304L, 304N, 304T, 305E, 305T, 305Y, 313F, 317E, 317Q, 318H, 318L, 318Q, 318R, 318Y, 320D, 320F, 320G, 320H, 320I, 320L, 320N, 320P, 320S, 320T, 320V, 320W, 320Y, 322D, 322F, 322G, 322H, 322I, 322P, 322S, 322T, 322V, 322W, 322Y, 323I, 324D, 324F, 324G, 324H, 324I, 324L, 324M, 324P, 324R, 324T, 324V, 324W, 324Y, 32A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H, 325I, 325K, 325L, 325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V, 325W, 325Y, 326E, 326I, 326L, 326P, 326T, 327D, 327E, 327F, 327H, 327I, 327L, 327M, 327N, 327P, 327R, 327S, 327T, 327V, 327W, 327Y, 328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 328I, 328K, 328M, 328N, 328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 329D, 329E, 329F, 329G, 329H, 329I, 329L, 329M, 329N, 329Q, 329R, 329S, 329T, 329V, 329W, 329Y, 330E, 330F, 330G, 330H, 330I, 330L, 330M, 330N, 330P, 330R, 330S, 330T, 330V, 330W, 330Y, 331D, 331F, 331H, 331I, 331L, 331M, 331Q, 331R, 331T, 331V, 331W, 331Y, 333A, 333F, 333H, 333I, 333L, 333M, 333P, 333T, 333Y, 334A, 334F, 334I, 334L, 334P, 334T, 335D, 335F, 335G, 335H, 335I, 335L, 335M, 335N, 335P, 335R, 335S, 335V, 335W, 335Y, 336E, 336K, 336Y, 337E, 337H, e 337N, em que a numeração está de acordo com o índice de EU.

[000144] Além do mais, os anticorpos inventados podem compreender ulteriormente modificações de aminoácido do lado de fora da região de Fc, tais como aquelas descritas na patente de U.S. no. 7.276.585, depositada em 24 de março de 2005, intitulados "Immunoglobulin variants outside the região de Fc", incluindo modificações de aminoácido na região constante de cadeia pesada posições 118, 119, 120, 121, 122, 124, 126, 129, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 138, 139, 147, 148, 150, 151, 152, 153, 155, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179,

180, 183, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 201, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, e 236 e/ou incluindo modificações de aminoácido na região constante de cadeia leve posições 108, 109, 110, 111, 112, 114, 116, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 131, 137, 138, 140, 141, 142, 143, 145, 147, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 176, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 187, 188, 189, 190, 191, 193, 195, 197, 199, 200, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 210, 211, 212, e 213.

[000145] Essas modificações podem permitir outra modificação de propriedades de ligação de FcR, função efetora, e propriedades potencialmente clínicas de anticorpos. Em particular, variantes que alteram ligação a um ou mais receptores de Fc de ser humano podem compreender uma modificação de aminoácido na região constante de cadeia pesada, como descrita aqui, selecionada do grupo que consiste em 118K, 118E, 118Y, 119R, 119E, 119Y, 120R, 120E, 120I, 121 E, 121Y, 121 H, 122E, 122R, 124K, 124E, 124Y, 126K, 126D, 129L, 129D, 131G, 131T, 132D, 132R, 132L, 133R, 133E, 133L, 135I, 135E, 135K, 136E, 136K, 136I, 137E, 138S, 138R, 138D, 139I, 139E, 139K, 147A, 147E, 148Y, 148K, 150L, 150K, 150E, 151 A, 151 D, 152L, 152K, 153L, 153D, 155E, 155K, 155I, 157E, 157, 157Y, 159K, 159D, 159L, 160K, 160E, 160Y, 161 D, 162D, 162K, 162Y, 163R, 164R, 164E, 164Y, 165D, 165R, 165Y, 166D, 167A, 168L, 169E, 171G, 171 H, 172K, 172L, 172E, 173T, 173D, 174E, 174K, 174Y, 175D, 175L, 176D, 176R, 176L, 177R, 177E, 177Y, 178D, 179K, 179Y, 179E, 180, 180L, 180E, 183T, 187I, 187, 187E, 188I, 189D, 189G, 190I, 190K, 190E, 191 D, 191 R, 191Y, 192N, 192R, 192L, 193F, 193E, 194R, 194D, 195R, 195D, 195Y, 196K, 196D, 196L, 197R, 197E, 197Y, 198L,

199T, 199D, 199K, 201 E, 201 K, 201 L, 203D, 203L, 203K, 205D, 205L, 206A, 206E, 207K, 207D, 208R, 208E, 208 Y, 209E, 209K, 209Y, 210L, 210E, 210Y, 211 R, 211 E, 211Y, 212Q, 212K, 212H, 212L, 212Y, 213N, 213E, 213H, 213L, 213Y, 214N, 214E, 214H, 214L, 214Y, 216N, 216K, 216H, 216L, 216Y, 217D, 217H, 217A, 217V, 217G, 218D, 218E, 218Q, 218T, 218H, 218L, 218Y, 219D, 219E, 219Q, 219K, 219T, 219H, 219L, 219I, 219Y, 205A, 210A, 213 A, 214A, 218A, 221 K, 221Y, 221 E, 221 N, 221Q, 221 R, 221 S, 22 IT, 221 H, 221 A, 221V, 221 LI 221I, 221 F, 221 M, 221 W, 221 PI 221G, 222E, 222Y1 222D1 222N, 222Q, 222R, 222S, 222T, 222H, 222V, 222L, 222I, 222F, 222M1 222W, 222P, 222G, 222A, 223D, 223N, 223Q, 223R, 223S, 223H, 223A, 223V, 223L, 223I, 223F, 223M, 223Y, 223 WI 223P, 223G, 223E1 223K, 224D, 224N, 224Q, 224K, 224R, 224S, 224T, 224V1 224L1 224I, 224F1 224M1 224W, 224P, 224G, 224E, 224Y, 224A, 225D, 225N1 225Q, 225R, 225S, 225H, 225A1 225V, 225L, 225I, 225F1 225M, 225Y1 225P1 225G1 225E, 225, 225W, 226S, 227E, 227, 227Y, 227G, 227D, 227N, 227Q, 227R, 227S, 227T, 227H, 227A, 227V, 227L, 227I, 227F, 227M, 227W, 228K, 228Y1 228G, 228D1 228N1 228Q1 228R, 228T, 228H1 228A, 228V, 228L, 228I, 228F, 228M, 228W, 229S, 230A, 230E, 230Y, 230G, 230D, 230N, 230Q, 230K, 230R, 230S, 230T, 230H, 230V, 230L, 230I, 230F1 230M1 230W, 231 K, 231 P, 231 D, 231 N, 231Q, 231 R, 231S, 231T, 231 HI 231V1 231 L, 231I, 231 F} 231 M, 231W, 232E, 232K, 232Y, 232G, 232D, 232N, 232Q, 232R, 232S, 232T, 232H, 232A, 232V, 232L, 232I, 232F, 232M1 232W, 233D, 233N1 233Q, 233R, 233S, 233T, 233H, 233A, 233V, 233L, 233I, 233F, 233M, 233Y, 233 W, 233G, 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F1 234K, 234R, 234S, 234A, 234M, 234G, 235D, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 235E, 235K, 235R1 235A1 235M, 235W, 235P, 235G, 236D, 236E, 236N, 236Q1

236K, 236R, 236S, 236T, 236H, 236A, 236V, 236L, 236I, 236F1 236M, 236Y, 236W, e 236P, em que a numeração está de acordo com o índice de EU.

[000146] Em particular, variantes que alteram ligação a um ou mais receptores de Fc de ser humano pode compreender uma modificação de aminoácido na cadeia leve região constante, como descrita aqui, selecionada do grupo que consiste em 108D, 108I, 108Q, 109D, 109P, 109R, H OE, 110I, 110K, 111 E, 111 K, 111 LI 112E, 112R, 112Y1 114D, 114I, 114K, 116T, 121 DI 122R, 122S, 122Y, 123L, 123R, 124E, 125E, 125K, 126D, 126L, 126Q, 127A, 127D, 127K, 128N, 129E, 129I, 129K, 131T, 137K, 137S, 138D, 138K, 138L, 140E1 140H, 140K, 141 EI 141 K, 142D, 142G, 142L, 143A, 143L, 143R, 145D, 145T, 145Y, 147A, 147E, 147K, 149D, 149Y1 150A, 151I, 151 KI 152L, 152R, 152S, 153D, 153H, 153S, 154E, 154R, 154V, 155E, 155I, 155K, 156A, 156D, 156R, 157N, 158D, 158L, 158R, 159E1 159K1 159L, 160, 160V, 161 KI 161 LI 162T, 163E, 163K, 163T, 164Q, 165K, 165P, 165Y, 166E, 166M, 166S1 167K1 167L, 168K, 168Q, 168Y, 169D, 169H, 169S, 170I, 170N, 170R, 171A1 171 N, 171V, 172E1 172I1 172K, 173K, 173L, 173Q, 174A, 176T, 180E, 180K, 180S, 181 KI 182E, 182R, 182T, 183D, 183L, 183P, 184E, 184K, 184Y, 185I, 185Q, 185R, 187K, 187Y1 188E, 188S, 188Y, 189D, 189K, 189Y, 190E, 190L, 190R, 191 E, 191 RI 191 S, 193E, 193K, 193S, 195I, 195K, 195Q, 197E, 197K, 197L, 199E, 199K, 199Y, 200S, 202D, 202R, 202Y, 203D, 203L, 203R, 204T, 205E, 205K, 206E, 206I, 206K, 207A, 207E, 207L, 208E, 208K, 208T, 210A, 210E, 210K, 211A, 211 E, 211 P, 212E, 212K, 212T, 213L, 213R, em que a numeração está de acordo com o índice de EU.

[000147] Substituições adicionais que podem também ser usadas na presente invenção incluem outras substituições que modulam afinidade de receptor de Fc, função efetora mediada por FcR e/ou função

efetora mediada por complemento incluem mas não são limitadas a 298A, 298T, 326A, 326D, 326E, 326W, 326Y, 333A, 333S, 334L, e 334A (US 6,737,056; Shields e outros 5 Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604; US 6,528,624; Idusogie e outros, 2001, J. Immunology 166:2571-2572), 247L, 255L, 270E, 392T, 396L, e 421 K (USSN 10/754,922; USSN 10/902,588), e 280H, 280Q, e 280Y (USSN 10/370,749).

[000148] Em outras concretizações, anticorpos da presente invenção podem ser combinadas com variante constante de cadeia pesadas que alteram ligação de FcRn. Essas incluem modificações que modificam afinidade de FcRn de um modo específico de pH. Em particular, variantes que aumentam ligação de Fc a FcRn incluem mas não são limitadas a: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton e outros, 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton e outros 2006 Journal of Immunology 176:346- 356, USSN 11/102621, PCT US2003/033037, PCT/US2004/01 1213, USSN 10/822300, USSN 10/687118, PCT/US2004/034440, USSN 10/966673), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields e outros, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604, USSN 10/982470, US6737056, USSN 11/429793, USSN 11/429786, PCT/US2005/02951 1, USSN 11/208422), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311 S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall Acqua e outros Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, US7083784, PCT US97/03321, US6821505, PCT US01/48432, USSN 11/397328), 257C, 257M, 257L, 257N, 257Y, 279E, 279Q, 279Y, insertion of Ser depois de 281, 283F, 284E, 306Y, 307V, 308F, 308Y 311V, 385H, 385N, (PCT US2005/041220, USSN 11/274065, USSN 11/436,266) 204D, 284E, 285E, 286D, e 290E (PCT/US2004/037929 incorporada aqui em sua

totalidade por referência).

[000149] Em algumas concretizações da invenção, anticorpos podem compreender modificações isotópicas, que é, modificações em uma IgG de origem no tipo de aminoácido em um IgG substituta.

[000150] A presente invenção provê anticorpos de variante que são otimizados para numerosas propriedades terapeuticamente relevantes. Uma anticorpo de variante compreende um ou mais modificações de aminoácido em relação a um anticorpo de origem, em que a(s) modificação(ões) de aminoácido proveem uma ou mais propriedades otimizadas. Assim os anticorpos da presente invenção são anticorpos de variante. Um anticorpo da presente invenção difere na sequência de aminoácidos de seu anticorpo de origem em virtude de pelo menos as duas modificações de aminoácido 239D e 332E. Adicionalmente, os anticorpos de variante da presente invenção podem compreender mais do que as duas modificações de aminoácido acima mencionadas quando comparadas com a origem, por exemplo de cerca de três a cinquenta modificações de aminoácido, por exemplo, de cerca de três a dez modificações de aminoácido, de cerca de três a cerca de cinco modificações de aminoácido, etc., em comparação com a origem. Assim as sequências dos anticorpos de variante e aquelas dos anticorpos de origem são substancialmente homólogas. Por exemplo, o anticorpo de sequências de variante aqui possuirão cerca de 80% de homologia com a sequência de anticorpo de origem, por exemplo, pelo menos cerca de 90% de homologia, e pelo menos cerca de 95% de homologia, etc.

[000151] Os anticorpos da presente invenção podem compreender modificações de aminoácido, mas proveem propriedades de função efetora otimizadas em relação à origem. Substituições e propriedades de função efetora otimizadas são descritas no pedido de patente US 2004-0132101, pedido de PCT US03/30249, e no pedido de patente

US 7.317.091 10/822.231, (Propriedade que podem ser otimizadas incluem mas não são limitadas a afinidade aumentada e reduzida para uma FcR. Em uma concretização, os anticorpos da presente invenção são otimizados para possuir afinidade aumentada para a FcR de ativação de ser humano, por exemplo, FcRI, FcRIIa, FcRIIc, FcRIIIa, e FcRIIIb. Em uma concretização, um anticorpo da invenção é otimizado para possuir afinidade aumentada para uma FcRIIIa ser humano. Em uma concretização substituta, os anticorpos são otimizados para possuir afinidade reduzida para o receptor inibitório de ser humano FcRIIb. Essas concretizações são antecipadas para prover anticorpos com propriedades terapêuticas aumentadas em seres ser humanos, por exemplo, função efetora aumentada e potência anticâncer maior.

[000152] Em outras concretizações, anticorpos da presente invenção proveem afinidade aumentada para uma ou mais FcRs, ainda afinidade reduzida para uma ou mais outras FcRs. Por exemplo, um anticorpo da presente invenção pode ter ligação aumentada a FcRIIIa, ainda ligação reduzida a FcRIIb. Alternativamente, um anticorpo da presente invenção pode ter ligação aumentada a FcRIIa e FcRI, ainda ligação reduzida a FcRIIb.

[000153] As modificações da invenção podem aumentar afinidade de ligação para uma ou mais FcRs. Por "afinidade maior" ou "afinidade aperfeiçoada" ou "afinidade aumentada" ou "afinidade melhor " do que uma imunoglobulina de origem, como usada aqui quer se dizer que uma variante de Fc se liga a um receptor de Fc com uma constante de equilíbrio significativamente mais alto de associação ( $K_a$ ) ou uma constante de equilíbrio mais baixa de associação ( $K_d$ ) do que o polipeptídeo de origem quando as quantidades de variante e polipeptídeo de origem no ensaio de ligação são essencialmente as mesmas. Por exemplo, a variante de Fc como afinidade de ligação de FcR aperfeiçoada pode exibir de cerca de 5 vezes to cerca de 1000 vezes, por



exemplo, de cerca de 10 vezes a cerca de 500 vezes aperfeiçoamento na afinidade de ligação de receptor de Fc em comparação com o polipeptídeo de origem, onde afinidade de ligação de receptor de Fc é determinada por métodos conhecidos na técnica. Correspondentemente, por "afinidade reduzida" quando comparada com um polipeptídeo de origem de Fc como usado aqui quer se dizer que uma variante de Fc liga um receptor de Fc com  $K_a$  significativamente baixa ou  $K_d$  mais alto do que o polipeptídeo de origem.

[000154] Concretizações compreendem otimização de Fc que se liga a uma FcR de ser humano, no entanto em concretizações os anticorpos substitutas da presente invenção possuem afinidade reduzida ou aumentada para FcRs de organismos de não ser humano, incluindo mas não limitados a roedores e primatas não humanos. Anticorpos que são otimizadas para que se ligam a uma FcR não humano podem encontrar uso na experiência. Por exemplo, modelos de camundongo estão disponíveis para uma variedade de doenças que permitem testagem de propriedades tais como eficácia, toxicidade, e farmacocinéticas para um dado fármaco candidato. Como é conhecido na técnica, células de câncer podem ser enxertadas ou injetadas para dentro de camundongos para imitar um câncer de ser humano, um processo chamado de xenoenxerto. Testagem de anticorpos que compreendem anticorpos que são otimizados para um ou mais FcRs de camundongo, pode prover informação valiosas com relação à eficácia da proteína, seu mecanismo de ação, e semelhantes. Os anticorpos da presente invenção podem também ser otimizados para funcionalidade aumentada e/ou propriedades de solução na forma aglicosilada. Em uma concretização, os anticorpos aglicosilados da presente invenção ligam um ligante de Fc com afinidade maior do que a forma aglicosilada do anticorpo de origem. O ligantes de Fc incluem, mas não são limitadas a FcRs, Clq, FcRn, e proteínas A e G, e podem ser de qualquer fonte

incluindo mas não limitados a ser humano, camundongo, rato, coelho, ou macaco. Em uma concretização substituta, os anticorpos são otimizadas como sendo mais estáveis e/ou mais solúveis do que a forma aglicosilada do anticorpo de origem.

[000155] Anticorpos da invenção podem compreender modificações que modulam a interação com ligantes de Fc outros que não FcRs, incluindo mas não limitados a proteínas complementar, FcRn, e homólogos de receptor de Fc (FcRHs). FcRHs incluem mas não são limitados a FcRHI, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5, e FcRH6 (Davis e outros, 2002, Immunol. Reviews 190:123-136).

[000156] Anticorpos da presente invenção podem compreender um ou mais modificações que proveem propriedades otimizadas que não são especificamente relacionadas com função efetora per se. As modificações podem ser modificações de aminoácido, ou podem ser modificações que são feitas enzimaticamente ou quimicamente. Tal (ais) modificação(ões) provavelmente proveem algum aperfeiçoamento no anticorpo, por exemplo um aumento em sua estabilidade, solubilidade, função ou uso clínico. A presente invenção contempla uma variedade de aperfeiçoamentos que podem ser feitos por acoplamento dos anticorpos da presente invenção com modificações adicionais.

[000157] Em uma concretização, a região variável de um anticorpo da presente invenção podem ser amadurecidas por afinidade, isto é, modificações de aminoácido foram feitas nos domínios de VH e/ou VL do anticorpo para aumentar ligação de o anticorpo a seu antígeno alvo. Tais tipos de modificações podem aperfeiçoar a cinética de associação e/ou a dissociação para a ligação ao antígeno alvo. Outras modificações incluem aquelas que aperfeiçoam seletividade para antígeno alvo vs. alvos alternativos. Essas incluem modificações que aperfeiçoam seletividade para antígeno expresso em células alvo vs células não alvo. Outros aperfeiçoamentos para as propriedades de reconheci-

mento de alvo podem ser providos por modificações adicionais. Tais propriedades podem incluir, mas não são limitadas a, propriedades cinéticas específicas (isto é cinética de associação e dissociação), seletividade para o alvo particular versus alvos alternativos, e seletividade para uma forma específica de alvo versus formas alternativas. Exemplos incluem formas comprimento total versus variantes de união, superfície de célula vs. formas solúveis, seletividade para várias variantes polimórficas, ou seletividade para formas conformacionais específicas do antígeno alvo.

[000158] Anticorpos da invenção podem compreender um ou mais modificações que proveem internalização reduzida ou aumentada de um anticorpo. Em uma concretização, anticorpos da presente invenção podem ser utilizados ou combinados com modificações adicionais a fim de reduzir a internalização celular de um anticorpo que ocorre via interação com um ou mais ligantes de Fc. Essa propriedade pode ser esperada para aumentar função efetora, e potencialmente reduzir imunogenicidade dos anticorpos da invenção. Alternativamente, anticorpos da presente invenção podem ser utilizados diretamente ou combinados com modificações adicionais a fim de aumentar a internalização de celular de um anticorpo que ocorre via interação com um ou mais ligantes de Fc.

[000159] Em uma concretização, modificações são feitas para aperfeiçoar propriedades biofísicas dos anticorpos da presente invenção, incluindo, mas não limitados a estabilidade, solubilidade, e estado oligomérico. Modificações podem incluir, por exemplo, substituições que proveem interações intramoleculares mais favoráveis no anticorpo tal como para prover maior estabilidade, ou substituições de aminoácidos não polar expostos com aminoácidos polares para for solubilidade mais alta. Numerosos objetivos de otimização e métodos são descritos no pedido de patente US 2004-0110226, que podem encontrar uso

para o engenheiramento de modificações adicionais para ulteriormente otimizar os anticorpos da presente invenção Os anticorpos da presente invenção podem também ser combinados com modificações adicionais que reduzem tamanho ou estado oligomérico, tal que preparação de tumor é aumentada, ou taxas de depuração in vivo são aumentadas quando desejado.

[000160] Outras modificações nos anticorpos da presente invenção incluem aquelas que permite a formação específica ou moléculas homodiméricas ou homomultiméricas. Tais modificações incluem mas não são limitadas a dissulfetos engenheiradas, bem como modificações químicas ou métodos de agregação que podem prover um mecanismo para a geração de homodiméricos ou homomultímeros covalentes. Por exemplo, métodos de engenheiramento de composições de tais moléculas são descritos em Kan e outros, 2001, J. Immunol., 2001, 166: 1320-1326; Stevenson e outros, 2002, Recent Results Cancer Res. 159 104-12; US 5,681,566; Caron e outros, 1992, J. Exp. Med. 176:1191-1195, and Shopes, 1992, J. Immunol. 148(9):2918-22. Modificações adicionais nas variantes da presente invenção incluem aquelas que permitem a formação específica ou moléculas heterodiméricas, bifuncionais, e/ou multifuncionais. Tais modificações incluem, mas não são limitadas a, um ou mais substituições de aminoácidos no domínio de CH3, em que as substituições reduzem a formação de homodímero e aumentam a formação de heterodímero. Por exemplo, métodos de engenheiramento e composições de tais moléculas são descritas em Atwell e outros, 1997, J. Mol. Biol. 270(l):26-35, e Carter e outros, 2001, J. Immunol. Methods 248:7-15, cada um incorporado aqui em sua totalidade por referência. Modificações adicionais incluem modificações na articulação e domínios de CH3, em que as modificações reduzem a tendência de formar dímeros.

[000161] Em outras concretizações, os anticorpos da presente in-

venção compreendem modificações que removem sítios de degradação proteolítica. Esses podem incluir, por exemplo, sítios de protease que reduzem rendimentos de produção, bem como sítios de protease que degradam a proteína administrada in vivo. Em uma concretização, modificações adicionais são feitas para remover sítios de degradação covalentes tais como sítios de desamidação (isto é desamidação de resíduos de glutaminila e asparaginila aos resíduos de glutamina e aspartila correspondentes), oxidação, e degradação proteolítica. Sítios de desamidação que são particularmente úteis para remover são aqueles que aumentam tendência de desamidação, incluindo, mas não limitados a resíduos de asparaginila e glutamila seguidos por glicinas (pedaços de NG e QG, respectivamente). Em tais casos, substituição de qualquer resíduo pode significativamente reduzir a tendência de desamidação. Sítios de oxidação comuns incluem resíduos de cisteína e metionina. Outras modificações covalentes, que pode ou ser introduzidas ou removidas, incluem hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxila de resíduos de serila ou treonila, metilação dos "grupos amina de cadeias laterais de lisina, arginina e (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilação da amina N-terminal, e amidação de qualquer grupo carboxila C-terminal. Modificações adicionais também podem incluir mas não são limitadas a modificações pós-traducionais tal como glicosilação e fosforilação ligada a N ou O.

[000162] Modificações podem incluir aqueles que aperfeiçoam rendimentos de expressam e/ou purificação de hospedeiros ou células hospedeiras comumente usadas para a produção de biológicas. Essas incluem, mas não são limitadas a várias linhas de células de mamífero (por exemplo, CHO), linhas de células de levedura, linhas de células bacterianas, e plantas. Modificações adicionais incluem modificações que removem ou reduzem a capacidade de cadeia pesadas para for-

mar ligações de dissulfeto de intercadeia. Modificações adicionais incluem modificações que removem ou reduzem a capacidade de cadeia pesadas de formar ligações de dissulfeto de intracadeia.

[000163] Os anticorpos da presente invenção podem compreender modificações que incluem o usando-se aminoácidos não naturais incorporados usando-se, por exemplo, as tecnologias desenvolvidas por Schultz and colleagues, incluindo mas não limitados a métodos descritos por Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson e outros, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2):7566-71, Zhang e outros, 2003, 303(5656):371-3, and Chin e outros, 2003, Science 301(5635):964-7. Em algumas concretizações, essas modificações permitem manipulação de várias propriedades funcionais, de biofísica, imunológica ou de fabricação discutidas acima. Nas concretizações adicionais, essas modificações permitem modificação química adicional para outras finalidades. Outras modificações são contempladas aqui. Por exemplo, o anticorpo pode ser ligado a um de uma variedade de polímeros não proteínicos, por exemplo, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol. Modificações adicionais de aminoácido podem ser feitas para permitir modificação específica ou não específica química ou pós-traducional dos anticorpos. Tais modificações, incluem, mas não são limitadas a PEGuilação e glicosilação. Substituições específicas que podem ser utilizadas para permitir PEGuilação incluem, mas não são limitadas a, introdução de novos resíduos de cisteína ou aminoácidos não naturais tais que químicas de acoplamento eficazes e específicas podem ser usadas para ligar uma PEG ou de outra maneira porção polimérica. Introdução de sítios de glicosilação específicos pode ser alcançada por introdução de novas sequências de N-X-T/S para dentro dos anticorpos da presente invenção.

[000164] Modificações covalentes de anticorpos estão incluídas den-

tro do escopo dessa invenção, e são em geral, mas nem sempre, feitas pós-traducionalmente. Por exemplo, vários tipos de modificações covalentes do anticorpo são introduzidas para dentro da molécula por reação de resíduos de aminoácido específicos do anticorpo com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais selecionadas ou nos resíduos N- ou C-terminal.

[000165] Em algumas concretizações, a modificação covalente dos anticorpos da invenção compreende a adição de um ou mais rótulos. O termo "grupo de marcação" é qualquer rótulo detectável. Em algumas concretizações, o grupo de marcação é acoplado ao anticorpo via braços espaçador de vários comprimentos para reduzir obstrução estérica potencial. Vários métodos para a marcação de proteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados na realização da presente invenção. Em geral, rótulos caem dentro de uma variedade de classes, dependendo do ensaio em que ele devem ser detectados: a) rótulos isotópicos, que podem ser isótopos pesados ou radioativos; b) rótulos magnéticos (por exemplo, partículas magnéticas); c) porções reativas redox; d) corantes óticos; grupos enzimáticos (por exemplo, peroxidase de rábano picante, beta-galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina); e) grupos biotinilados; ef) epitopos de polipeptídeo predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências de par de zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, etiquetas de epitopo, etc.). Em algumas concretizações, o grupo de marcação é acoplado ao anticorpo via braços espaçador de vários comprimentos para reduzir obstrução estérica potencial. Vários métodos para a marcação de proteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados na realização da presente invenção. Rótulos específicos incluem corantes óticos, incluindo, mas não limitados a cromóforos, fósforos e fluoróforos, com o último sendo específico em muitos casos. Fluoróforos podem ser ou



fluoros de "molécula pequena", ou fluoros proteináceos. Por "rótulo fluorescente" quer se dizer que qualquer molécula que pode ser detectada via suas propriedades fluorescentes inerentes.

[000166] Em uma concretização, os anticorpos da invenção são "proteínas de fusão" de anticorpo, algumas vezes chamados aqui de "conjugados de anticorpo". O par de fusão ou par de conjugado pode ser proteináceo ou não proteináceo; o último em geral sendo gerado usando-se grupos funcionais no anticorpo e no par de conjugado. Padrões de fusão e conjugado podem ser qualquer molécula, incluindo polipeptídeos e compostos químicos de molécula pequena. Por exemplo, uma variedade de conjugados de anticorpo e métodos descritos em Trail e outros, 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:584-588. Pares de conjugado possíveis incluem, mas não são limitados a citocinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agente quimioterapêutico, agentes de antiangiogênese, inibidores de tirosina quinase, e outros agentes terapêuticamente ativos. Em algumas concretizações, pares de conjugado podem ser considerados de mais como cargas úteis, isso quer dizer que o objetivo de um conjugado é o fornecimento direcionado do par de conjugado para uma célula direcionada, por exemplo uma célula de câncer ou célula imune, pelo anticorpo. Assim, por exemplo, a conjugação de uma toxina a alvos de anticorpo do fornecimento da toxina a células que expressam o antígeno alvo. Como será apreciado por aquele versado na técnica, na realidade dos conceitos e definições de fusão e conjugado estão se sobrepondo. A designação de um anticorpo como uma fusão ou conjugado não destina-se a obrigá-lo a qualquer concretização particular da presente invenção. Certamente, esses termos são usados livremente para transportar o amplo conceito de que qualquer anticorpo da presente invenção pode estar ligado geneticamente, quimicamente, ou de outra maneira, a um ou mais polipeptídeos ou moléculas para prover alguma propriedade de-

sejada.

[000167] Conjugados adequados incluem, mas não são limitados a, rótulos como descrito abaixo, fármacos e agentes citotóxicos incluindo, mas não limitados a, fármacos citotóxicos (por exemplo, agentes quimioterapêuticos) ou toxinas ou fragmentos ativos de tais toxinas. Toxinas e seus fragmentos correspondentes adequados incluem cadeia A de difteria, cadeia A de exotoxina, cadeia A de ricina A, cadeia A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina e semelhantes. Agentes citotóxicos também incluem radioquímicos feitos por conjugação de radioisótopos a anticorpos, ou ligação de um radionuclídeo a um agente de quelação que foi covalentemente ligado ao anticorpo. Concretizações adicionais utilizam caliqueamicina, aunstatinas, geldanamicina, maitansina, e duocarmicinas e análogos; para o último, vide o pedido de patente U.S. 2003/0050331

[000168] Em uma concretização, os anticorpos da presente invenção são fundidos ou são conjugados a uma citocina. POr "citocina" como usado aqui quer se dizer que um termo genérico para proteínas liberadas por uma população de células que agem sobre uma outra célula como mediadores intercelulares. Por exemplo, como descrito em Penichet e outros, 2001, J Immunol Methods 248- 91-101, citocinas podem ser fundidas a anticorpo para prover um conjunto de propriedades desejáveis. Exemplos de tais citocinas são linfocinas, monocinas, e hormônio de polipeptídeo tradicional. Incluídas entre as citocinas são hormônio de crescimento tal como hormônio de crescimento ser, hormônio de crescimento de ser humano de N-metionila, e hormônio de crescimento bovino; hormônio da paratireoide, tiroxina; insulina; pró-insulina; relaxina, prorrelaxina; hormônio de glicoproteína tais como hormônio de estimulação de antígeno (FSH), hormônio de estimulação de tireoide(TSH), e hormônio de lutenização (LH); fator de crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblasto, prolactina,

lactogênio placentar; fator alfa e beta de necrose de tumor; substância de inibição de mulle[pi]an, peptídeo associado a gonadotropina de camundongo; inhibina; activina, fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento de nervo tal como NGF-beta; fator de crescimento de plaqueta, fatores de crescimento de transformação (TGFs) tais como TGF- alfa e TGF-beta; fator de crescimento de tipo insulina I e II; eritropoietina (EPO); fatores de osteoindutiva, interferons tais interferon-alfa, beta, e -gama; fatores de estimulação de colônia (CSFs) tais como macrófago- CSF (M-CSF), granulócito macrófago-CSF (GM-CSF); e granulócito-CSF (G-CSF), interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL- 11, IL-12, IL- 15, um fator de necrose de tumor tal como TNF-alfa ou TNF-beta; C5a; e outros fatores de polipeptídeo incluindo LIF e ligante de kit (KL). Como usado aqui, o termo citocina inclui proteínas oriundas de fontes naturais ou oriundas de cultura de células recombinantes, e equivalente biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa.

[000169] Em uma concretização alternativa, os anticorpos da presente invenção são fundidos, são conjugados ou operavelmente são ligados a uma toxina, incluindo mas não limitados a toxinas de molécula pequena e toxinas enzimaticamente ativas de bactérias, fungos, de origem animal ou de planta, incluindo fragmentos e/ou suas variantes. Por exemplo, uma variedade de imunotoxinas e métodos de imunotoxina são descritos em Thrush e outros, 1996, Ann. Rev. Immunol. 14:49-71. Toxinas de molécula pequena incluem, mas não são limitadas a caliqueamicina, maitansina (a patente U.S. no. 5.208.020), trico-teno, e CC1065. Em uma concretização da invenção, o anticorpo é conjugado a um ou mais moléculas de maitansina (por exemplo, cerca de 1 a cerca de 10 moléculas de maitansina por molécula de anticorpo). Maitansina pode, por exemplo, ser convertida em May-SS-Me que

pode ser reduzida a ay-SH3 e reagida com anticorpo modificado (Chan e outros, 1992, *Cancer Research* 52 127-131) para gerar um conjugado de anticorpo maitansinoide. Um outro conjugado de interesse compreende um anticorpo conjugado a uma ou mais moléculas caliqueamicina. A família de caliqueamicina de antibióticos é capaz de produzir DNA de fio duplo que rompe a concentrações sub-picomolares. Análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser usados incluem são, por exemplo, revelados em Hinman e outros, 1993, *Cancer Research* 53 3336-3342, Lode e outros, 1998, *Cancer Research* 58 2925-2928, US 5,714,586; US 5,712,374, US 5,264,586; e US 5,773,001. 10 Análogos de dolastatina tais como auristatina E (AE) e monometilauristatina E (MMAE) podem encontrar uso como conjugados para os anticorpos da presente invenção (Doronina e outros, 2003, *Nat Biotechnol* 21(7):778-84; Francisco e outros, 2003 *Blood* 102(4): 1458-65). Toxinas enzimaticamente ativas úteis incluem mas não são limitadas a cadeia A de difteria, fragmentos ativos de não ligação de toxina de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Vide, por exemplo, PCT WO 93/21232. A presente invenção ulteriormente contempla um conjugado entre um anticorpo da presente invenção e um composto com atividade nucleolítico, por exemplo, uma ribonuclease ou endonuclease de DNA tal como desoxirribonuclease (DNase).

[000170] Em uma concretização alternativa, um anticorpo da presente invenção pode ser fundido, conjugado, ou operavelmente ligado a um radioisótopo para formar um radioconjugado. Uma variedade de isótopos radioativos estão disponíveis para a produção de anticorpos

de radioconjugados. Exemplos incluem, mas não são limitadas a, At211, 1131, 1125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, e isótopos radioativos de Lu.

[000171] Em ainda uma outra concretização, um anticorpo da presente invenção pode ser conjugado a um "receptor" (tal como estreptavidina) para a utilização no predirecionamento de tumor em que o conjugado de receptor de anticorpo é administrado ao paciente, seguido por remoção de conjugado não ligado da circulação usando-se um agente de depuração e então administração de um "ligante" (por exemplo avidina) que é conjugado a um agente citotóxico (por exemplo a radionucleotídeo). Em uma concretização alternativa, o anticorpo é conjugado a operavelmente ligado a uma enzima a fim de empregar terapia de profármaco de enzima dependente de anticorpo (ADEPT). ADEPT pode ser usada por conjugação de ou operavelmente ligação do anticorpo a uma enzima de ativação de profármaco que converte um profármaco (por exemplo, um agente quimioterapêutico de peptídica, vide pedido de PCT WO 81/01 145, incorporado aqui em sua totalidade por referência) a um fármaco de anticâncer. Vide, por exemplo, pedido de PCT WO 88/07378 ou a patente de U.S. no. 4.975.278, cada um incorporado aqui em sua totalidade por referência. O componente de enzima do imunoconjugado útil para ADEPT inclui qualquer enzima capaz de agir em um profármaco de tal modo de modo a convertê-lo em sua forma citotóxica, mais ativa. Enzimas que são úteis no método dessa invenção incluem mas não são limitadas a fosfatase alcalina úteis para a conversão de profármacos contendo fosfato em fármacos livres; arilsulfatase útil para a conversão de profármacos contendo sulfato em fármacos livres; desaminase de citosina útil para a conversão de 5-fluorocitosina não tóxica no fármaco de anticâncer, 5- fluorouracila; proteases, tais como protease de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e

L), que são úteis para a conversão de profármacos contendo peptídeo em fármacos livres; D- alanilcarboxipeptidases, úteis para a conversão de profármacos que contêm substituintes de D-aminoácido, enzimas de clivagem de carboidrato tais como beta-galactosidase e neuraminidase úteis para a conversão de profármacos glicosilados em fármacos livres, beta-lactamase útil para a conversão de fármacos derivatizados com alfa-lactamas em fármacos livres, e amidases de penicilina, tal como amidase de penicilina V ou amidase de penicilina G, útil para a conversão de fármacos derivatizados em seus nitrogênio de amina com grupos fenoxiacetila ou fenilacetila, respectivamente, em fármacos livres. Alternativamente, anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos na técnica como "abzimas", podem ser usadas para converter os profármacos da invenção em fármacos ativos livres (vide, por exemplo, Massey, 1987, Nature 328. 457-458, incorporados aqui em sua totalidade por referência). Conjugados de abзима de anticorpo podem ser preparados para o fornecimento de abзима a uma população de células de tumor. Uma variedade de conjugados adicionais são contemplados para os anticorpos da presente invenção. Uma variedade de agente quimioterapêuticos, agentes antiangiogênicos, inibidores de tirosina quinase, e outros agentes terapêuticos são descritos abaixo, que podem encontrar uso como conjugados de anticorpo.

[000172] Também contemplado como pares de conjugado e fusão são polipeptídeos de Fc. Assim um anticorpo pode ser um polipeptídeo de Fc multimérico, compreendendo duas ou mais regiões de Fc. A vantagem de tal molécula é que ela provê múltiplos sítios de ligação para receptores de Fc com uma molécula de proteína simples. Em uma concretização, regiões de Fc podem ser ligadas usando-se uma abordagem de engenhieramento químico. Por exemplo, Fab's e Fc's podem ser ligados por ligações de tioéter originando resíduos de ciste-

ina nas articulações, gerando moléculas tal como FabFc2. Regiões de Fc podem ser ligadas usando-se engenheiramento de dissulfeto e/ou reticulação química. Em uma concretização, regiões de Fc podem ser ligadas geneticamente. Em uma concretização, regiões de Fc em um anticorpo são ligadas geneticamente para gerar regiões de Fc em tandem ligadas como descrita no pedido de patente US 2005-0249723, intitulado "polipeptídeos de Fc como novos sítios de ligação de ligante de Fc". Polipeptídeos de Fc em tandem ligados podem compreender duas ou mais regiões de Fc, por exemplo, uma a três, duas, etc, regiões de Fc. Pode ser vantajoso explorar numerosos construtos de engenheiramento a fim de se obter? homo- ou hetero- anticorpos em tandem ligados com as propriedades funcionais e estruturais mais favoráveis. Anticorpos em tandem ligados podem ser der homo- anticorpos em tandem ligados, que é um anticorpo de um isótipo é fundido geneticamente a um outro anticorpo do mesmo isótipo. É antecipado que uma vez que há múltiplos sítios de ligação FcR, Clq, e/ou FcRn sobre polipeptídeos de Fc em tandem ligados, funções de efector e/ou farmacocinética podem ser aumentadas. Em uma concretização alternativa, anticorpos de diferentes isótipos podem ser em tandem ligados, chamadas de hetero- anticorpos em tandem ligados Por exemplo, por causa da capacidade de direcionar receptores de FcR e FcRI, um anticorpo que liga tanto FcRs quanto FcRI podem prover um aperfeiçoamento clínico significativo.

[000173] Pares de conjugado e fusão podem ser ligados a qualquer região de um anticorpo da presente invenção, incluindo nos N- ou C-terminais, ou em algum resíduo em entre os terminais. Em uma concretização, um par de conjugado ou fusão é ligado no N- ou C-terminal do anticorpo, por exemplo, o N-terminal. Uma variedade de ligantes podem encontrar uso na presente invenção para covalentemente ligar anticorpos a uma fusão ou par de conjugado. Por "ligante", "sequência



de ligante", "espaçador", "sequência amarrada " ou seu equivalentes gramaticais, aqui quer se dizer que uma molécula ou grupo de moléculas (tal como monômero ou polímero) que liga duas moléculas e frequentemente serve para colocar as duas moléculas em uma configuração desejável. Ligantes são conhecidos na técnica, por exemplo, ligantes homo-ou hetero-bifuncionais como são bem conhecidos (vide, 1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linker, pages 155-200). Numerosas estratégias podem ser usadas para covalentemente ligar moléculas entre si. Essas incluem, mas não são limitadas a ligações de polipeptídeo entre N- e C-terminais de proteínas ou domínios de proteína, ligação via ligações de dissulfeto, e ligação via reagentes reticulação químicos. Em um aspecto dessa concretização, o ligante é uma ligação de peptídeo, gerada por técnicas recombinantes ou síntese de peptídeo. O ligante pode conter resíduos de aminoácido que proveem flexibilidade. Assim, o peptídeo de ligado pode pré-cominantemente incluir os seguintes resíduos de aminoácido resíduos Gly, Ser, Ala, ou Thr. O peptídeo de ligado teria um comprimento que é adequado para ligar duas moléculas de tal modo que elas assume a conformação correta em relação a umas das outras de modo que elas retenham atividade desejada. Comprimentos adequados para essa finalidade incluem pelo menos um e não mais do que 50 resíduos de aminoácido. Em uma concretização, o ligante é de cerca de 1 a 30 aminoácidos de comprimento, com ligantes de 1 a 20 aminoácidos de comprimento sendo desejável. Ligantes úteis incluem polímeros de glicina-serina (incluindo, por exemplo, (GS) $n$ , (GSGGS) $n$  (GGGGS) $n$  e (GGGS) $n$ , onde  $n$  é um número inteiro de pelo menos um), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, e outros ligantes flexíveis, como serão apreciados por aqueles da técnica. Alternativamente, uma variedade de polímeros de não proteináceos, incluindo mas não limitados a polietileno glicol (PEG), polipropileno

glicol, polioxiálquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol, podem encontrar uso como ligantes, que podem encontrar uso para ligar os anticorpos da presente invenção a par de conjugado ou fusão, ou para ligar os anticorpos da presente invenção a um conjugado.

[000174] A presente invenção provê métodos para a produção e anticorpos experimentalmente de testagem. Os métodos descritos destinam-se a restringir a presente invenção a qualquer aplicação ou teoria de operação. Certamente, os métodos providos destinam-se a ilustrar em geral que um ou mais anticorpos podem ser experimentalmente testados para se obter anticorpos de variante. Métodos gerais para a biologia molecular de anticorpo, expressão, purificação e triagem são descritos no engenheiramento de anticorpo, editado por Duebel & Kontermann, Springer- Verlag, Heidelberg, 2001, and Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5 683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2 339-76, anticorpos. A Laboratory Manual by Harlow & Lane, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

[000175] Em uma concretização da presente invenção, ácidos nucleicos são criados que codificam os anticorpos, e que podem então ser clonados em células hospedeiras, expressos e analisados, se desejado. Assim, ácido nucleicos, e particularmente DNA, podem ser feitos codificando cada sequência de proteína. Esses métodos são realizados usando-se procedimentos bem conhecidos. Por exemplo, uma variedade de métodos que podem encontrar uso na presente invenção são descritos em Molecular Clonagem - A Laboratory Manual, 3ª Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), and Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons). Como será apreciado por aqueles versados na técnica, a geração de sequências exatas para um biblioteca compreendendo um grande número de sequências é potencialmente cara e de consumo de tempo. Por " bibli-

oteca " aqui quer se dizer que um conjunto de variantes em qualquer forma, incluindo mas não limitadas a uma lista de sequências de ácidos nucleicos ou aminoácidos, uma lista de substituições de ácido nucleico ou aminoácido em posições variáveis, um biblioteca física compreendendo ácidos nucleicos que codificam as sequências de biblioteca, ou uma biblioteca física compreendendo as proteínas de variante, ou na forma purificada ou na forma não purificada. Correspondentemente, há uma variedade de técnicas que podem ser usadas para eficazmente gerar bibliotecas da presente invenção. Tais métodos que podem encontrar uso na presente invenção são descritos ou referenciados na patente de U.S. no. 6.403.312; pedido de patente US 2002-0048772, patente de U.S. no. 7.315.786; pedido de patente US 2003-0130827, pedido de PCT WO 01/40091 ou pedido de PCT WO 02/25588. Tais métodos incluem mas não são limitados a métodos de conjunto de genes, método à base de PCR e métodos que usam variações de PCR, métodos à base de reação de cadeia de ligase, métodos de oligo combinados tais como aqueles usados em embaralhamento sintético, métodos de ampliação propenso a erro e métodos que usam ohgos com mutações aleatórias, métodos de mutagênese de sítio-dirigidos clássicos, muatagênese de pacote e outros métodos de síntese de gene e ampliação. Como é conhecida na técnica, há uma variedade de kits e métodos comercialmente disponíveis para o conjunto de gene, mutagênese, subclonagem de vetor, e semelhantes, e tais produtos comerciais encontram uso na presente invenção para a geração de ácidos nucleicos que codificam anticorpos.

[000176] Os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos por cultivo de uma célula hospedeira transformada com ácido nucleico, por exemplo, um vetor de expressão, contendo ácido nucleico que codifica os anticorpos, sob as condições apropriadas para induzir ou causar expressão da proteína. As condições apropriadas para a ex-

pressão variarão com a escolha do vetor de expressão e da célula hospedeira, e variarão facilmente determinadas por aquele versado na técnica através de experimentação rotineira. Uma ampla variedade de células hospedeiras apropriadas podem ser usadas, incluindo mas não limitadas células de mamífero, bactérias, células de inseto, e levedura. Por exemplo, uma variedade de linhas de células que podem encontrar uso na presente invenção são descritas no catálogo de linha de célula d ATCC, disponível da American Type Culture Collection.

[000177] Em uma concretização, os anticorpos são expressos em sistemas de expressão de mamífero, incluindo sistemas em que os construtos de expressão são introduzidos para dentro das células de mamífero usando-se vírus tal como retrovírus ou adenovírus. Quaisquer células de mamífero pode ser usadas, por exemplo, ser humano, camundongo, rato, hamster, primata células, etc.. Células adequadas também incluem pesquisa conhecida de células, incluindo mas não limitadas a células T de Jurkat, NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, células de NSO e suas variantes. Em uma concretização alternativa, proteínas de biblioteca são expressas em células bacterianas. Sistemas de expressão bacterianas são bem conhecidas na técnica, e incluem *Escherichia coli* (*E. coli*). *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris*, e *Streptococcus lividans*. Em concretizações alternativas, anticorpos são produzidos em células de inseto (por exemplo Sf21/Sf ) ou células de levedura (por exemplo *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc.). Em uma concretização alternativa, anticorpos são expressos in vitro usando-se sistemas de tradução livre de célula. Sistemas de tradução in vitro derivadas tanto células procarióticas (por exemplo *E. coli*) quando eucarióticas (por exemplo, germe de trigo, reticulócitos de coelho) estão disponíveis e podem ser escolhidas com base nos níveis de expressão e propriedades funcionais da proteína de interesse. Por exemplo, como apreciado por aqueles versados na

técnica, tradução *in vitro* é exigido por algumas tecnologias de exibição, por exemplo, exibição de ribossoma. Além disso, os anticorpos podem ser produzidos por métodos de síntese química. Também sistemas de expressão transgênicas tanto animal (por exemplo leite de vaca, ovelha ou cabra, ovos de galinha embrionados, larvas de inseto inteiras, etc.) quanto planta (por exemplo, milho, tabaco, lentilha d'água, etc.). Os ácidos nucleicos que codificam os anticorpos da presente invenção podem ser incorporados em um vetor de expressão a fim de expressar proteína. Uma variedade de Vetores de expressão pode ser utilizada para a expressão de proteína. Vetores de expressão podem compreender vetores extracromossomais de auto-replicação ou vetores que integram em um genoma de hospedeiro. Vetores de expressão são construídos serem compatíveis com o tipo de célula hospedeira. Assim vetores de expressão que encontram uso na presente invenção incluem mas não são limitadas àquelas que permitem expressão de proteína em células de mamífero, bactérias, células de inseto, levedura, e em sistemas *in vitro*. Como é conhecido na técnica, uma variedade de vetores de expressão estão disponíveis, comercialmente ou de outra maneira, que podem encontrar uso na presente invenção para a expressão de anticorpos.

[000178] Vetores de expressão tipicamente compreendem uma proteína operavelmente ligada com sequências reguladoras ou de controle, marcadores selecionáveis, quaisquer pares de fusão, e/ou elementos adicionais. Por "operavelmente ligado" aqui quer se dizer que o ácido nucleico é colocado em uma relação funcional com uma outra sequência de ácidos nucleicos. Em geral, esses vetores de expressão incluem ácido nucleico regulador traducional e transcrito operavelmente ligado ao ácido nucleico que codifica o anticorpo, e são tipicamente apropriados à célula hospederia usada para expressar a proteína. Em geral, as sequências reguladoras transcritivas ou traducionais

podem incluir sequências de promotor, sítios de ligação ribossomais, sequências de parada e partida traducionais, e sequências de aumetador ou ativador. Como é também conhecido na técnica, vetores de expressão tipicamente contêm um marcador ou gene de seleção para permitir a seleção de células hospedeiras transformadas contendo o vetor de expressão. Genes de seleção são bem conhecidos na técnica e variarão com a célula hospedeira usada.

[000179] Anticorpos podem ser operavelmente ligados a um par de fusão para permitir direcionamento da proteína expressa, purificação, triagem, exibição, e semelhantes. Pares de fusão podem ser ligados à sequência de anticorpos via uma sequência de ligante. A sequência de ligante em geral compreenderá um pequeno número de aminoácidos, tipicamente menos do que dez, embora ligantes mais longos possam também ser usados. Tipicamente, sequências de ligante são selecionados serem flexíveis e resistentes a degradação. Como será apreciado por aqueles versados na técnica, qualquer uma de uma ampla variedades de sequências podem ser usada como ligantes. Por exemplo, uma sequência de ligante comum à sequência de aminoácidos GGGGS. Um par de fusão pode ser uma sequência de sinal ou de direcionamento que dirige o anticorpo e quaisquer pares de fusão associados a uma localização celular desejada ou ao meio extracelular. Como é conhecido na técnica, certas sequências de sinalização podem direcionar uma proteína a ser ou secretada para dentro do meio de crescimento ou para dentro do espaço periplásmico, localizado entre a membrana externa e interna da célula. Um par de fusão pode também ser uma sequência que codifica um peptídeo ou proteína que permite purificação e/ou triagem. Tais pares de fusão incluem mas não são limitados a etiquetas de poli-histidina (etiquetas de His) (por exemplo H6 e H10 ou outras etiquetas para o uso com sistemas de cromatografia por afinidade de metal imobilizado (IMAC) (por exem-

plo,  $\text{Ni}^{2+}$  colunas por afinidade)), fusões de GST, fusões de MBP, etiqueta de Strep, a sequência alvo de biotinylation de BSP das enzimas bacterianas BirA, e etiquetas de epitopo que são direcionadas pelos anticorpos (por exemplo, etiquetas de c-myc, etiquetas de flag e semelhantes). Como será apreciado por aqueles versados na técnica, tais etiquetas podem ser úteis para a purificação, para a triagem, ou ambas. Por exemplo, um anticorpo pode ser purificado usando-se uma etiqueta de His por imobilização dela a uma coluna por afinidade  $\text{Ni}^{2+}$ , e então depois de purificação da mesma etiqueta de His pode ser usada para imobilizar o anticorpo a uma placa revestida por  $\text{Ni}^{2+}$  para realizar uma ELISA ou outro ensaio de ligação (como descrito abaixo). Um par de fusão pode permitir o uso de um método de seleção para triar anticorpos (vide abaixo). Pares de fusão que permitem uma variedade de métodos de seleção são bem conhecidos na técnica, e todos esses encontram uso na presente invenção. Por exemplo, por fusão dos membros de uma biblioteca de anticorpo para a proteína III de gene, exibição de fago podem ser empregados (Kay e outros, Exibição de fago de peptídeos e proteínas: a laboratory manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman e outros, 1991, Biochemistry 30: 10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317). Pares de fusão podem permitir anticorpos a serem marcadas. Alternativamente, um par de fusão pode ser ligar a uma sequência específica no vetor de expressão, permitindo que o par de fusão e anticorpo associado a serem ligados covalentemente ou não covalentemente ao ácido nucleico que os codifica.

[000180] Os métodos de introdução de ácido nucleico exógeno para dentro de células hospedeiras são bem conhecidos na técnica, e variarão com a célula hospedeira usada. Técnicas incluem, mas não são limitadas uma transfecção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, tratamento de cloreto de cálcio, transfecção de mediada



por polibreno, fusão de protoplasto, eletroporação, infecção de fago ou viral, encapsulação do(s) polinucleotídeo(s) nos lipossomas, e microinjeção direta do DNA para dentro de núcleos. No caso de células de mamífero, transfecção pode ser ou transitória ou estável.

[000181] Em uma concretização, anticorpos são purificados ou isolados depois da expressão. Proteínas podem ser isoladas e purificadas em uma variedade de modos conhecidos por aqueles versados na técnica. Métodos de purificação padrão incluem técnicas cromatográficas, incluindo troca de íons, interação hidrofóbica, afinidade, de classificação de tamanho e filtração de gel, e fase reversa, realizadas a pressão atmosférica ou a alta pressão usando-se sistemas tais como FPLC e HPLC. Métodos de purificação também incluem técnicas eletroforética, precipitação, imunológica, diálise e cromatofocalização. Técnicas de ultrafiltração e diafiltração, em combinação com concentração de proteína, são também úteis. Como é bem conhecida na técnica, uma variedade de proteínas naturais ligam Fc e anticorpos, e essas proteínas podem encontrar uso na presente invenção para a purificação de anticorpos. Por exemplo, as proteínas A e G bacterianas se ligam à região de Fc. Do mesmo modo, a proteína L bacteriana se liga à região de Fab de alguns anticorpos, com naturalmente faz o antígeno alvo do anticorpo. Purificação pode frequentemente ser permitida por um par de fusão particular. Por exemplo, anticorpos podem ser purificados usando-se resina de glutationa se uma fusão de GST for empregada, cromatografia por afinidade de  $\text{Ni}^{+}$  se uma etiqueta de Hi for empregada, ou imobilizada por anticorpo de anti-flag se uma etiqueta flag for usada. Para general orientação em técnicas de purificação adequadas, vide, por exemplo Protein Purification: Principles and Practice, 3ª Ed., Scopes, Springer- Verlag, NY, 1994. O grau de purificação necessária variará dependendo da triagem ou do uso dos anticorpos. Em alguns casos na purificação é necessária. Por exemplo em uma

concretização, se os anticorpos forem secretados, triagem pode ocorrer diretamente do meio. Como é bem conhecida na técnica, alguns métodos de seleção não envolvem purificação de proteínas. Assim, por exemplo, se um biblioteca de anticorpos for feita na biblioteca de exibição de fago, purificação de proteína não pode ser realizada.

[000182] Anticorpos podem ser triados usando-se uma variedade de métodos, incluindo, mas não limitados àqueles que usam ensaios in vitro, ensaios à base de célula e in vivo, e tecnologias de seleção. Tecnologias de triagem de alta capacidade e automatização podem ser utilizadas nos procedimentos de triagem. Triagem pode empregar o uso de um par de fusão ou rótulo. O uso de pares de fusão foi discutido acima. Por "marcado" aqui quer se dizer que os anticorpos da invenção têm um ou mais elementos, isótopos, ou compostos químicos ligado a permitir a detecção em uma triagem. Em geral, rótulos caem dentro de três classes: a) rótulos imunes, que podem ser um epitopo incorporado como um par de fusão que é reconhecido por um anticorpo, b) rótulos isotópicos, que podem ser isótopos pesados ou radioativos, e c) molécula pequena rótulos, que podem incluir corantes fluorescentes e colorimétricos, ou moléculas tal como biotina que permitem outros métodos de marcação. Rótulos podem ser incorporados em o composto em qualquer posição e podem ser incorporados in vitro ou in vivo durante a expressão de proteína.

[000183] Em uma concretização, as propriedades funcional e/ou biofísica de anticorpos são triadas em um ensaio in vitro. Ensaio in vitro podem permitir uma ampla faixa dinâmica para as propriedades de triagem de interesse. Propriedades de anticorpos que podem ser triados incluem mas não são limitadas a estabilidade, solubilidade, e afinidade para ligantes de Fc, por exemplo FcRs. Múltiplas propriedades podem ser triados simultaneamente ou individualmente. Proteínas podem ser purificadas e não purificadas, dependendo das exigências do ensaio.

Em uma concretização, a triagem é um ensaio de ligação qualitativa ou quantitativa para a ligação de anticorpos a uma molécula de proteína ou não proteína que é conhecida ou pensada de se ligar ao anticorpo. Em uma concretização, a triagem é um ensaio de ligação para a medição que se liga ao antígeno alvo. Em uma concretização alternativa, a triagem é um ensaio para a ligação de anticorpos a um ligante de Fc, incluindo, mas não limitados à família de FcRs, o receptor neonatal FcRn, a proteína de complemento Clq, e as proteínas A e G bacterianas. Os ligantes de Fc podem ser de qualquer organismo, por exemplo, seres humanos, camundongos, ratos, coelhos, macacos, etc.. Ensaio de ligação podem ser realizados usando-se uma variedade de métodos conhecidos na técnica, incluindo, mas não limitados a FRET (Transferência de energia de ressonância de fluorescência) e ensaios à base de BRET (Transferência de energia de ressonância de bioluminescência, AlfaScreen<sup>(R)</sup> (Ensaio homogêneos de proximidade luminescentes ampliados), ensaio de proximidade de cintilação, ELISA (Ensaio imunossorventes ligados a enzima), SPR (Ressonância de plasmônio de superfície, também conhecida como Biacore<sup>(R)</sup>), calorimetria de titulação isotérmica, calorimetria de varredura diferencial, eletroforese de gel e cromatografia incluindo filtração de gel. Esses e outros métodos podem levar vantagem de algum par de fusão ou rótulo do anticorpo. Ensaio podem empregar uma variedade de métodos de detecção incluindo mas não limitados a rótulos cromogênicos, fluorescentes, luminescentes ou isotópicos.

[000184] As propriedades biofísicas de anticorpos, por exemplo estabilidade e solubilidade, podem ser triadas usando-se uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estabilidade de proteína pode ser determinada por medição do equilíbrio termodinâmico entre os estados dobrados e não dobrados. Por exemplo, anticorpos da presente invenção podem ser dobrados usando-se desnaturação química, calor, ou

pH, e essa transição pode ser monitorada usando-se métodos incluindo, mas não limitados a, espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia fluorescência, espectroscopia de absorbância, espectroscopia de RMN, calorimetria, e proteólise. Como será apreciado por aqueles versados na técnica, os parâmetros cinéticos das transições dobradas e não dobradas podem também ser monitoradas usando-se essas e outras técnica. A solubilidade e integridade estrutura total de um anticorpo podem ser quantitativamente ou qualitativamente determinadas usando-se uma ampla faixa de métodos que são conhecidos na técnica. Métodos que podem encontrar uso na presente invenção para a caracterização das propriedades biofísicas de anticorpos incluem eletroforese de gel, focalização isoeletrica, eletroforese de capilar, cromatografia tais como cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia de troca de íons, e cromatografia de líquida de alto desempenho de fase reversa, mapeamento de peptídeo, mapeamento de oligossacarídeo, espectrometria de massa, espectroscopia de absorbância de ultravioleta, espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de dicroísmo circular, calorimetria de titulação isotérmica, calorimetria de varredura diferencial, ultracentrifugação analítica, dispersão de luz dinâmica, proteólise e reticulação, medição de turbidez, ensaio de retardação de filtração, ensaios imunológicos, ensaios de ligação de corante fluorescente, ensaios de manchamento de proteína, microscopia, e deleção de agregados via ELISA ou outro ensaio de ligação. Análise estrutural que emprega técnicas cristalográficas de raios X e espectroscopia de RMN podem também encontrar uso. Em uma concretização, estabilidade e/ou solubilidade podem ser medidas por determinação da quantidade de solução de proteína depois de algum período de tempo. Nesse ensaio, a proteína pode ou não pode ser exposta a alguma condição extrema, por exemplo, temperatura elevada, baixo pH, ou a presença de desnaturante. Uma vez que função tipicamente exi-

ge uma proteína estável, solúvel e/ou bem dobrada/estruturada, os ensaios de ligação e funcionais como mencionados acima também proveem meios para realizar tal medição. Por exemplo, uma solução compreendendo um anticorpo poderia ser analisado quanto a sua capacidade de ligar antígeno alvo, então exposto a temperatura elevada por um ou mais períodos de tempo definidos, então foram analisados quanto a ligação de antígeno novamente. Uma vez que proteína não dobradas ou agregadas não é esperada ser capaz de ligar antígeno, a quantidade de atividade restante provê uma medição da estabilidade e solubilidade de anticorpo.

[000185] As propriedades biológicas dos anticorpos da presente invenção podem ser caracterizadas nas experiências de célula, tecido e organismo inteiro. Como é conhecida na técnica, fármacos são frequentemente testados em animais, incluindo mas não limitados a camundongos, ratos, coelhos, cachorro, gatos, porcos, e macacos, a fim de medir uma eficácia de fármaco para o tratamento contra uma doença ou modelo de doença, ou para medir farmacocinética do fármaco, toxicidade, e outras propriedades. Os animais podem ser chamados de modelo de doença. Com relação aos anticorpos da presente invenção, um desafio particular aparece quando do uso de modelos de animal para avaliar o potencial para na eficácia de ser humano de polipeptídeos candidatos – isso é devido, pelo menos em parte, ao fato de que anticorpos que têm um efeito específico sobre a afinidade para um receptor de Fc de ser humano não pode deter uma efeito de afinidade similar com o receptor de animal ortólogo. Esses problemas podem ser ulteriormente exacerbados pelas ambiguidades inevitáveis associadas a designação correta de ortólogos verdadeiros (Mechetina e outros, Immunogenetics, 2002 54:463-468), e o fato de que alguns ortólogos simplesmente não exibem no animal (por exemplo, seres humanos possuem uma FcR1a enquanto que camundongos não). Terapêuticas

são frequentemente testadas em camundongos, incluindo mas não limitados a camundongos nus, camundongos de SCID, camundongos de xenoenxerto, e camundongos transgênicos (incluindo knockins e inativações). Por exemplo, um anticorpo da presente invenção que é destinado como uma terapêutica de anticâncer pode ser testada em um modelo de câncer de camundongo. Nesse método, um tumor ou linha de célula de tumor é enxertado sobre ou injetado para dentro de um camundongo, e subsequentemente o camundongo é tratado com a terapêutica para determinar a capacidade do anticorpo de reduzir ou inibir metástase e crescimento de câncer. Uma abordagem alternativa é o uso de modelo de camundongo de SCID em que camundongos com deficiência imune são injetados com linfócitos periféricos de sangue (PBLs) de ser humano, conferindo um sistema semi-funcional e um sistema imune de ser humano – com um ensaio apropriado da FcRs de ser humano - aos camundongos que subsequentemente foram injetados com anticorpos ou polipeptídeos de Fc que direcionam células de tumor de ser humano injetadas. Em tal modelo, os polipeptídeos de Fc que direcionam o antígeno desejado interagem com PBLs de ser humano dentro dos camundongos para ligar funções de efector tumorocidas. Tal experimentação pode prover dados significativos para a determinação do potencial do anticorpo a ser usado como uma terapêutica. Qualquer organismo, por exemplo, mamíferos, pode ser usado para testagem. Por exemplo, por causa de sua similaridade genética a humanos, macacos podem ser adequados de modelos terapêuticos, e assim podem ser usados para testar a eficácia, toxicidade, farmacocinética, ou outras propriedades dos anticorpos da presente invenção. Testes dos anticorpos da presente invenção em humanos são rotineiramente exigidos para aprovação como fármacos, e assim naturalmente essas experiências são contempladas. Assim os anticorpos da presente invenção podem ser testados em humanos para determi-

nar sua eficácia terapêutica, toxicidade, farmacocinética, e/ou outras propriedades clínicas.

[000186] Estudos de toxicidade são realizados para determinar o antígeno ou efeitos relacionados com fusão de Fc que não podem ser avaliados no perfil de farmacologia padrão ou ocorrem apenas depois da administração repetida do agente. Testes de mais toxicidade são realizados em duas espécies – um roedor e um não roedor - para assegurar que quaisquer efeitos adversos inesperados não são despercebidos antes que novas entidades terapêuticas sejam introduzidas para dentro de homem. Em geral, aqueles modelos podem medir uma variedade de toxicidades incluindo genotoxicidade, toxicidade crônica, imunogenicidade, toxicidade reprodutiva/desenvolvendo, e carcinogenicidade. Incluídos dentro dos parâmetros acima mencionados são medição padrão de consumo de alimento, peso de corpo, formação de anticorpo, química clínica, e exame macro- e microscópico de órgãos/tecidos padrão (por exemplo, cardiotoxicidade). Parâmetros adicionais da medição são trauma de sítio de injeção e a medição de anticorpos de neutralização, se for o caso. Tradicionalmente, terapêuticas monoclonais de anticorpo, nus ou conjugadas são avaliadas quanto a reatividade cruzada com tecidos normais, imunogenicidade/produção de anticorpo, ligante toxicidade de ligante ou conjugado e toxicidade do "espectador" de espécie radiomarcada. No entanto, tais estudos podem ter de ser individualizados para levar em conta as preocupações específicas e o seguinte conjunto de orientação por ICH S6 (estudos de segurança para produtos biotecnológicos também observados acima). Como tal, os princípios gerais são que os produtos são suficientemente bem caracterizados e para os quais impurezas/contaminantes foram removidos, que o material de teste seja comparável através de todo desenvolvimento, e tendência a GLP.

[000187] A farmacocinética (PK) dos anticorpos da invenção pode



ser estudada em uma variedade de sistemas de animal, como os mais relevantes sendo primatas de não ser humano tais como os macacos cynomolgous e rhesus. Administrações únicas ou repetidas i.v./s.c. sobre uma faixa de dose de 6000-vezes (0,05-300 mg/kg) podem ser avaliadas quanto a semivida (dias a semanas) usando-se concentração e depuração de plasma bem como volume de distribuição em um estado constante e nível de absorbância sistêmica podem ser medidos. Exemplos de tais parâmetros de medição em geral incluem máxima concentração no plasma observada ( $C_{max}$ ), o tempo para alcançar  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ), a área sob curva de concentração de plasma-tempo de tempo 0 a infinito [AUC<sub>0-inf</sub>] e semivida de eliminação evidente ( $T_{in}$ ). Parâmetros medidos adicionados poderiam incluir análise compartimental de dados de concentração -tempo obtidos seguindo administração i.v. e biodisponibilidade. Exemplos de estudos farmacológicos/toxicológicos usando-se cynomolgus foram estabelecidos para Rituxan<sup>(R)</sup> e Zevalm<sup>(R)</sup> em que anticorpos monoclonais para CD20 são reativos cruzadamente. Estudos de biodistribuição, dosimetria (para anticorpos radiomarcados), e PK podem também ser feitos em modelos de roedor. Tais estudos avaliariam tolerância em todas as doses administradas, toxicidade a tecidos locais, localização a modelos de animal de xenoenxerto de roedor, depleção de células alvo. Os anticorpos da presente invenção podem conferir superior farmacocinética em sistemas de animal ou em humanos. Por exemplo, ligação aumentada a FcRn pode aumentar a semivida e exposição do anticorpo terapêutico. Alternativamente, ligação diminuída a FcRn pode diminuir a semivida e exposição a fármaco contendo Fc em casos onde exposição reduzida é favorável tal como quando tal fármaco tem efeitos colaterais. É conhecido na técnica que o conjunto de receptores de Fc é diferencialmente expressos em vários tipos de células imunes, bem como em diferentes tecidos. Distribuição de tecido diferencial de re-

ceptores de Fc pode finalmente ter um impacto nas propriedades farmacodinâmica (PD) e farmacocinética (PK) de anticorpos da presente invenção. Uma vez que anticorpos da apresentação terem afinidades variáveis para o conjunto de receptores de Fc, outra triagem dos polipeptídeos para propriedades de PD e/ou de PK podem ser extremamente úteis para a definição do ótimo equilíbrio de PD, PK, e eficácia terapêutica conferida por cada polipeptídeo candidato.

[000188] Estudos farmacodinâmicos podem incluir, mas não são limitados a, direcionamento de células de tumor específicas ou bloqueamento de mecanismos de sinalização, medição de depleção de antígeno alvo que expressa células ou sinais, etc.. Tais efeitos farmacodinâmicos podem ser demonstrados em modelos de animal ou humanos.

[000189] Os anticorpos da presente invenção podem ser usados para as finalidades terapêuticas. Como será apreciado por aqueles da técnica, os anticorpos da presente invenção podem ser usados para qualquer finalidade terapêutica que usa anticorpos e semelhantes. Em uma concretização, os anticorpos são administrados a um paciente para tratar desordens incluindo, mas não limitadas a câncer.

[000190] Um "paciente" para as finalidades da presente invenção inclui tanto seres humanos e outros animais, por exemplo, mamíferos, por exemplo, seres humanos. Assim os anticorpos da presente invenção têm tanto terapia de ser humano quanto aplicações veterinárias. O termo "tratamento" ou "tratar" na presente invenção destina-se a incluir tratamento terapêutico, bem como medições supressivas ou profiláticas para uma doença ou um distúrbio. Assim, por exemplo, administração com sucesso de um anticorpo antes do início dos resultados da doença no tratamento da doença. Como um outro exemplo, administração com sucesso de um anticorpo otimizado depois da manifestação clínica da doença para combater os sintomas da doença compre-

ende tratamento da doença. "Tratamento" e "tratar" também inclui administração de um anticorpo otimizado depois da aparência da doença a fim de erradicar a doença. Administração com sucesso de um agente depois do início e depois dos sintomas clínicos se desenvolverem, com possível abatimento de sintomas clínicos e talvez melhoramento da doença, compreende tratamento da doença. Aqueles "que necessitam de tratamento" incluem mamíferos já tendo a doença ou o distúrbio, bem como aqueles propensos a doença ou distúrbio, incluindo aqueles em que a doença ou distúrbio deve ser evitada.

[000191] Em uma concretização, um anticorpo da presente invenção é administrado a um paciente tendo uma doença que envolve expressão inapropriada de uma proteína ou outra molécula, tal como FLT3. Dentro do escopo da presente invenção isso destina-se a incluir doenças e desordens caracterizadas por proteínas anômalas, devido, por exemplo, a alterações na quantidade de uma proteína presente, localização de proteína, modificação pós-traducionais, estado conformacional, a presença de uma proteína mutante, etc.. Uma ultra-abundância pode ser devido a qualquer causa, incluindo, mas não limitada a ultra-expressão no nível molecular, aparência prolongada ou acumulada no sítio de ação, ou atividade aumentada de uma proteína em relação a normal. Incluído dentro dessa definição são doenças e desordens caracterizadas por uma redução de uma proteína. Essa redução pode ser devido a qualquer causa, incluindo, mas não limitada a expressão reduzida no nível molecular, aparência reduzida ou diminuída no sítio de ação, formas mutantes de uma proteína, ou atividade diminuída de uma proteína em relação a normal. Tal ultra-abundância ou redução de uma proteína pode ser medida em relação à expressão normal, aparência ou atividade de uma proteína, e a medição pode desempenhar um papel importante na testagem do desenvolvimento e/ou clínica dos anticorpos da presente invenção.

[000192] Por "câncer" e "canceroso" aqui referem-se a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento de célula desregulado. Exemplos de câncer incluem mas não são limitados a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluindo lipossarcoma), tumores neuroendócrinos, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma, e leucemia ou malignidades linfoides.

[000193] Exemplos mais particulares de tais cânceres incluem malignidades hematológicas, tais como linfomas de não Hodgkin (NHL), B leucemia linfoblástica aguda de célula B/linfoma (B-ALL), e leucemia linfoblástica aguda de célula T/linfoma (T-ALL), timoma, histiocitose de célula de Langerhans, mieloma múltiplo (MM), neoplasias mieloide tais como leucemias mielógenas agudas (AML), incluindo AML com maturação, AML sem diferenciação, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, e leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplasias, e desordens mieloproliferativas crônicas (MDS), incluindo leucemia mielógenas crônicas (CML).

[000194] Se o câncer ou tumor for um linfoma ou leucemia, a doença pode estar no estágio de doença residual mínima (MRD). Esse estágio pode, por exemplo, ser lido depois da quimioterapia convencional com ou sem transplante de célula tronco. Nesse contexto, "MRD" refere-se a um estado de doença onde pequenos números de células de linfoma/leucêmicas permanecem no paciente durante o tratamento ou depois do tratamento quando o paciente está em remissão, incluindo remissão completa (nenhum sintoma ou sinal da doença). Essa é a principal causa de recaída em câncer e leucemia. Nesse estágio, embora o paciente possa estar em remissão completa, a doença é ainda detectável pelo estado das técnicas anteriores tais como reação de cadeia de polimerase (PCR) e citometria de fluxo (FACS).

[000195] O alvo dos anticorpos da presente invenção pode ser poli-

mórfico na população de ser humano. Para um dado paciente ou população de pacientes, a eficácia dos anticorpos da presente invenção podem assim ser afetados pela presença ou ausência de polimorfismos específicos nas proteínas. Por exemplo, FcRIIIA é polimórfico na posição 158, que é comumente ou V (alta afinidade) ou F (baixa afinidade). Pacientes com o genótipo homozigoto de V/V são observados terem uma melhor resposta clínica a tratamento com o anticorpo de anti-CD20 Rituxan<sup>(R)</sup> (rituximab), provavelmente porque esses pacientes montam uma resposta N mais forte (Dall'Ozzo e outros (2004) Cancer Res. 64-4664-9). Polimorfismos adicionais incluem mas não são limitados a FcRIIA R131 ou H131, e tais polimorfismos são conhecidos ou como aumentando ou diminuindo ligação de Fc e atividade biológica subsequente, dependendo do polimorfismo. Anticorpos da presente invenção podem ser ligar a uma forma polimórfica particular de um receptor, por exemplo, FcyRIIIA 158 V, ou para se ligar com afinidade equivalente para todos os polimorfismos a uma posição particular no receptor, por exemplo tanto os polimorfismos de 158V quanto 158F de FcRIIIA. Em uma concretização, anticorpos da presente invenção podem ter equivalentes que se ligam a polimorfismos que podem ser usados em um anticorpo para eliminar a eficácia diferencial vista em pacientes como diferentes polimorfismos. Tal propriedade pode dar maior consistência na resposta terapêutica e reduzem populações de pacientes que não respondem. Tal variante Fc com ligação idêntica a polimorfismos de receptor pode ter atividade biológica aumentada, tal como ADCC, CDC ou semivida circulante, ou atividade alternativamente diminuída, via modulação da ligação dos receptores de Fc relevantes. Em uma concretização, anticorpos da presente invenção podem ligar com afinidade mais alta ou mais baixa para um dos polimorfismos de um receptor, ou acentuação da diferença existente na ligação ou reverso na diferença. Tal propriedade pode permitir

criação das terapêuticas particularmente talhadas para eficácia com uma população de paciente possuindo tal polimorfismo. Por exemplo, uma população de paciente possuindo um polimorfismo com uma afinidade mais alta para um receptor inibitório tal como FcRIIb poderia receber um fármaco contendo um anticorpo com ligação reduzida de tal forma polimórfica do receptor, criando um fármaco mais eficaz.

[000196] Em uma concretização, pacientes são triados quanto a um ou mais polimorfismos a fim de prever a eficácia dos anticorpos da presente invenção. Essa informação pode ser usada, por exemplo, para selecionar pacientes para incluir ou excluir das experiências clínicas ou, pós-aprovação, para prover orientação a médicos e pacientes em relação a dosagens apropriadas e opções de tratamento. Em uma concretização, pacientes são selecionados para inclusão em experiências clínicas para um anticorpo da presente invenção se seu genótipo indicar que elas são prováveis de responder significativamente melhor a um anticorpo da presente invenção quando comparado com uma ou mais terapêuticas de anticorpo atualmente usadas. Em uma outra concretização, dosagens apropriadas e regimes de tratamento são determinados usando-se tal informação genótipo. Em uma outra concretização, pacientes são selecionados para inclusão em uma experiência clínica ou para receita de pós-aprovação de terapia com base no seu genótipo de polimorfismo, onde tal terapia contém um anticorpo engenhariado ser especificamente eficaz para tal população, ou alternativamente onde tal terapia contém um anticorpo que não mostra atividade diferencial às diferentes formas do polimorfismo.

[000197] Incluídos na presente invenção são testes de diagnóstico para identificar pacientes que são prováveis de mostrar uma resposta clínica favorável a um anticorpo da presente invenção, ou que são prováveis de exibir uma resposta significativamente melhor quando tratada com um anticorpo da presente invenção versus um ou mais

terapêuticas de anticorpo atualmente usadas. Qualquer um de numerosos métodos para a determinação de polimorfismos de FcR em seres humanos conhecidos na técnica podem ser usados.

[000198] Além do mais, a presente invenção compreende testes de prognósticos realizados em amostras clínicas tais como amostras de tecido e sangue. Tais testes podem avaliar quanto a atividade de função efetora, incluindo, mas não limitados a ADCC, CDC, fagocitose, e opsonização, ou para matar, independentemente de mecanismo, de células cancerosas ou de outra maneira patogênicas. Em uma concretização, ensaios de ADCC, tais como aqueles descritos anteriormente, são usados para prever, para um paciente específico, a eficácia de um dado anticorpo da presente invenção. Tal informação pode ser usada para identificar pacientes para inclusão ou exclusão nas experiências clínicas, ou para informar decisões no que diz respeito a dosagens apropriadas e regimes de tratamento. Tal informação pode também ser usado para selecionar um fármaco que contém um anticorpo particular que mostra atividade superior em tal ensaio.

[000199] Composições farmacêuticas são contempladas em que um anticorpo da presente invenção e um ou mais agentes terapêuticamente ativos são formulados. Formulações dos anticorpos da presente invenção são preparadas para armazenagem por misturação do anticorpo tendo o grau desejado da pureza com opcionais veículos, excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizadores aceitáveis são não tóxicos a receptores nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões tais como fosfato, citrato, acetato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; preservativos (tais como cloreto de octadecil-dimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio,



cloreto de benzetônio; fenol, álcool butil orbenzílico; alquil parabenos tal como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; cicloexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinil-pirrolidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes de quelação tal como EDTA; açúcares tal como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; adoçantes e outros agentes de flavorizantes; materiais de enchimento tais como celulose microcristalina, lactose, milho e outros amidos; agentes de ligação; aditivos; agentes de coloração; contra-íons de formação de sal tal como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de proteína de Zn); e/ou tensoativos não iônicos tal como TWEEN<sup>(R)</sup>, PLURONICS<sup>(R)</sup> ou polietileno glicol (PEG). Em uma concretização, a composição farmacêutica que compreendo anti-corpo da presente invenção pode ser em uma forma solúvel em água, tal como estando presentes como sais farmaceuticamente aceitáveis, que destina-se a incluem tanto sais de adição de ácido quanto de base. "Sal de adição de ácido farmaceuticamente aceitável "refere-se àqueles sais que retêm a eficácia biológica das bases livres e não são biologicamente ou de outra maneira indesejáveis, formadas com ácidos inorgânicos tais como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e semelhantes, e ácidos orgânicos tais como ácido acético, ácido propiônico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malônico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido p-toluenossulfônico, ácido salicílico e semelhantes. "Sais de adição de base farmaceuticamente aceitáveis "incluem aqueles derivados

de bases inorgânicas tais como sais de sódio, potássio, lítio, amônio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre, manganês, alumínio e semelhantes. Particularmente úteis são os sais de amônio, potássio, sódio, cálcio, e magnésio. Sais derivados de bases não tóxicas orgânicas farmacologicamente aceitáveis incluem sais de amina primária, secundária e terciária, amina substituídas incluindo amina substituídas de ocorrência natural, amina cíclicas e resinas de troca de íons básicas, tais como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, e etanolamina. As formulações a serem usadas para administração in vivo seria estéril. Esse é prontamente realizado por filtração através de membranas de filtração estéril ou outros métodos.

[000200] Os anticorpos revelados aqui podem também ser formulados como imunolipossomas. Um lipossoma é uma pequena vesícula compreendendo vários tipos de lipídios, fosfolipídios e/ou tensoativo que é útil para o fornecimento de um agente terapêutico a um mamífero. Lipossomas contendo o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein e outros, 1985, Proc Natl Acad Sci USA, 82:3688; Hwang e outros, 1980, Proc Natl Acad Sci USA, 77:4030; a patente de U.S. no. 4.485.045; a patente de U.S. no. 4.544.545; e pedido de PCT WO 97/38731. Lipossomas com tempo de circulação aumentado são revelada na patente de U.S. no. 5.013.556. Os componentes do lipossoma são comumente dispostos em uma formação de bicamadas, similar à disposição de lipídio de membranas biológicas. Particularmente lipossomas úteis podem ser geradas por método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídio compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada por PEG (PEG-PE). Lipossomas são extrudadas através de filtros de tamanho de poro definido para fornecer lipossomas com o diâmetro desejado. Um agente quimioterapêutico ou outro agente terapeuticamente ativo está opcionalmente dentro do lipos-

soma (Gabizon e outros, 1989, J National Cancer Inst 81:1484).

[000201] O anticorpo e outros agentes terapeuticamente ativos podem também ser aprisionados em microcápsulas preparadas por métodos incluindo, mas não limitados a técnicas de coacervação, polimerização interfacial (por exemplo usando-se hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina, ou microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), sistemas de fornecimento de fármaco coloidal (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas), e macroemulsões. Tais técnicas são revelados em Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980. Preparações de liberação sustentada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semi-permeáveis de polímero hidrofóbico sólido, matrizes que estão na forma de artigos modelados, por exemplo, películas, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2- hidroxietil-metacrilato), ou poli(álcool vinílico)), polilactídeos (a patente de U.S. no. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L- glutamato, etileno-vinil acetato não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tal como o Lupron Depot<sup>(R)</sup> (que são microesferas injetáveis constituídas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolídeo), ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico, e ProLease<sup>(R)</sup> (comercialmente disponível da Alkermes), que é um sistema de fornecimento com base em microesfera constituído da molécula bioativa desejada incorporada em uma matriz de poli-DL-lactídeo-coglicolídeo (PLG).

[000202] Administração da composição farmacêutica compreendendo um anticorpo da presente invenção, por exemplo, na forma de solução aquosa estéril, pode ser feita em uma variedade de modos, incluindo, mas não limitados a oralmente, subcutaneamente, intravenosa-

mente, intranasalmente, intraoticamente, transdermicamente, topicamente (por exemplo, géis, pomadas, loções, cremes, etc.), intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonar, vaginalmente, parenteralmente, retalmente, ou intraocularmente. Como é conhecida na técnica, a composição farmacêutica pode ser formulada correspondentemente dependendo do modo de introdução.

[000203] Como é conhecido na técnica, terapêuticas de proteína são frequentemente fornecidas por infusão ou bolus IV. Os anticorpos da presente invenção podem também ser fornecidos usando-se tais métodos. Por exemplo, administração pode ser por infusão intravenosa com 0,9% de cloreto de sódio como um veículo de infusão.

[000204] Além disso, qualquer um de numerosos sistemas de fornecimento é conhecido na técnica e podem ser usados para administrar os anticorpos da presente invenção. Exemplos incluem, mas não são limitados a, encapsulação em lipossomas, micropartículas, microesferas (por exemplo, microesferas de PLA/PGA), e semelhantes. Alternativamente, um implante de um material gelatinoso, poroso ou não poroso, incluindo membranas ou fibras, podem ser usadas. Sistema de liberação sustentada podem compreender uma matriz ou material polimérico tais como poliésteres, hidrogéis, poli(álcool vinílico), polilactídeos, copolímeros de ácido L-glutâmico e etil-L-glutamato, etileno-vinil acetato, copolímeros ácido láctico – ácido glicólico tais como Lupron Depot<sup>(R)</sup>, e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. É também possível administrar um ácido nucleico que codifica o anticorpo da presente invenção, por exemplo, por infecção retroviral, injeção direta ou revestimento com lipídios, receptores de superfície de célula ou outros agentes de transfecção. Em todos os casos, sistemas de liberação controlada podem ser usados para liberar o anticorpo a ou próximo à localização desejada de ação.

[000205] As quantidades e frequências de administração dosada de

administração são, em uma concretização, selecionadas serem terapeuticamente ou profilaticamente eficaz. Como é conhecida na técnica, ajustes de degradação de proteína, fornecimento sistêmico versus localizado, e taxa de nova síntese de protease, bem como a idade, peso de corpo, saúde geral, sexo, dieta, tempo de administração, interação de fármaco e da severidade da condição pode ser necessária, e será determinável com a experimentação rotineira por aqueles versados na técnica.

[000206] A concentração do anticorpo terapeuticamente ativo na formulação pode variar de cerca de 0,1 a 100% em peso. Em uma concretização, a concentração do anticorpo está na faixa de 0,003  $\mu$ M a 1,0 molar. A fim de tratar um paciente, uma dose terapeuticamente eficaz do anticorpo da presente invenção pode ser administrado. Por "dose terapeuticamente eficaz" aqui quer se dizer que a dose que produz os efeitos para os quais ele é administrado. A dose exata dependerá da finalidade do tratamento, e será determinável por aquele versado na técnica usando-se técnicas conhecidas. Dosagens podem variar de 0,0001 a 100 mg/kg de peso de corpo ou mais, por exemplo de 0,1, 1, 10, ou 50 mg/kg de peso de corpo, por exemplo, de 1 a 10 mg/kg de peso de corpo.

[000207] Em algumas concretizações, apenas uma única dose do anticorpo é usado. Em outras concretizações, múltiplas doses do anticorpo são administradas. O tempo transcorrido entre administrações podem ser menos do que 1 hora, cerca de 1 hora, cerca de 1-2 horas, cerca de 2-3 horas, cerca de 3-4 horas, cerca de 6 horas, cerca de 12 horas, cerca de 24 horas, cerca de 48 horas, cerca de 2-4 dias, cerca de 4-6 dias, cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, ou mais do que 2 semanas.

[000208] Em outras concretizações os anticorpos da presente invenção são administrados em regimes de administração dosada me-

tronômicos, ou por infusão contínua ou administração frequente sem períodos de repouso prolongados. Tal administração metronômica pode envolver administração dosada em intervalos constantes sem períodos de repouso. Tipicamente tais regimes incluem infusão contínua ou baixa dose crônica por um período de tempo prolongado, por exemplo, 1-2 dias, 1-2 semanas, 1-2 meses, ou até 6 meses ou mais. O uso de doses mais baixas podem minimizar os efeitos colaterais e a necessidade de períodos de repouso.

[000209] Em certas concretizações o anticorpo da presente invenção e um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos são ciclicamente administrados ao paciente. Terapia de ciclização envolve a administração de um primeiro agente em uma vez, um segundo agente em uma segunda vez, opcionalmente agentes adicionais em vezes adicionais, opcionalmente um período de repouso, e então repetição dessa sequência de administração de um ou mais vezes. O número de ciclos é tipicamente de 2 - 10. Terapia de ciclização pode reduzir o desenvolvimento de resistência a um ou mais agentes, pode minimizar os efeitos colaterais, ou pode aperfeiçoar a eficácia do tratamento.

[000210] Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados concomitantemente com um ou mais outros regimes ou agentes terapêuticos. Os agentes ou regimes terapêuticos adicionais podem ser usados para aperfeiçoar a eficácia ou segurança do anticorpo. Também, os agentes ou regimes terapêuticos adicionais podem ser usados para tratar a mesma doença ou uma comorbidade certamente do que para alterar a ativação do anticorpo. Por exemplo, um anticorpo da presente invenção pode ser administrado ao paciente juntamente com quimioterapia, terapia de radiação ou tanto quimioterapia quanto radiação. O anticorpo da presente invenção pode ser administrado em combinação com um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos, incluindo, mas não limitados a agentes citotóxicos, agente quimio-

terapêuticos, citocinas, agentes inibitórios de crescimento, agentes anti-hormonais, inibidores de quinase, agentes anti-angiogênicos, cardioprotetores, agentes imunoestimuladores, agentes imunossupressivos, agentes que promovem proliferação de células hematológicas, inibidores de angiogênese, inibidores de tirosina quinase de proteína (PTK), anticorpos adicionais, FcRIIb ou outros inibidores de receptor de Fc, ou outros agentes terapêuticos.

[000211] Os termos "em combinação com" e "coadministração" não são limitados à administração dos agentes profiláticos ou terapêuticos exatamente ao mesmo tempo. Ao invés disso, quer se dizer que o anticorpo da presente invenção e o outros agente ou agentes são administrados em uma sequência e dentro de um intervalo de tempo tal que eles podem agir juntos para prover um benefício que é aumentado versus tratamento com apenas ou o anticorpo da presente invenção ou o outro agente ou agentes. Em uma concretização, que o anticorpo e o outro agente ou agentes agem aditivamente, por exemplo, eles agem sinergicamente. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade pretendida. O médico clínico versado pode determinar empiricamente, ou por consideração da farmacocinética e modos de ação dos agentes, da dose ou doses apropriadas de cada agente terapêutico, bem como os timings apropriados e métodos de administração.

[000212] Em uma concretização, os anticorpos da presente invenção são administrados com um ou mais moléculas adicionais compreendendo anticorpos ou Fc. Os anticorpos da presente invenção podem ser coadministrados com um ou mais outros anticorpos que têm eficácia no tratamento da mesma doença ou uma comorbidade adicional, por exemplo, dois anticorpos podem ser administrados que reconhecem dois antígenos que são sobrepostos em um dado tipo de câncer.

[000213] Em uma concretização, os anticorpos da presente invenção



são administrados com um agente quimioterapêutico. Por "agente quimioterapêutico" como usado aqui quer se dizer que um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem, mas não são limitadas a agentes de alquilação tais como tiotepa e ciclosfosfamida; alquil sulfonatos tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano, andrógenos tais como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona, anti-adrenais tais como aminoglutetimida, mitotano, triloestano, anti-andrógenos tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolídeo, e goserelina; antibióticos tais como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azasena, bleomicinas, cactinomicina, caliceamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilm, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, etreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-estrógenos incluindo, por exemplo, tamoxifeno, raloxifeno, inibição de aromatase de 4(5)-imidazóis, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY 117018, onapristona, e toremifeno (Fareston); anti-metabólitos tais como metotrexato e 5-fluorouracila (5-FU); análogos de ácido fólico tais como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; emileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, thetilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; mostardas de nitrogênio tais como clorambucila, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloreamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosureias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina,

lomustina, nimustina, ranimustina; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vincélula precursora imaturaina; platinum; proteínas tais como desiminase de arginina e asparaginase; análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; taxanos, por exemplo paclitaxel (TAXOL(R), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) e docetaxel (TAXOTERE<sup>(R)</sup>, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, França); inibidor de topoisomerase RFS 2000; inibidor de sintase de timidilato (tal como Tomudex); quimioterapêuticas adicionais incluindo aceglatona; aldofosfamida glicosídeo; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucila; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; difluorometilornitina (DMFO); elformitina; acetato de eliptínio; etoglucid; nitrato de gálio; hidroxiiureia; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofinílico; 2- etilidrazida; procarbazina; PSK<sup>(R)</sup>; razoxano; sizofurano; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2, 2'2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosídeo ("Ara- C"); ciclofosfamida; tiotepa; clorambucila; gencitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; etoposídeo (VP- 16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposídeo; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-1; ácido retinóico; esperamicinas; capecitabina. Sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de qualquer um dos expostos acima podem também ser usados.

[000214] Um agente quimioterapêutico ou outro agente citotóxico pode ser administrado como um profármaco. Por "profármaco" como usado aqui quer se dizer que uma forma de precursor ou derivado de uma substância farmacêuticamente ativa que é menos citotóxica para

células de tumor em comparação com um fármaco de origem é capaz de ser enzimaticamente ativado ou convertido na forma de origem mais ativa. Vide, por exemplo, Wilman, 1986, Biochemical Society Transactions, 615th Meeting Belfast, 14:375- 382; Stella e outros, "Profármacos: A Chemical Approach to Alvoed Drug Delivery," Dirigidos Drug Delivery; e Borchardt e outros, (ed.): 247-267, Ser humana Press, 1985. Os profármacos que podem encontrar uso com a presente invenção incluem, mas não são limitadas a profármacos contendo fosfato, profármacos contendo tiofosfato, profármacos contendo sulfato, profármacos contendo peptídeo, profármacos modificados por D-aminoácido, profármacos glicosilados, profármacos contendo betalactama, profármacos contendo fenoziacetamida opcionalmente substituída ou profármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituída, profármacos de 5-fluorocitosina e outros profármacos de 5-fluorouridina que podem converter no fármaco livre citotóxico mais ativo. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivados em uma forma de profármaco para o uso com os anticorpos da presente invenção incluem, mas não são limitadas a qualquer um dos agentes quimioterapêuticos acima mencionados.

[000215] Em uma outra concretização, o anticorpo é administrado com um ou mais agentes imunomoduladores. Tais agentes podem aumentar ou diminuir produção de uma ou mais citocinas, apresentação de autoantígeno regulado para cima ou para baixo, mascarar antígenos de MHC, ou promover o estado de proliferação, diferenciação, migração ou ativação de um ou mais tipos de células imunes. Agentes imunomoduladores incluem, mas não são limitados a fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) tais como aspirina, ibuprofeno, celecoxib, diclofenac, etodolac, fenoprofeno, indometacina, cetoralac, oxaprozina, nabumentona, sulindac, tolmentina, rofecoxib, naproxeno, cetoprofeno, e nabumetona, esteroides (por exemplo glucocorticoides,

dexametasona, cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, trimcinolona, azulfidinaicosanoides tais como prostaglandinas, tromboxanos, e leucotrienos, bem como esteroides tópicos tais como anthrahn, calcipotrieno, clobetasol, e tazaroteno), citocinas tais como TGFb, IFNalfa, IFNbeta, IFNgama, IL-2, IL-4, IL-10, citocina, quimiocina, ou receptor antagonistas de receptor incluindo anticorpos, receptores solúveis, e fusões de Fc de receptor contra BAFF, B7, CCR2, CCR5, CD2, CD3, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD14, CD15, CD17, CD18, CD20, CD23, CD28, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD402, CD64, CD80, CD86, CD147, CD152, fatores de complemento (C5, D) CTLA4, eotaxina, Fas, ICAM, ICOS, IFNa, IFNp.TFNy, IFNAR, IgE, IL-1, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5R, IL-6, IL-8, IL-9 IL-12, IL- 13, IL-13R1, IL-15, IL-18R, IL-23, integrinas, LFA-1, LFA-3, MHC, selectinas, TGFp, TNF, TNFp, TNF-R1, receptor de célula T, incluindo Enbrel<sup>(R)</sup> (etanercept), Humira<sup>(R)</sup> (adalimumab). e Remicade<sup>(R)</sup> (infliximab), globulina de anti-linfócito heteróloga; outras moléculas imunomoduladoras tais como pirimidinas 2-amino-6-aril-5-substituídas, anticorpos anti-idiotípicos para peptídeos de ligação de MHC e fragmentos de MHC, azatioprina, brequinar, bromocriptina, ciclofosfamida, ciclosporina A, D-penicilamina, desoxispergualm, FK506, glutaraldeído, ouro, hidroxicloroquina, leflunomida, malononitriloamidas (por exemplo leflunomida), metotrexato, minociclina, mizoribina, micofenolato mofetila, rapamicina, e sulfasazina.

[000216] Em uma concretização alternativa, anticorpos da presente invenção são administrados com uma citocina. Por "citocina" como usado aqui quer se dizer que um termo genérico para proteínas liberadas por uma população de célula que agem em uma outra célula como mediadores intercelulares. Exemplos de tais citocinas são linfocinas, monocinas, e hormônio de polipeptídeo tradicional. Incluídos entre as citocinas são hormônio de crescimento tais como hormônio de cresci-

mento de ser humano, hormônio de crescimento de ser humano de N-metionila, e hormônio de crescimento bovino; hormônio da paratireoide, tiroxina; insulina; proinsulina, relaxina, prorrelaxina, hormônio de glicoproteína tais como hormônio de estimulação de antígeno (FSH), hormônio de estimulação de tireoide (TSH), e hormônio de lutenização (LH), fator de crescimento hepático, fator de crescimento de fibroblasto; prolactina, lactogênio placentar, fator de necrose de tumor- alfa e -beta; substância de inibição de mulerian, peptídeo associado a gonadotropina de camundongo, inhibina; activina, fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento de nervo tal como NGF-beta; fator de crescimento de plaqueta, fatores de crescimento de transformação (TGFs) tais como TGF- alfa e TGF-beta, fator de crescimento de tipo insulina I e II; eritropoietina (EPO), fatores osteoinductivos, interferons tais como interferon-alfa, -beta, -gama, fatores de estimulação de colônia (CSFs) tais como macrófago-CSF (M-CSF), granulócito- macrófago- CSF (GM-CSF), e granulócito-CSF (G-CSF), interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, a fator de necrose de tumor tais como TNF-alfa ou TNF-beta, e outros fatores polipeptídeo incluindo LIF e ligante de kit (KL). Como usado aqui, o termo citocina inclui proteínas oriundas das fontes naturais ou oriunda da cultura de célula recombinante, e equivalentes biologicamente ativos nas citocinas de sequência nativa.

[000217] Em uma concretização, citocinas ou outros agentes que estimulam células do sistema imune são co-administrados com o anticorpo da presente invenção. Tal modo de tratamento pode aumentar função efetora desejada. Por exemplo, agentes que estimulam células N, incluindo mas não limitados a IL-2 podem ser co-administrados. Em uma outra concretização, agentes que estimulam macrófagos, incluindo mas não limitados a C5a, peptídeos de fórmula tal como N-formil-

metionil-leucil-fenilalanina (Beigier-Bompadre e outros (2003) Scand J. Immunol. 57. 221-8), podem ser co-administrados. Também, agentes que estimulam neutrófilos, incluindo mas não limitados a G-CSF, GM-CSF, e semelhantes podem ser administrados. Além do mais, agentes que promovem migração de citocinas imunoestimuladoras podem ser usados. Também agentes adicionais incluindo mas não limitados a interferon gama, IL-3 e IL-7 podem promover uma ou mais funções de efector.

[000218] Em uma concretização alternativa, citocinas ou outros agentes que inibem função de célula de efector são coadministrados com o anticorpo da presente invenção. Tal modo de tratamento pode limitar função efetora indesejada.

[000219] Os anticorpos da presente invenção podem ser combinados com outros regimes terapêuticos. Por exemplo, em uma concretização, o paciente a ser tratado com um anticorpo da presente invenção pode também receber terapia de radiação. Terapia de radiação pode ser administrada de acordo com protocolos comumente empregados na técnica e conhecidos pelo técnico versado. Tal terapia inclui mas não é limitado a radiação de cério, irídio, iodo ou cobalto. A terapia de radiação pode ser irradiação de corpo todo, ou pode ser dirigida localmente a um tecido ou sítio específico no corpo, tal como o pulmão, bexiga ou próstata. Tipicamente, terapia de radiação é administrada em pulsos durante um período de tempo de cerca de 1 a 2 semanas. A terapia de radiação pode, no entanto, ser administrada durante períodos mais longos de tempo. Por exemplo, terapia de radiação pode ser administrada a pacientes tendo câncer na cabeça e no pescoço por cerca de 6 a cerca de 7 semanas. Opcionalmente, a terapia de radiação pode ser administrada como uma única dose ou como doses múltiplas, doses sequenciais. O médico clínico versado pode determinar empiricamente a(s) dose(s) apropriada(s) de terapia de radiação úteis aqui. De acordo

com uma outra concretização da invenção, o anticorpo da presente invenção e um ou mais outras terapias de anticâncer são empregadas para tratar células de câncer ex vivo. É contemplado que tal tratamento ex vivo pode ser útil no transplante de medula óssea e particularmente, transplante de medula óssea autóloga. Por exemplo, tratamento de células ou tecido(s) contendo células de câncer com anticorpo e um ou mais outras terapias de anticâncer, tais como descritas acima, podem ser empregadas para depletar ou substancialmente depletar as células de câncer antes do transplante em um paciente receptor.

[000220] É naturalmente contemplado que os anticorpos da invenção podem empregar em combinação com ainda outras técnicas terapêuticas tais como cirurgia ou fototerapia.

[000221] A presente invenção é ulteriormente ilustrada pelos seguintes exemplos. No entanto, seria entendido, que a invenção não é limitada às concretizações exemplificadas.

## EXEMPLOS

### Materiais e métodos

#### A. Cepas Bacterianas e Plasmídios

[000222] DH5a de *Escherichia coli* (Invitrogeno, Karlsruhe, Alemanha) foi usada para a ampliação de plasmídios e clonagem.

#### B. Linhas de células

[000223] Linha de célula de mieloma de camundongo Sp2/0-Ag14 (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) usada para a produção de derivados de anticorpo específicos de hum-FLT3 recombinante foi cultivada em IMDM (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemanha) foi suplementada com 10% de soro de bezerro fetal (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemanha), 1% de penicilina e estreptomicina (Lonza, Basel, Suíça). Transfectantes estáveis foram selecionados com 1 mg/ml de G418 (Invitrogeno, Karlsruhe, Alemanha).

[000224] Linhas de células de hibridoma BV10 e 4G8, que secretam



anticorpos de IgG1 de camundongo/k específicos de FLT3 de anti-ser humano (obtidos a partir de Dr. H-J. Biihring, UKT Tubingeno, Alemanha), foram cultivados em RPMI 1640 (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemanha) foram suplementados com 10% de soro de bezerro fetal (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemanha), 1% de penicilina e estreptomicina (Lonza, Basel, Suíça).

[000225] Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), isoladas por densidade centrifugação de gradiente (LSM 1077, Lonza, Basel, Suíça), células de hibridoma e células de NALM16 (espécie presente de R. Handgretinger, Department of Pediatrics, University of Tübingen) foram mantidas em RPMI 1640, células de Sp2/0-Ag14 de camundongo (ATCC, Manassas, USA) em meio de IMDM (Lonza). Todos os meios foram suplementados com 10% de soro de bezerro fetal inativado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, piruvato de sódio a 1 mM, aminoácidos não essenciais, 2 mM de L-glutamina e 57 nM de beta-mercaptoetanol.

#### C. Transfectante com FLT3

[000226] cDNA de comprimento total de ser humano FLT3 (GenBank #BC 126350) foi obtido a partir de ImaGenes, Berlim, Alemanha. O cDNA foi clonado no vetor de pcDNA3 usando-se sítios de restrição de B Hl e XbaI adicionados nos sítios e foram transfectados para dentro de células de Sp2/0-Ag14 por eletroporação.

#### D. Anticorpos e Citrometria de Fluxo

[000227] Anticorpos de controle de isótipo, CD33-PE-Cy5 (clone WM53), CD34-APC (clone 581), CD-45-FITC (clone HI30), CD123-PE-Cy5 (clone 9F5), CDI Ic-PE (clone B-Iy6) e foram adquiridos a partir de BD Biosciences (Heidelberg, Alemanha), o anticorpo de CD303-FITC oriundo de Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach, Alemanha). Todos os anticorpos foram incubados com células por 30 minutos a 4°C. Para imunofluorescência indireta, fragmentos de F(ab)2 de anticamun-

dongo de cabra conjugado com PE ou APC, fragmentos de F(ab)<sub>2</sub> de anti ser humano de cabra, foram usados (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA). Em várias experiências, nós combinamos imunofluorescência indireta ou direta para análise multidimensional que adiciona anticorpos marcados em uma etapa final. Células foram analisadas em um FACSCanto II ou a FACSCalibur (Becton Dickinson). Contrastes para a análise de imunofluorescência indireta quantitativa (QIFIKIT(R)) foram adquiridas a partir de Dako (Hamburg, Alemanha) e foram usadas de acordo com o protocolo do fabricante. Para quantificação de anticorpos humanizados adequados, contas não estavam disponíveis. Assim, um índice de fluorescência específica (SFI) era calculado por divisão de intensidade de fluorescência média obtida com 4G8SDIEM pelo fato de que detectou com a não ligação, anticorpo de controle modificado por SDIE 9.2.27. Para essas experiências de anticorpos conjugados por PE gerados com o kit de conjugação de anticorpo de PE rápido de Lynx (AbD Serotec, Dusseldorf, Alemanha) foram usados. Ligante de FLT3 recombinante (rFLT3L) foi adquirido a partir de Peprotech EC (London, Great Britain). Para experiências de competição várias concentrações de rFLT3L foram incubadas com células de NALM16 e BV10SDIEM ou 4G8SDIEM (1 µg/ml) por 30 minutos a 4°C e foram analisadas por citometria de fluxo e imunofluorescência indireta.

#### E. Ensaio de Captação de 3[H]-metil-timidina

[000228]  $2 \times 10^5$  AML células precursoras imaturas foram semeados em triplicatas em placas de 96 cavidades e foram incubados com várias concentrações de anticorpos otimizados. Depois de 24 horas células foram pulsadas por outras 20 horas com 3[H]-metil-timidina (0,5 µCi/cavidade) e foram coletadas nos filtermats. Radioatividade incorporada foi determinada por contagem de cintilação líquida em um contador de microplaca 2450 (Perkin Elmer, Waltham, USA).

#### F. Ensaios de Liberação de 51[Cr]

[000229] Células de NALM16 e células precursoras imaturas AML primários foram usados como alvos. Para separar células precursoras imaturas e células de efector das preparações de PBMC de pacientes com leucemia, células foram marcadas com microcontas de CD34 e CD33 e foram separadas em colunas de LD após o protocolo dos fabricantes (Miltenyi Biotec). O número de células O número de contaminantes de células precursoras imaturas na população de célula efectora negativamente selecionada foi determinado por análise de FACS e foi variado entre 1% e 10% dependendo da contaminação de célula precursora imatura inicial. Em algumas experiências DCs marcados foram usados como células alvo. Ensaios de liberação de cromo foram realizados como anteriormente descrito (Otz T, Grosse-Hovest L, Hoffmann M, Rammensee HG, Jung G. A bispecific singlechain antibody that mediates célula alvo- restricted, supra- agonistic CD28 stimulation e maturing of lymphoma células. Leucemia. 2009;23(I):71-77). Resumidamente, células alvo marcadas e PBMCs foram incubadas a 37°C por 4 ou 8 horas em placas de fundo chato de 96 cavidades na presença de várias concentrações de anticorpos em uma razão de PBM:alvo de 50:1. Percentagem de liberação de 51[Cr] específica era calculada de acordo com a fórmula  $[\text{cpm (teste)} - \text{cpm (espontâneo)}] / [\text{cpm (lise de triton)} - \text{cpm (espontânea)}]$ . Se células precursoras imaturas leucêmicas forem usadas como alvos a adição de células de efector sem liberação de 51 [Cr] espontânea reduzida por anticorpo em algumas experiências resultando em valores negativos para a liberação específica.

#### G. Deslocamento de antígeno

[000230] Células de NALM16 ou células precursoras imaturas de AML foram incubadas com várias concentrações de 4G8SDIEM ou BV10SDIEM no meio de RPMI 1640. Depois de 24 ou 48 horas as cé-

lulas foram incubadas com tampão de FACS frio com gelo, foram incubadas com uma concentração de saturação de 4G8SDIEM (2 µg/ml) por 30 minutos a 4°C, foram manchadas com fragmentos de F(ab)2 de anti-ser humano de cabra conjugados com PE e foram analisadas por FACS. Expressão de superfície relativa de FLT3 era calculada que define a intensidade de fluorescência média de células pré-incubadas em anticorpo como 100%.

#### H. Isolamento e Maturação de Célula Dendrítica (DC)

[000231] DCs foram isoladas de preparações de revestimento de buffy de indivíduos saudáveis usando-se o kit II de isolamento de DC no sangue de acordo com o protocolo do fabricante (Miltenyi Biotec). Subconjuntos mieloide (mDC) e plasmacitoide (pDC) foram manchados com uma mistura de anticorpos de CD11c-PE, CD303-FITC e CD123-PE-Cy5. Para geração in vitro de mDC, 1x10<sup>8</sup> PBMCs de indivíduos saudáveis foram semeados em meio de 10 ml X- Vivol5 (Gibco, Darmstadt, Alemanha). Depois de 2 horas a 37°C células aderentes foram cultivadas em meio de RPMI 1640 suplementado com 50 ng/ml de GM-CSF e IL-4 (20 ng/ml) por 5 dias. No dia 6 LPS (100 ng/ml) foi adicionado. Células foram cultivadas no dia 7 e foram analisadas por citometria de fluxo.

#### I. Ensaios de Unidade de Formação de Colônia

[000232] Células de medula óssea foram obtidas por lavagem da cabeça femoral de pacientes que sofrem cirurgia de quadril. As células foram purificadas por densidade centrifugação de gradiente e foram semeadas a 107/ml em meio de RPMI 1640 contendo 5 µg/ml de 4G8SDIEM ou 9.2.27SDIE. Depois de 24 horas de incubação células foram transfectadas em anticorpo contendo (5 g/ml) meio de metilcelulose (10.000 células/ml, MethoCult H4434 clássico, Stemcell Technologies, Grenoble, França). O ensaio foi realizado em triplicatas. Depois de 12 dias colônias foram contadas e foram classificadas.

### Exemplo 1: Identificação de Sequências Desconhecidas de Anticorpos Específicos de FLT3

#### A. Clonagem do DNA que codifica regiões V

[000233] A clonagem das regiões V foi feita por PCR. A maioria das técnicas partem de mRNA e fazem uso da similaridade de anticorpo de regiões V (Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Moller, M., Perry, H.M., Gottesman, K.S. Sequences of Proteins of immunological interest, 4a ed. U.S. Department of Health and Ser humano Services, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. 1987) que faz o projeto dos iniciadores degenerados para ampliação de PCR possível (Larrick, J.W., Daniellson, L., Brenner, C.A., Wallace, E.F., Abrahamson, M., Fry, K.E., Borrebaeck, C.A.K. Reação de cadeia de polimerase usava iniciadores mistos: clonagem de genes de anticorpo monoclonal região variável de ser humanos oriundos de células de hibridoma simples. Bio/Technology 7: 934- 938, 1989; Orlandi, R., Giissow, D.H., Jones, P.T., Winter, G. Clonagem de domínios variáveis de imunoglobulina para a expressão pela reação de cadeia de polimerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837, 1989). No entanto, a ampliação desorientada de repertórios de V completos exige conjuntos muitos complexos de iniciadores degenerados (Marks J.D., Hoogenboom H.R., Bonnert T.P., McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G. By-passing immunization. Ser humano anticorpos from V-gene libraries exibiçãoed on phage. J. Mol. Biol. 222: 581-597, 1991). A clonagem de regiões V com sequências muito atípicas poderia ainda não ser possível por essa abordagem. Além do mais, a sequência original será pedida naquelas partes que são cobertas pelos iniciadores. Os aminoácidos nessas regiões parecem contribuir para o timing corrente das regiões de CDR (Chothia, C, Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S J., e outros Conformations of immunoglobulin hyperegion variáveis. Nature, 342: 877-883, 1989). Por essa razão, clonagem de região V por uso de

iniciadores degenerados poderiam levar a afinidade de anticorpo reduzida. Um método para tirar vantagem desses problemas potenciais é para clonar ambas as cadeias do anticorpo por reação de cadeia de polimerase inversa (iPCR) com iniciadores que emparelham as sequências de região constantes do anticorpo. O procedimento de clonagem é esquematicamente ilustrado na figura 1.

[000234] RNAs citoplasmático foram preparados a partir das linhas de células de hibridoma BV10 e 4G8 (Rappold I., Ziegler B.L., Kdhler I., Marchetto S., Rosnet O., Birnbaum D., Simmons P.J., Zannettino A.C., Hill B., Neu S., Knapp W., Alitalo R., Alitalo K., Ullrich A., Kanz L., Bilhring H.J. Functional e caracterização fenotípico de subconjuntos de medula óssea e sangue de cordão que expressam tirosina quinase de receptor de FLT3 (CD 135). Blood, 90: 111-125, 1997) usando-se o kit de RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha) aplicação de um protocolo modificado para o isolamento de RNA citoplasmático apenas

[000235] Usando-se iniciador de oligo (dT)]<sub>5</sub>, cDNA de fio duplo (ds-cDNA) foi preparado a partir de 0,3-2 g de mRNA usando-se o sistema de síntese de cDNA (Roche, Mannheim, Alemanha). Mais especificamente, para permitir formação de extremidade abrupta sobre os fios de DNA o ds-cDNA foi incubado com polimerase de T4-DNA. A mistura de reação foi extraída uma vez que com um volume igual de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e foi precipitada com etanol. A pelota de ds-cDNA dissolvida foi incubada com ligase de T4 DNA (Roche, Mannheim, Alemanha) para circular o cDNA (Uematsu Y. A novel and rapid clonagem method for the T-cell receptor region variable sequences. Immunogenetics, 34:174-178, 1991). A extremidade de 3' poli(A) é ligada à extremidade 5' desconhecida do cDNA por circulação.

#### B. Ampliação de PC de regiões variáveis de cDNA de imunoglobulina

[000236] O uso de dois iniciadores específicos constantes dirigidos externos (sumarizados na tabela 1) em uma reação de iPCR permiti-

ram a ampliação do cDNA inteiro de segmentos de gene de cadeia pesada e leve redistribuídos. 1-5 µl de ds- cDNA circulado foram incluídos em uma reação de PCR padrão de 50 µl (HotStar Taq DNA Polymerase, Qiagen, Hilden, Alemanha) com par de iniciador Ck-for e Ck-back para a cadeia leve e par de iniciador gamal-for e gammal-back para a ampliação de cadeia pesada. Os iniciadores são projetados para anelar à regiões constantes dos cDNAs. Quarenta ciclos de ampliação foram realizados nas seguintes condições: 30 seg 94°C, 1 min 56°C, 2 min 30 seg 72°C. O produto de ampliação resultante contém a região V completa, região de 5' UT, extremidade de pA, região de 3' UT e é flanqueado pelas sequências de região constante. O DNA obtido a partir do PCR inverso foi separado em géis de agarose de 1%. As tiras de DNA de tamanho correspondente (cadeia leve approx. 1000 pb; cadeia pesada cerca de 1600 pb) foram cortadas, foram isoladas por técnicas padrão (Maniatis e outros 1982) e foram clonadas no vetor de pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA). Para iniciadores padrão de determinação de sequência para o sistema de vetor e iniciadores padrão de determinação de sequência e iniciadores específicos constantes de região de imunoglobulina (cadeia leve: k-for1 e k-for2; cadeia pesada: CGI-for1, CGI-for2, CGI-rev1, CGI-rev2) foram usados (vide Tabela 1).

Tabela 1: Iniciadores usados para a ampliação e sequenciação de regiões de VJ e VDJ de anticorpos específicos de FLT3

Oligonucleotídeos usados para PCR inverso		
A	gama1-for	5'-CAA GGC TTA CAA CCA CAA TCC CTG G-3' (SEQ ID NO:45)
A'	gama1-back	5'-CAT ATG TAC AGT CCC AGA AGT ATC ATC TG-3' (SEQ ID NO:46)
B	Ck-for	5'-TGT TCA AGA AGC ACA CGA CTG AGG CAC CTC C-3' (SEQ ID NO:47)
B'	Ck-back	5'-ACT TCT ACC CCA AAG ACA TCA ATG TCA AG-3' (SEQ ID NO:48)



Oligonucleotídeos usados para sequenciação	
k-for1	5'-CCT GTT GAA GCT CTT GAC AAT GGG-3' (SEQ ID NO:49)
k-for2	5'-ATG TCT TGT GAG TGG CCT CAC AGG-3' (SEQ ID NO:50)
CG1-for1	5'-CGT CTA CAG CAA GCT CAA TGT GC-3' (SEQ ID NO:51)
CG1-for2	5'-CCA TCT GTC TAT CCA CTG GCC-3' (SEQ ID NO:52)
CG1-rev1	5'-CCA GGT CAC TGT CAC TGG CTC AG-3' (SEQ ID NO:53)
CG1-rev2	5'-CCT CAT GTA ACA CAG AGC AGG-3' (SEQ ID NO:54)

[000237] Assim, as cadeias leves e cadeias pesadas completas de anticorpos 4G8 de camundongo (sequência de aminoácidos de cadeia leve indicada na SEQ ID NO: 15 incluindo o domínio variável (SEQ ID NO: 13), o domínio variável incluindo CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2) e CDR3 (SEQ ID NO: 3); sequência de aminoácidos de cadeia pesada indicada na SEQ ID NO: 16, incluindo o domínio variável (SEQ ID NO: 14), o domínio variável incluindo CDR1 (SEQ ID NO: 4), CDR2 (SEQ ID NO: 5) e CDR3 (SEQ ID NO: 6)) e BV10 (sequência de aminoácidos de cadeia leve indicada na SEQ ID NO: 31 incluindo o domínio variável (SEQ ID NO: 29), o domínio variável incluindo CDR1 (SEQ ID NO: 7), CDR2 (SEQ ID NO: 8) e CDR3 (SEQ ID NO: 9); sequência de aminoácidos de cadeia pesada indicada na SEQ ID NO: 32 incluindo o domínio variável (SEQ ID NO: 30), o domínio variável incluindo CDR1 (SEQ ID NO: 10), CDR2 (SEQ ID NO: 11) e CDR3 (SEQ ID NO: 12)) foram identificadas.

[000238] A cadeia leve de anticorpo de murino 4G8 é codificada pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 19 (sequência de cDNA completa indicada na SEQ ID NO: 20), em que o domínio variável é codificado pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 17. A cadeia pesada de anticorpo 4G8 é codificada pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 21 (sequência de cDNA completa indicada na SEQ ID NO: 22), em que o domínio variável é codificado pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 18.

[000239] A cadeia leve de anticorpo de murino BV10 é codificada

pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 35 (sequência de cDNA completa indicada na SEQ ID NO: 36), em que o domínio variável é codificado pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO:33. A cadeia pesada de anticorpo BV10 é codificada pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 37 (sequência de cDNA completa indicada na SEQ ID NO: 38), em que o domínio variável é codificado pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 34.

Exemplo 2: Construção e expressão de anticorpos quiméricos específicos de FLT3 e seus derivados

[000240] Na segunda etapa de construção de anticorpos recombinantes, as regiões V clonadas foram combinadas com as regiões C desjadas em um vetor de expressão. O procedimento de clonagem realizado aqui permite a introdução de regiões de Ig V completas e sua expressão em células linfoides sem quaisquer alterações de sua sequência de aminoácidos. Por isso, a sequência de nucleotídeos do ampHcon obtida no Exemplo 1 foi determinada depois de subclonagem por sequenciação (iniciador na Tabela 1) e foi usada para projeção de pares de iniciadores (C C; D D'; Tabela 2). Os fragmentos de DNA reampliados dos segmentos de V são cortados com nucleases de restrição apropriadas (sumarizadas na Tabela 2) e então ligados nos vetores de expressão. Os vetores (Figura 2 e 3) contêm genes de região constante leve e pesado de ser humano. Assim inserção dos segmentos de V de recorte e ampliados reconstitui a organização genômico original dos genes de Ig nos vetores sem alterar qualquer aminoácido das regiões V.

[000241] O vetor parental para a cadeia leve contém a região de VJ da cadeia leve de camundongo e a região de C de gene kappa de ser. Sítios de restrição foram introduzidos nas localizações exigidas (XhoI and SpeI) a fim de substituir o fragmento de XhoI-SpeI de cadeia leve

com o fragmento de VJ da cadeia leve apropriado de anticorpos monoclonais BV10 ou 4G8 ou qualquer outro anticorpo monoclonal. A região relevante para a troca de fragmentos é mostrada aumentada na Figura 2. O fragmento a ser trocado contém parte do segundo éxona da sequência líder, um sítio apropriado (XhoI) para uma fusão de quadro, a região VJ e parte do segundo íntron com sítio de restrição SpeI.

[000242] O vetor original para a cadeia pesada contém a cadeia pesada de Ig de isótipo de  $\gamma 1$  de ser humano. Sítios de restrição foram introduzidos nas posições exigidas no íntron I e II para troca do fragmento de AatII-Clal com o fragmento de VDJ da cadeia pesada de anticorpos monoclonais BV10 ou 4G8 ou qualquer outro anticorpo monoclonal. A região relevante para a clonagem do fragmento de VDJ é mostrada aumentada na figura 3a. O fragmento a ser trocado contém partes do primeiro íntron com um sítio de restrição de AatII, o segundo éxon da sequência líder, a região de VDJ e parte do segundo íntron com o sítio de restrição Clal. Para a substituição de todos os éxons da região constante, sítios de restrição foram introduzidos na posição exigida no íntron II (MluI) e íntron VI (SpeI). O fragmento de M-SpeI a ser trocado (mostrado aumentado na Figura 3 b) contém a região constante inteira da cadeia pesada de  $\gamma 2$  de ser humano e duas modificações de aminoácido no domínio de CH2 como indicadas (Ser239-Asp; Ile332-Glu)

[000243] Além do mais, com os vetores de expressão usados, é possível trocar a região constante inteira do isótipo de Ig $\gamma 1$  de ser humano (fragmento de MluI-SpeI; vide Figura 3) ou contra regiões constantes de todos os outros isótipos de anticorpo ou contra partes de Fc com função efetora otimizada ou reduzida. No caso de anticorpos otimizados para o disparo de ADCC a S239D e troca de I332E (posição de aminoácido de acordo com a nomenclatura de Kabat) foram introduzidos no domínio de CH2 de região constante de  $\gamma 1$  de ser humano. Is-

so foi feito de acordo com a publicação de Lazar e outros (Lazar G.A., Dang W, Karki S, Vafa O, Peng J.S., Hyun L, Chan C, Chung H.S., Eivazi A, Yoder S.C., Vielmetter J, Carmichael D.F., Hayes R.J., Dahiyat B.I. Variantes de Fc de anticorpo engenheirados com função efetora aumentada. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4005-4010, 2006).

Tabela 2: Oligonucleotídeos usados para a ampliação de segmentos de VJ e VDJ obtidos por iPCR para a inserção em vetores de expressão

Oligonucleotídeos usados para o segmento de VJ de cadeia leve		
C	4G8-H-for	5'-tct ctt cac agg tgt cct ctc tca ggt cca act gca gca gcc tgg ggc tga gc-3' (SEQ ID NO:55)
C'	4G8-H-rev	5'-gag aag gta gga ctc acc tga gga gac tgt gag agt ggt gcc ttg gcc cca g-3' (SEQ ID NO:56)
C	BV10-H-for	5'-aga cgt cca ctc tgt ctt tct ctt cac agg tgt cct ctc cca ggt gca gct gaa gca gtc-3' (SEQ ID NO:57)
C'	BV10-H-rev	5'-gag aag gta gga ctc acc tga gga gac ggt gac tga ggt tcc ttg acc c-3' (SEQ ID NO:58)
C	universal for (AatII)	5'- <b>aga cgt</b> cca ctc tgt ctt tct ctt cac agg tgt cct ctc c-3' (SEQ ID NO:59)
C'	universal rev (ClaI)	5'- <b>tat cga</b> ttt aga atg gga gaa ggt agg act cac-3' (SEQ ID NO:60)
Oligonucleotídeos usados para o segmento de VDJ de cadeia pesada		
D	4G8-L-for (XhoI)	5'- <b>act cga gga</b> gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg-3' (SEQ ID NO:61)
D'	4G8-L-rev (SpeI)	5'- <b>tac tag</b> tac tta cgt ttt att tcc agc ttg gtc ccc cct cc-3' (SEQ ID NO:62)
D	BV10-L-for (XhoI)	5'- <b>act cga gga</b> gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc c-3' (SEQ ID NO:63)
D'	BV10-L-rev (SpeI)	5'- <b>act agt</b> act tac gtt tca gct cca gct tgg tcc cag cac cga acg tg-3' (SEQ ID NO:64)

D 4G8-L-for (XhoI) 5'-act cga gga gat art gtg eta act cag tct cca gec acc ctg-3' (SEQ ID NO: 61)

D' 4G8-L-rev (SpeI) 5'-tac tag tac tta cgt ttt art tec age ttg gtc ccc cct cc-3' (SEQ ID NO: 62)

D BV10-L-for (XhoI) 5'-act cga gga gac att gtg atg aca cag tct cca tec  
tec c- 3' (SEQ ID NO: 63)

D' BV10-L-rev (SpeI) 5'-act agt act tac gtt tea get cca get tgg tec cag  
cac cga acg tg-3' (SEQ ID NO: 64)

[000244] Sítios de restrição são mostrados em negrito e indicados pelas letras entre parêntese.

[000245] Assim, anticorpos quiméricos 4G8 e BV10 e as variantes de Fc otimizados SDIE 4G8 e SDIE BV10 foram obtidos. Esses compreendem as seguintes sequências de aminoácidos e de nucleotídeos.

[000246] Anticorpo quimérico 4G8: sequência de aminoácidos de cadeia leve como indicada na SEQ ID NO: 23 e como codificada pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 24, sequência de aminoácidos de cadeia pesada como indicada na SEQ ID NO: 25 e como codificada pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 26.

[000247] SDIE 4G8 (anticorpo otimizado por Fc, quimérico): sequência de aminoácidos de cadeia leve indicada na SEQ ID NO: 23 e codificada pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 24, sequência de aminoácidos de cadeia pesada indicada na SEQ ID NO: 27 e codificada pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 28.

[000248] Anticorpo quimérico BV10: sequência de aminoácidos de cadeia leve como indicada na SEQ ID NO: 39 e como codificada pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 40, sequência de aminoácidos de cadeia pesada como indicada na SEQ ID NO: 41 e como codificada pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 42.

[000249] SDIE BV10 (anticorpo otimizado por Fc, quimérico): sequência de aminoácidos de cadeia leve indicada na SEQ ID NO: 3 e codificada pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO:

40, sequência de aminoácidos de cadeia pesada indicada na SEQ ID NO: 43 e codificada pela sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 44.

#### Exemplo 3: Expressão e purificação de anticorpos de anti-FLT3

[000250] Cotransfecção dos vetores de expressão que codificam a cadeia leve e pesada quimérica (IgG1/capa) ou cadeias pesadas modificadas na linha de célula de mieloma de produção de não Ig de Sp2/0 forneceu transfectomas estáveis que secretam anticorpos quiméricos monoclonais que são capazes de se ligar especificamente a FLT3 em células de REH células de ser humano, e transfectantes de FLT3 (Sp2/0).

[000251] Anticorpos quiméricos foram purificados de sobrenadante de cultura de célula por cromatografia por afinidade na proteína A.

#### Exemplo 4: Função efetora de ADCC de anticorpos de anti-FLT3

[000252] A função efetora de ADCC dos anticorpos quiméricos de anti-FLT3, otimizados por Fc de 4G8-SDIE e BV10-SDIE, em comparação com os anticorpos quiméricos correspondentes sem otimização de Fc (figura 4A e B) bem como um anticorpo de anti-NG2 quimérico compreendendo a mesma modificação de Fc (figura 4C) foi demonstrado usando-se ensaios de liberação de cromo. Além do mais, a atividade de matar célula de 4G8-SDIE e PBMCs não estimuladas em comparação com o anticorpo de camundongo parental de 4G8 foi mostrado para células precursoras imaturas de AML isoladas de um paciente ser humano com leucemia mielógena aguda (Figura 5). As células alvo usadas foram:

[000253] NALM16: uma linha de célula de leucemia linfoblástica aguda (ALL), fornecedor: Department of Pediatric Oncology, University of Tiibingen, original characterization: Minowada J e outros J Cancer Res Clin Oncol 101 :91-100 (1981).

[000254] SK-Mel63: linha de célula de melanoma de ser humano,

fornecedor original: Dr. A. Knuth, Nordwestkrankenhaus Frankfurt/Maina, Alemanha.

[000255] SG3: células leucêmicas, isoladas do sangue periférico de um paciente com leucemia mielógena aguda (AML) por densidade centrifugação de gradiente; fornecido por Dr. H. Salih, Department of Medical Oncology, University of Tiibingen.

[000256] As células efetoras usadas eram células de mononucleares sangue periférico (PBMCs) isoladas do sangue de doadores saudáveis normais.

[000257] O ensaio de liberação de cromo foi realizado como se segue:  $10^6$  células alvo foram marcadas com cromato de sódio ( $^{51}\text{Cr}$ , 150  $\mu\text{Ci/ml}$ ) por 1 hr, foram lavadas e foram laminadas em placas de micro-título de 96 cavidades (10.000 células por cavidade). PBMC e anticorpos foram então adicionados às concentrações indicadas. Depois de 4 e 20 hrs respectivamente sobrenadante foi coletada e foi contada em um contador MicroBeta. Citotoxicidade foi determinada de acordo com a fórmula padrão: % de liberação de  $^{51}\text{Cr}$  específica =  $(\text{liberação experimental} - \text{liberação espontânea}) : (\text{liberação total} - \text{liberação espontânea}) \times 100$ . Liberação espontânea e liberação total foram determinadas por incubação de células alvo no meio com ou sem 2 % de Triton-X100, respectivamente.

[000258] Os resultados mostrados nas figuras 4 e 5 claramente mostram que a introdução das modificações de Fc de S239D e I332E no domínio de CH2 da cadeia pesada de anticorpos quiméricos de anti-FLT3 4G8 e BV10 poderiam induzir atividade de matar célula significativa em ambos os anticorpos. Em contraste com esses resultados, a introdução das mesmas modificações em um anticorpo de anti-NG2 quimérico não tinha tal efeito. Correspondentemente, não há no geral princípio que duas modificações usadas para conferir atividade de matar célula em qualquer dado anticorpo, mas certamente têm de ser



cuidadosamente selecionadas para cada anticorpo monoclonal individual.

Exemplo 5: Produção e purificação de anticorpos otimizados por Fc e recombinantes

[000259] O mRNA de anticorpos de murino BV10 e 4G8 (ambas IgG1 capa) foi isolado de hibridomas com o kit de RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha). Regiões variáveis desconhecidas de cadeia pesada (VDJ) e de cadeia leve (VJ) foram identificadas por sequenciação de amplicons de PCR inversos gerados como anteriormente descritos (Herrmann T, Grosse-Hovest L, Oetz T, Krammer PH, Ramnensee HG, Jung G. Construção de anticorpos biespecíficos otimizados para a ativação seletiva do receptor da morte de CD95. *Cancer Res.* 2008;68(4):1221-1227), usando-se iniciadores específicos para genes constantes de camundongo de cadeia leve (Ck- para (SEQ ID NO: 47); Ck-back (SEQ ID NO: 48)) e cadeia pesada (gamma1-for (SEQ ID NO: 45); gamma1-back (SEQ ID NO: 46)). A clonagem das regiões variáveis do hibridoma 9.2.27 (GenBank: #AJ459796; #AJ459797), produção de um anticorpo de IgG2a/K CSPG4 foi também descrito anteriormente (Grosse-Hovest L, Hartlapp I, Marwan W, Brem G, Ramnensee HG, Jung G. Um anticorpo de cadeia simples biespecífico recombinante induz estimulação de CD28 de supra-agonística direcionada e morte de célula de tumor. *Eur J Immunol.* 2003 ;33(5): 1334-1340). Para a geração de anticorpos quimerizados e otimizados, os elementos de VJ e VDJ, foram re-ampliados usando-se os oligonucleotídeos listados na tabela 2 e foram clonados em vetores de expressão eucarióticos como mostrados nas figuras 2 e 3. Além das trocas de aminoácidos a S239D e I332E, a parte de GI Fc otimizada contém um etiqueta M C-terminal (PTHVNVSVVM AEEQKLISEEDLLR; SEQ ID NO: 66, que foi derivado das sequências de aminoácidos PTHVNVSVVMAE (aminoácido #455-466 do pedaço de extremidade de IgA1 de ser humano) (SEQ ID NO:

67) e o epítipo de c-myc EQKLISEEDLLR (SEQ ID NO: 68) (Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM. Isolamento dos anticorpos monoclonais específicos para produto de proto-oncogene de c-myc de ser humano. *Mol Cell Biol.* 1985;5(12):3610-3616). Anticorpos recombinantes, bem como 4G8 e BV10 de camundongo parental, foram purificados do sobrenadante de cultura de transfectantes e células de hibridoma, respectivamente, usando-se cromatografia por afinidade de proteína A (GE Healthcare, Munich, Alemanha). No caso de 4G8SDIEM, uma grande carga do anticorpo (15 g) foi produzida em câmaras limpas compatíveis com GMP usando-se tecnologia descartável incluindo um reator de bio-onda de 100 L (Sartorius; Goettingen, Alemanha) para a fermentação e um sistema de Akta Ready para a purificação por cromatografia de interação hidrofóbica, troca de íons e de proteína A (MabSelect Sure and CaptoAdhere columns, GE Healthcare, Munich, Alemanha).

#### Exemplo 6: Avidéz e especificidade de FLT3 de ligação de anticorpo

[000260] Os anticorpos de camundongo parentais de 4G8 e BV10 foram originalmente descritos e foram caracterizados como reconhecimento da proteína de FLT3 (Rappold I, Ziegler BL, Kohler I, e outros. Caracterização funcional ou fenotípica de subconjuntos de medula óssea e sangue de cordão que expressam tirosina quinase de receptor de FLT3 (CD135). *Blood.* 1997;90(1):111-125). Figura 7A mostra que ambos os anticorpos modificados por SDIEM especificamente se ligam a essa proteína nas células de Sp2/0 de camundongo transfectadas. Na Figura 7B ligação dos dois anticorpos a FLT3 positivos a células de NALM1-6 ser humano é avaliada por citometria de fluxo. Anticorpos não bloqueiam cruzadamente entre si (dados não mostrados) e assim reconhecem dois epítopos espacialmente separados da proteína de FLT3. Ambas os anticorpos de moléculas de FLT3 saturadas nas células de NALM16 a baixas concentrações de 1 µg/ml. Ligação do anti-

corpo de 4G8 quimérico era mais forte do que aquela de BV10. Isso não é devido à quimerização ou otimização uma vez que uma diferença similar foi observada quando ligação das versões parentais de camundongo de 4G8 e BV10 foi comparada (Figura 7C). Nenhuma diferença na ligação entre as versões quiméricas modificadas por SDIEM e quiméricas dos anticorpos foram detectadas (Figura 7B). O anticorpo modificado por SDIE, chamado 9.2.27SDIE, dirigido contra um antígeno de superfície associado a melanoma, não ligou a células de NALM16 e foi usado como um controle negativo nessa e várias experiências subsequentes.

#### Exemplo 7: Competição com ligação do ligante de FLT3 (FLT3L)

[000261] Em geral, interferência com ligação do ligante natural pode contribuir para a atividade terapêutica de um anticorpo. Figura 8 A mostra que FLT3L recombinante parcialmente inibe ligação de 4G8SDIEM, mas não de BV10SDIEM a células de NALM16, indicando que o sítio de ligação do anticorpo de 4G8 está na proximidade próxima àquele do ligante de FLT3. Portanto, o efeito de 4G8SDIEM na proliferação espontânea das células precursoras imaturas leucêmicas dos três pacientes diferentes foi avaliado in vitro usando-se o anticorpo de 9.2.27 modificado por SDIE de não ligação como um controle. Enquanto que proliferação espontânea das células de AML primárias variadas substancialmente, efeitos significativos dos anticorpos na proliferação de célula não foram observados (Figura 8B).

#### Exemplo 8: Citotoxicidade celular dependente de anticorpo

[000262] Figura 9 mostra que a atividade de ADCC de PBMCs contra células de NALM16 é marcadamente aumentada na presença dos anticorpos de SDIEM modificados quando comparados com aquele de versões de anticorpo quiméricas não modificadas. Em várias experiências, as concentrações exigidas para alcançar lise comparável por anticorpos modificados e não modificados diferenciados por um fator de

pelo menos 100. Morte pelo anticorpo de 4G8SDIEM será significativamente melhor do que aquele alcançado por BV10SDIEM, em particular a baixas concentrações. Isso corresponde à avidez de ligação moderadamente baixa de BV10 (Figura 7).

[000263] Na figura 10A a atividade de ADCC de 4G8SDIEM é mostrada usando-se PBMCs de três doadores saudáveis diferentes (#1-3). Nessas experiências, o mAb 9.2.27 modificado por SDIE foi usado como um controle negativo. A atividade citolítica na presença desse reagente não excedeu aquela de células de NK na ausência de anticorpos que variaram entre 0 e 20%. Na Figura 10B a atividade de ADCC de PBMCs oriunda de um doador saudável (#2) contra células precursoras imaturas leucêmicas dos três pacientes diferentes é mostrada. Atividade de ADCC medida contra essas células precursoras imaturas (AML #1, AML #2, AML #7), que portam 4000, 4500 e 3200 moléculas de FLT3 por célula, respectivamente, era menos pronunciada do que aquela contra células de NALM 16 cultivadas. Exigiu 8 ao invés de 4 horas para se tornar claramente detectáveis. Em geral, a ADCC bem como a atividade de NK contra células de NALM 16 e células precursoras imaturas leucêmicas continuam a surgir depois de 8 horas. No entanto, usando-se células precursoras imaturas primárias, foi difícil para prolongar ulteriormente o tempo de ensaio devido a liberação de corno espontâneo crescente.

[000264] A próxima atividade de ADCC de PBMCs isolada do sangue de pacientes com AML contra células precursoras imaturas autólogas foi avaliada. Para esse fim, células precursoras imaturas leucêmicas oriundas de preparações de BMC foram depletadas e as PBMCs depletadas foram usadas como células efectoras contra as células precursoras imaturas positivamente selecionadas (vide Materiais e Métodos). Sob essas condições lise significativa em 2 (AML #1, #15) de cada 5 experiências independentes com células precursoras imatu-

ras e PBMCs autólogas dos pacientes respectivos (Figura IOC) foi detectada.

#### Exemplo 9: Mudança de antígeno

[000265] Modulação de expressão de antígeno alvo na ligação de anticorpo é um fenômeno frequentemente observado durante a terapia de anticorpo. Em particular, uma perda sustentada e completa foi relatada no tratamento de pacientes com AML com uma dose de saturação do anticorpo de CD33. Lintuzumab (Feldman EJ, Brandwein J, Stone R, e outros. Estudo de múltiplocentros aleatorizados de Fase III de um anticorpo monoclonal de anti-CD33 humanizado, lintuzumab, em combinação com quimioterapia, versus quimioterapia sozinha em pacientes com leucemia mieloide aguda de primeira recaída ou contumaz. J Clin Oncol. 2005;23(18):4110-4116). Figura 11A mostra a mudança de antígeno induzida depois de incubação de células de NALM ou células precursoras imaturas leucêmicas primárias de dois pacientes (AML #1 e #2) com várias concentrações de 4G8SDIEM por 48 h. Em todas essas células uma mudança moderada de antígeno foi observada que já estava completa depois de 24 h de incubação (dados não mostrados).

#### Exemplo 10: Ligação a células leucêmicas e normais

[000266] Figuras 11B e 11C mostram ligação de um anticorpo de 4G8 e 4G8SDIEM de camundongo parental, respectivamente, para um painel de células leucêmicas obtido a partir de pacientes que sofrem dos subtipos indicados de AML. Células de CD33+CD45dim ou CD34+CD45dim controladas foram analisadas. FLT3 foi detectado em todas as 15 amostras de paciente. O número de moléculas por cavidade por imunofluorescência indireta e citotometria de fluxo quantitativa variava de 500 a 6000, que nas células de NALM16 oriundas de 6000 a 9000 (Figura 11B). Na Figura 11C, 4G8SDIEM-PE ao invés de 4G8 camundongo foi usado para manchar. Nesse caso, um valor

de SFI era calculado para quantificar ligação de anticorpo. Para células precursoras imaturas oriundas de 4 de cada 15 doadores esse índice não foi determinado por causa da alta reatividade não específica com o anticorpo de controle de 9.2.27SDIE. Como esperado, valores de SFI das amostras avaliáveis proximamente emparelham os números de moléculas determinados por FACS quantitativa (Figura 11C).

[000267] Figuras 12A-C mostram que a ligação de camundongo 4G8 a mDCs positivas a CD11c e a pDCs positivas a CD303 purificadas de PBMCs normais era marginal no melhor. Os números de moléculas de FLT3 expressas nessas células estavam abaixo de 100/célula. Além disso, DCs oriundas de PBMCs normais foram geradas. Embora essas células expressem grandes quantidades dos marcadores associados a DC de CD80, CD86 e CD 123, ligação de anticorpos de 4G8 era novamente apenas detectáveis (dados não mostrados). A seguir ligação de células positivas de 4G8 a CD34 na medula óssea normal foi avaliada. Novamente, ligação do anticorpo a células de medula óssea de três diferentes doadores era marginal com menos do que 300 moléculas por célula (Figura 12D). Em resumo, ligação de anticorpos de FLT3 a células de DCs normais e células de medula óssea foi significativamente mais baixa do que a todas as células leucêmicas de expressão de FLT3 examinadas. Além disso, ligação de anticorpos de FLT3 a PBMCs, trombócitos, eritrócitos e granulócitos foi observado (dados não mostrados).

#### Exemplo 11: Toxicidade *in vitro*

[000268] Apesar de níveis relativamente baixos de ligação de 4G8SDIEM a células precursoras de medula óssea normais e DCs, a toxicidade potencial desse anticorpo em relação a tais células foi avaliada. Para esse fim, nós incubamos células de medula óssea com concentrações de saturação de 4G8SDIEM e 9.2.27SDIE e determinamos a influência desses anticorpos na capacidade das células de

medula óssea de originar colônias (CFUs) em meio semi-sólido. Nenhuma influência significativa dos anticorpos na capacidade de formação de CFU foi detectada em duas experiências com células de medula óssea oriundas de doadores saudáveis diferentes (Figura 13 A). Do mesmo modo, DCs de ser humano foram incubadas com PBMCs autólogas como células efectoras. Enquanto que ADCC eficaz mediada por 4G8SDIEM contra células de NALM16, usadas como controle positivo, nenhuma morte de DCs autólogas foi observada (figura 13B).

#### Exemplo 12: Aplicação clínica de 4G8-SDIEM

[000269] Um homem de 30 anos de idade diagnosticado em 2008 com AML (FAB M0, 45XY, cariótipo complexo incluindo inv(3)(q21q26), -7) foi tratado com 4G8-SDIEM. O paciente não conseguir remissão completa (CR) depois de dois regimes diferentes de terapia de indução. Subsequentemente ele recebeu SCT alogênico (transplante de célula tronco) oriunda de um doador emparelhado com HLA, recaiu, recebeu SCT haploidêntica oriunda de sua irmã e recaiu novamente. Tratamento com 4G8-SDIEM foi considerado e foi realizado teste pré-clínica. Análise de FACS das células precursoras imaturas dos pacientes (CD34+) revelaram expressão homogênea de FLT3 a cerca de 4000 moléculas de célula (figura 14A e dados não mostrados). ADCC eficaz induzido por 4G8-SDIEM, in vitro das células mononucleares de sangue periférico do paciente (PBMC) contra células de leucemia de NALM16 e – a uma extensão menor, - contra células precursoras imaturas autólogas (figura 14B, C). O paciente foi então tratado com doses escalonadas de 4G8-SDIEM que variam de 10 µg a 10 mg. Várias horas depois da primeira dose de 10 mg,  $5 \times 10^8$  PBMCs de doador depletado por CD3/CD19 oriunda de sua irmã foram adotivamente transferidos. Concentração de soro de 4G8-SDIEM alcançou 0,8 µg/ml 1 h depois da primeira dose de 10 mg e subsequentemente diminuiu para 0,3 µg/ml a 24 h (figura 15A). Durante o trata-



mento (i) uma saturação quase completa de células leucêmicas na medula óssea (BM) (figura 15B), (ii) um aumento marcado de células de NK ativadas no sangue periférico (PB) (figura 16A) e BM (figura 16B) que estava associado a um aumento dos níveis de soro do índice de TNF de citocina (figura 16C), e (iii) uma redução marcada de células precursoras imaturas leucêmicas na PB (figura 16A) foi observada. Enquanto que o declínio de células precursoras imaturas PB era transitório, mas quase completo, redução no BM era menos pronunciada (figura 16B). Isso é mais provável devido às diferentes razões de células de NK:leucemia em dois compartimentos: No PB a razão de células de CD56+ NK e células precursoras imaturas era cerca de 1 enquanto que em BM era apenas 1/7, como determinado por FACS (dados não mostrados). Efeitos colaterais eram moderados e consistia em temperatura subfebril (max. 38,2°C) e uma exacerbação transitória de uma erupção de pele acneiforma transitória preexistente.

[000270] Apesar da resposta meramente transitória a tratamento de anticorpo, o paciente inesperadamente permaneceu em boa condição clínica por vários meses com aumento lento de contagens de célula precursora imatura sob melhor cuidado suportativo e hidroxureia. Portanto, um segundo SCT haploidêntico oriundo de um doador diferente foi realizado. Depois da recuperação, o paciente alcançou uma CR sem doença residual mínima detectável (MRD). Nós então aplicamos 45,5 mg de 4G8-SDIEM em doses escalanadas. Nesse momento, nem liberação de citocina relevante nem ativação de célula NK inteira (figura 16D) foram observadas, e efeitos colaterais estavam totalmente ausentes.

[000271] A invenção foi descrita amplamente e genericamente aqui. Cada uma das espécies mais estreitas e agrupamentos subgenéricos que caem dentro da revelação genérica também fazem parte da invenção. Isso inclui a descrição genérica da invenção com a condição

ou limitação negativa de remoção de qualquer matéria objeto da espécie, independentemente se ou não o material extirpado é especificamente relatado aqui. Outras concretizações estão dentro das seguintes reivindicações. Além disso, onde características ou aspectos da invenção são descritos em termos dos grupos de Markush, aqueles versados na técnica reconhecerão que a invenção é também desse modo descrita em termos de qualquer membro individual ou subgrupo de membros do grupo de Markush.

[000272] Aquele versado na técnica prontamente apreciará que a presente invenção é bem adaptada para realizar os objetivos e obterá os fins e vantagens mencionadas, bem como aquelas inerentes aqui. Além disso, será evidente por aquele versado na técnica que variação de substituições e modificações podem ser feitas na invenção revelada aqui sem se afastar do escopo e espírito da invenção. As composições, métodos, procedimento, tratamentos, moléculas e compostos específicos descritos aqui são presentemente representativos de concretizações preferidas são exemplares e não são destinados como limitações no escopo da invenção. Mudanças aqui e outros usos ocorrerão por aqueles versados que estão incluídos dentro do espírito da invenção são definidos pelo escopo das reivindicações. A listagem e discussão de um documento anteriormente publicado nesse relatório não necessariamente seria tomado como um reconhecimento que o documento é parte do estado da técnica ou é conhecimento geral comum.

[000273] A invenção ilustrativamente descrita aqui pode adequadamente ser praticada na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações, não especificamente revelados aqui. Assim, por exemplo, os termos "compreendendo", "incluindo," "contendo", etc. serão lidos extensivamente e sem limitação. A palavra "compreender" ou variações tal como "compreende" ou "compreendendo" correspon-

dentemente será entendida como implicando a inclusão de um número inteiro ou grupos de números inteiros afirmados mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou grupo de números inteiros. Adicionalmente, os termos e expressões empregadas aqui foram usados como termos de descrição e não de limitação, e não de intenção no uso de tais termos e expressões de exclusão de quaisquer equivalentes das características mostradas e descritas ou suas porções, mas é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Assim, seria entendido que embora a presente invenção fosse especificamente revelada por concretizações exemplares e características opcionais, modificação e variação das invenções expressas aqui reveladas podem ser recorridas por aqueles versados na técnica, e que tais modificações e variações são consideradas como estando dentro do escopo dessa invenção.

[000274] O conteúdo de todos os documentos e documentos de patente citado aqui é incorporado por referência em sua totalidade.

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo que se liga ao receptor de tirosina quinase humano FLT3, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, a cadeia leve compreendendo uma CDR1 de  $V_L$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 1; uma CDR2 de  $V_L$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 2; e uma CDR3 de  $V_L$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 3, e a cadeia pesada compreendendo uma CDR1 de  $V_H$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 4; uma CDR2 de  $V_H$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 5; e uma CDR3 de  $V_H$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 6, e as substituições de aminoácidos S239D e I332E na região constante relativa a um anticorpo anti-FLT3 parental, em que a numeração posicional está de acordo com o índice de EU.

2. Anticorpo que se liga ao receptor de tirosina quinase humano FLT3, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, a cadeia leve compreendendo uma CDR1 de  $V_L$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 7; uma CDR2 de  $V_L$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 8; e uma CDR3 de  $V_L$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 9, e a cadeia pesada compreendendo uma CDR1 de  $V_H$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 10; uma CDR2 de  $V_H$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 11; e uma CDR3 de  $V_H$  que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 12, e as substituições de aminoácidos S239D e I332E na região constante relativa a um anticorpo anti-FLT3

parental, em que a numeração posicional está de acordo com o índice de EU.

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada compreende um domínio de  $V_H$  que compreende ou que consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 14 e a cadeia leve compreende um domínio de  $V_L$  que compreende ou que consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 13.

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada compreende um domínio de  $V_H$  que compreende ou que consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 30 e a cadeia leve compreende um domínio de  $V_L$  que compreende ou que consiste na sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 29.

5. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico e compreende uma cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 27 e uma cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 23.

6. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico e compreende uma cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 43 e uma cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 39.

7. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo liga-se com afinidade aumentada ao receptor de FcγRIIIa ou tem função efetora ADCC aumentada quando comparada ao anticorpo de origem.

8. Molécula de ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica uma cadeia leve e pesada do anticorpo, como definidas

em qualquer uma das reivindicações 1, 3 ou 5, em que a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica o domínio variável da cadeia leve indicada na SEQ ID NO: 17 e em que a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica o domínio variável da cadeia pesada indicada na SEQ ID NO: 18 ou em que a molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia leve do anticorpo tem uma sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 24 e a molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada do anticorpo tem uma sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 28.

9. Molécula de ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica uma cadeia leve e pesada do anticorpo, como definidas em qualquer uma das reivindicações 2, 4 ou 6, em que a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica o domínio variável da cadeia leve indicada na SEQ ID NO: 33 e em que a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica o domínio variável da cadeia pesada indicada na SEQ ID NO: 34 ou em que a molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia leve do anticorpo tem uma sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 40 e a molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada do anticorpo tem uma sequência de nucleotídeos indicada na SEQ ID NO: 44.

10. Uso de um anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que é para o preparo de uma composição farmacêutica para o tratamento de um linfoma ou leucemia em mamíferos.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o linfoma ou a leucemia está no estágio de doença residual mínima (MRD).

12. Uso, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracteri-

zado pelo fato de que o linfoma ou a leucemia é selecionado do grupo que consiste em: linfomas de não Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia/linfoma linfoblástico agudo de célula B (B-ALL), linfoma de célula de manto (MCL), leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia mieloide crônica (CML), leucemia mieloide aguda (AML), e mieloma múltiplo (MM).

13. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é administrado em combinação com pelo menos um agente selecionado do grupo que consiste em um agente citotóxico, um agente quimioterapêutico, uma citocina, um agente inibitório de crescimento, um agente anti-hormonal, um inibidor de quinase, um agente antiangiogênico, um cardioprotetor, um agente imunoestimulatório, um agente imunossupressivo, um inibidor de angiogênese, um inibidor de tirosina quinase de proteína e segundo anticorpo.

14. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, e um veículo farmaceuticamente aceitável.



FIG. 1

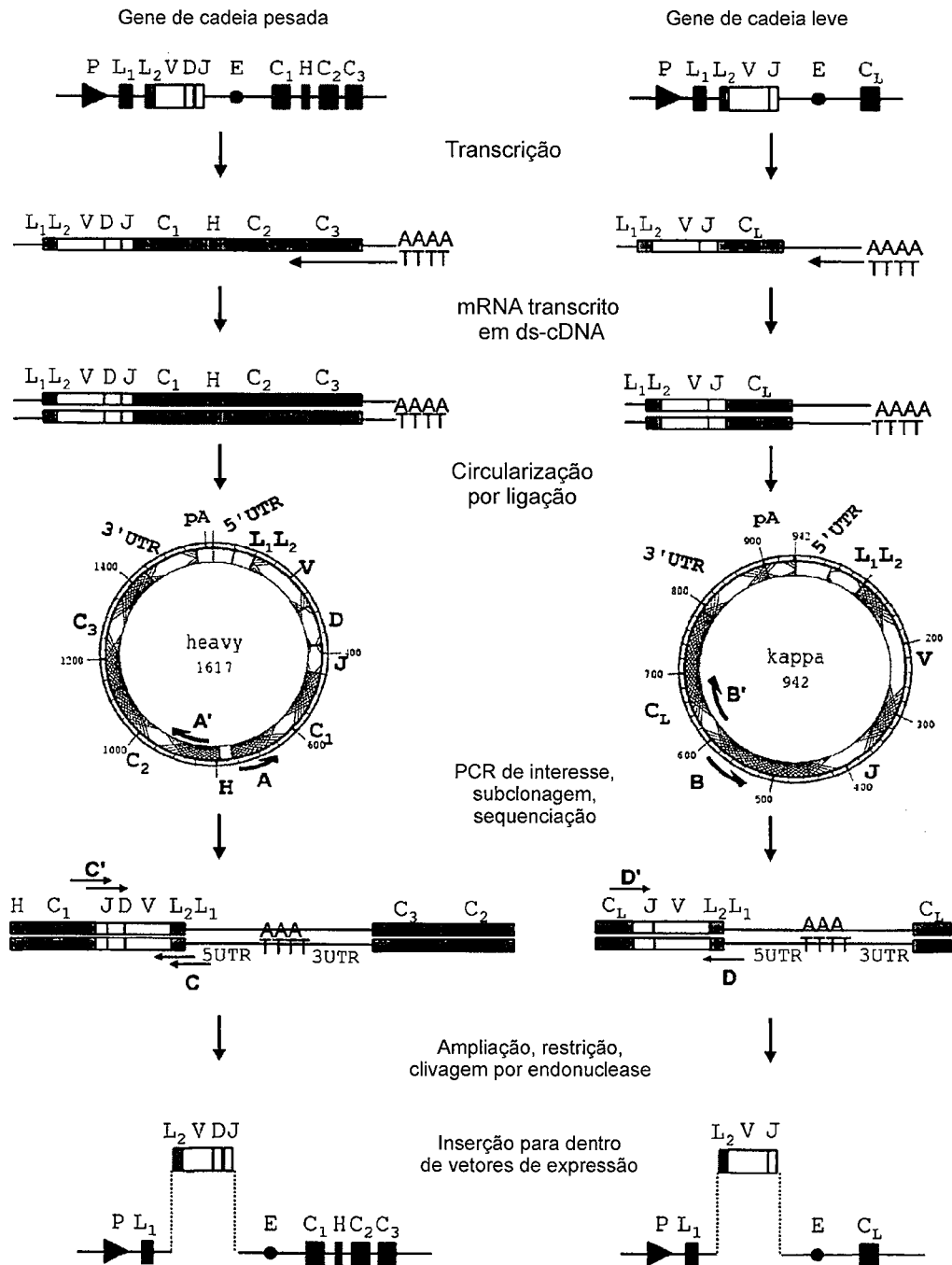
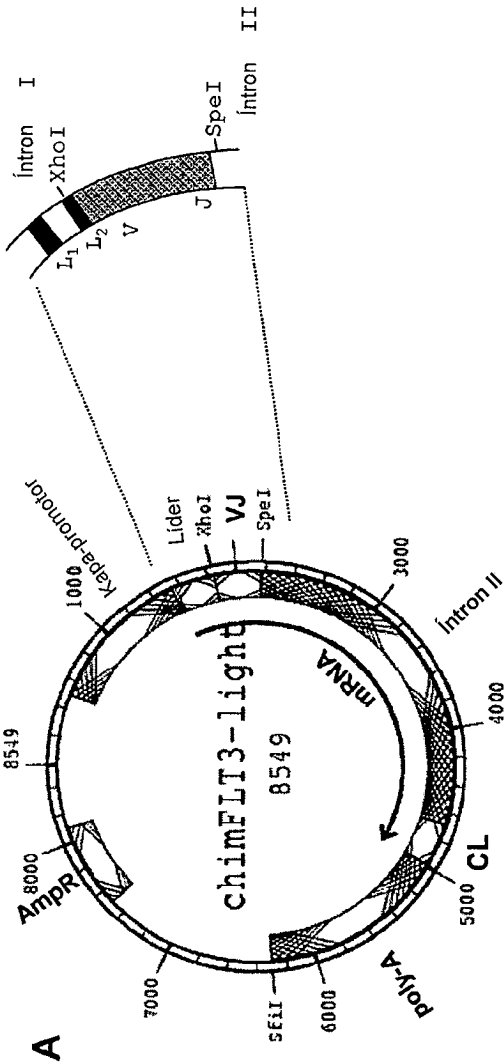


FIG. 2

Vetor para expressão de cadeia kapa química de anticorpos específicos de anti-FLT-3 em células linfóides



B

ATG GTT TTC ACA CCT CAG ATA CTT GGA CTT ATG CTT TTT TGG ATT TCA G] gtagtactgctt.....intron I....  
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser G  
-20

..ttttccag[GT GCT CCA GGA|GA.....VJ exon (as amplified by iPCR).....AAA C] gtaagtactagttttt.....intron II.....  
Lys A Arg Gly Asp +1

FIG. 3

Vetor de expressão de cadeia pesada química (Y1)  
de anticorpos específicos de anti-FLT-3 em células linfóides

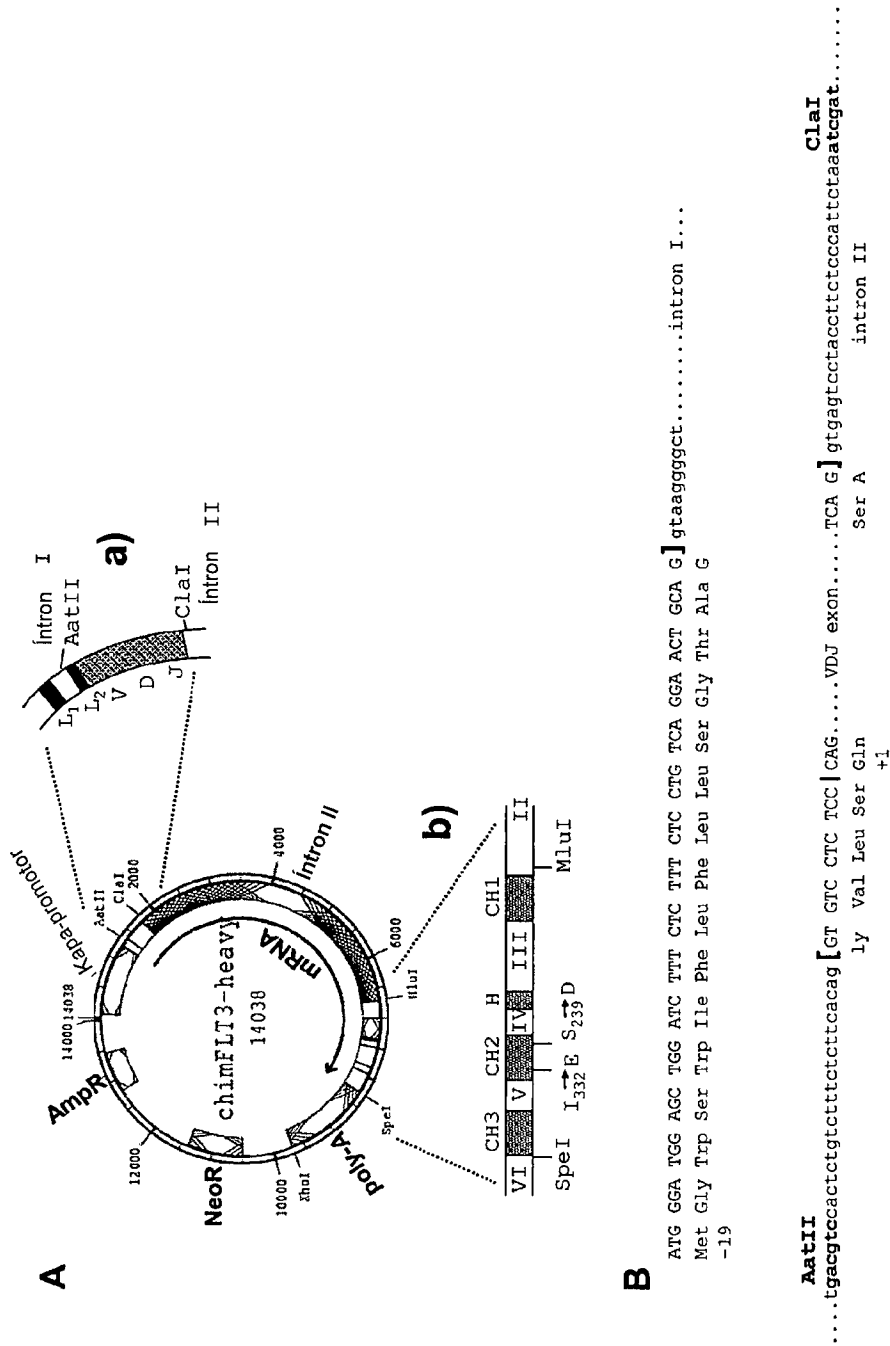


FIG. 4

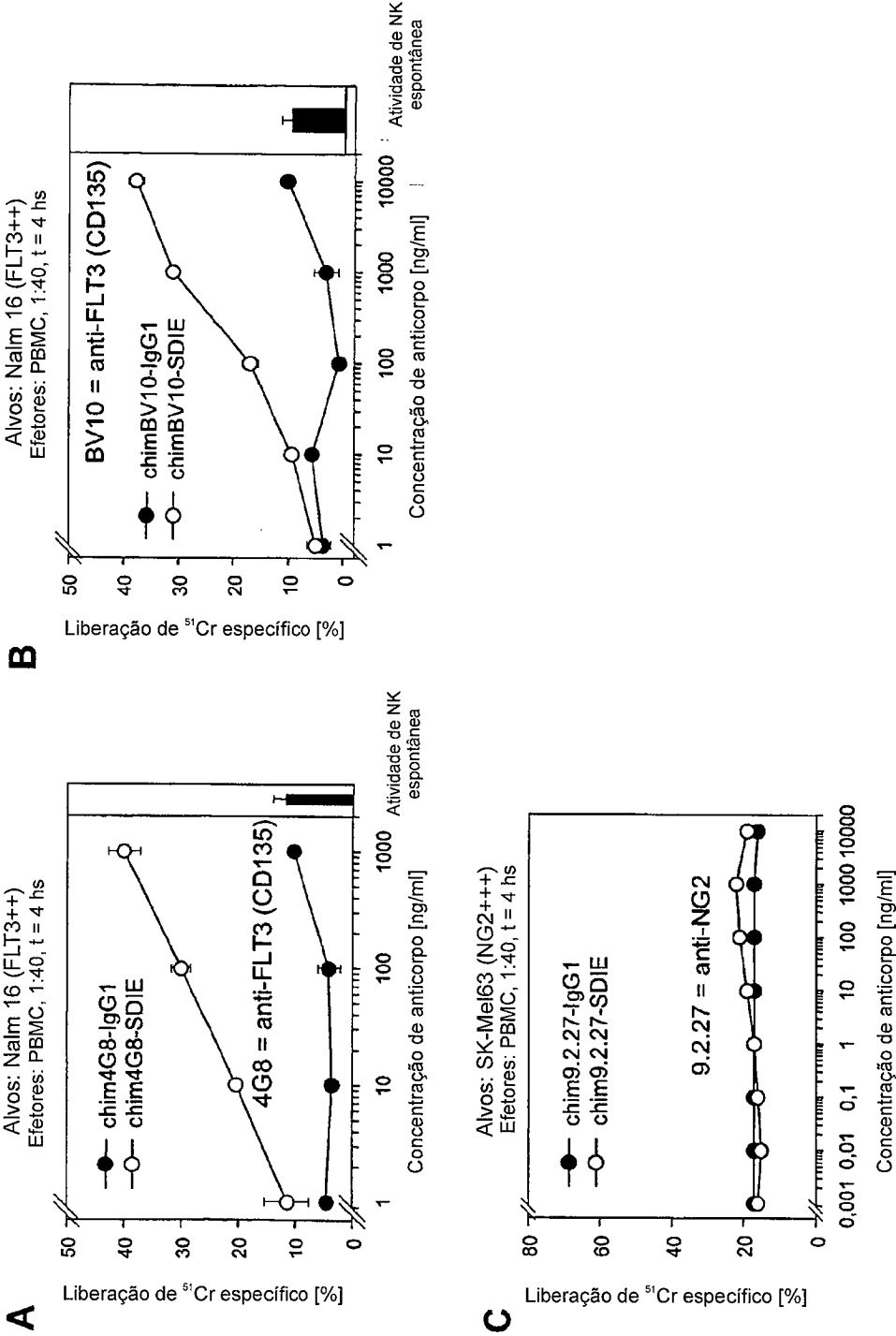
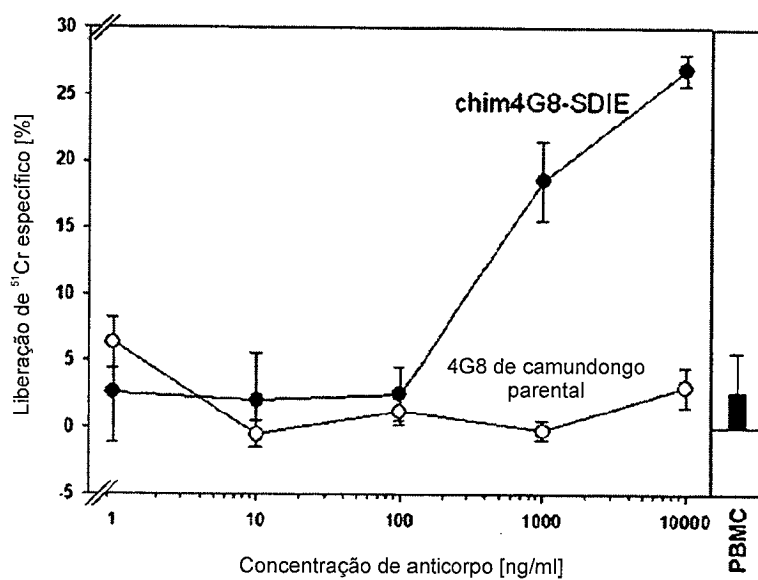


FIG. 5



Células alvo : AML SG3;  
E:T = 50:1  
T = 20 hrs

FIG. 6

A

	10	20	30	40	50	
4g8-vj	D I V L T Q S P	A T L S V T P G D S V S L S C R A S Q S I S N N	- - - -	L H W Y Q Q K S H E S P	44	
bv10-vj	D I V M T Q S P	S S L S V S A G E K V T M S C K S S Q S L L N S G N Q K N Y M A W Y Q Q K P G Q P P			50	
Consensus	D I V - T Q S P - - L S V - - G - - V - - S C - - S Q S - - N - - - - - - - - - - W Y Q Q K - - - - P				50	
	60	70	80	90	100	
4g8-vj	R L L I K Y A S	Q S I S G I P S R F S G S G S G T D F T L S I N S V E T E D F G V Y F C Q Q S N T W			94	
bv10-vj	K L L I Y G A S	T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A V Y Y C Q N D H S Y			100	
Consensus	- L L I - - A S - - - S G - P - R F - G S G S G T D F T L - I - S V - - E D - - V Y - C Q - - - - -				100	
	110					
4g8-vj	P Y T F G G G T K L E I K R					108
bv10-vj	P L T F G A G T K L E L K R					114
Consensus	P - T F G - G T K L E - R R					114

B

	10	20	30	40	50	
4g8-vdj	Q V Q L Q Q P G A E L V K P P G A S L K L S C K S S G Y T F T S Y W M H W V R Q R P G H G L E W I G E				50	
bv10-vdj	Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I T C T V S G F S L T I N Y G L H W V R Q S P G K G L E W L G V				50	
Consensus	Q V Q L - Q - G - - L V - P - - S L - - - C - - S G - - - T - Y - - H W V R Q - P G - G L E W - G -				50	
	60	70	80	90	100	
4g8-vdj	I D P S D S Y K D Y N Q K F K D K A T L I V D R S S N T A Y M H L S S L T S D D S A V Y Y C A R - -				98	
bv10-vdj	I W S G G S - T D Y N A A F I S R L S I S K D N S K S Q V S F R M N S S L Q A D D T A I Y Y C A R K G				99	
Consensus	I - - - - S - - D Y N - - F - - - - - - - - D - S - - - - - - - S L - - D D - A - Y Y C A R - -				100	
	110	120				
4g8-vdj	- - - - A I T T T P F D F W G Q G T T L T V S S				118	
bv10-vdj	G I Y Y A N H Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S				123	
Consensus	- - - - A - - - - - D - W G Q G T - - T V S S				124	

FIG. 7

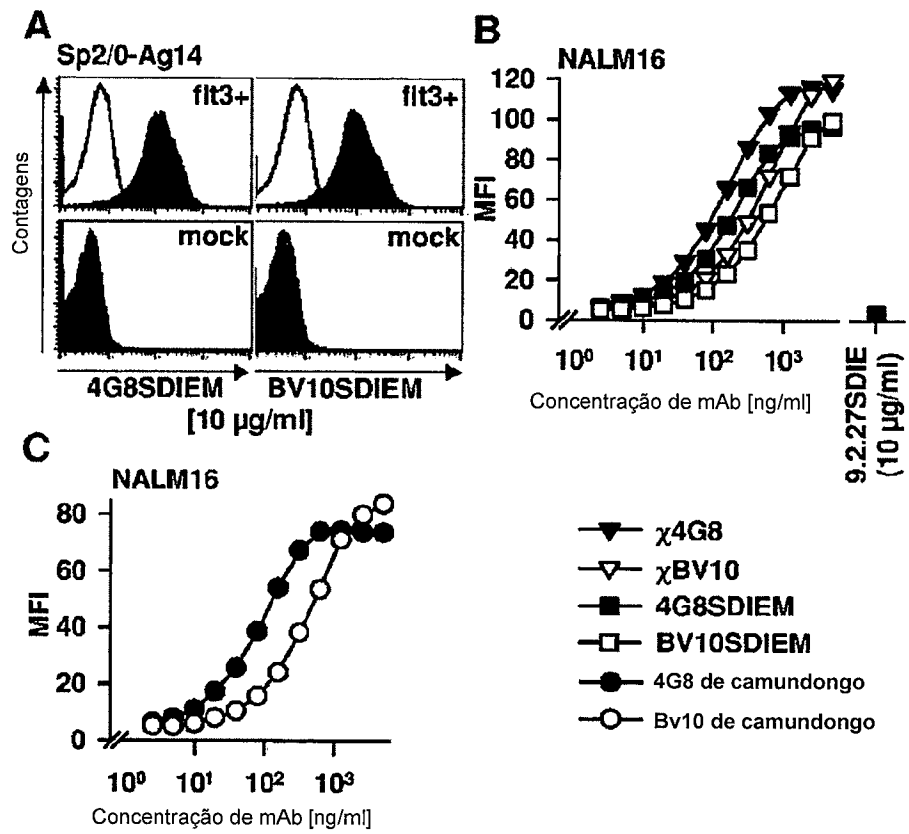
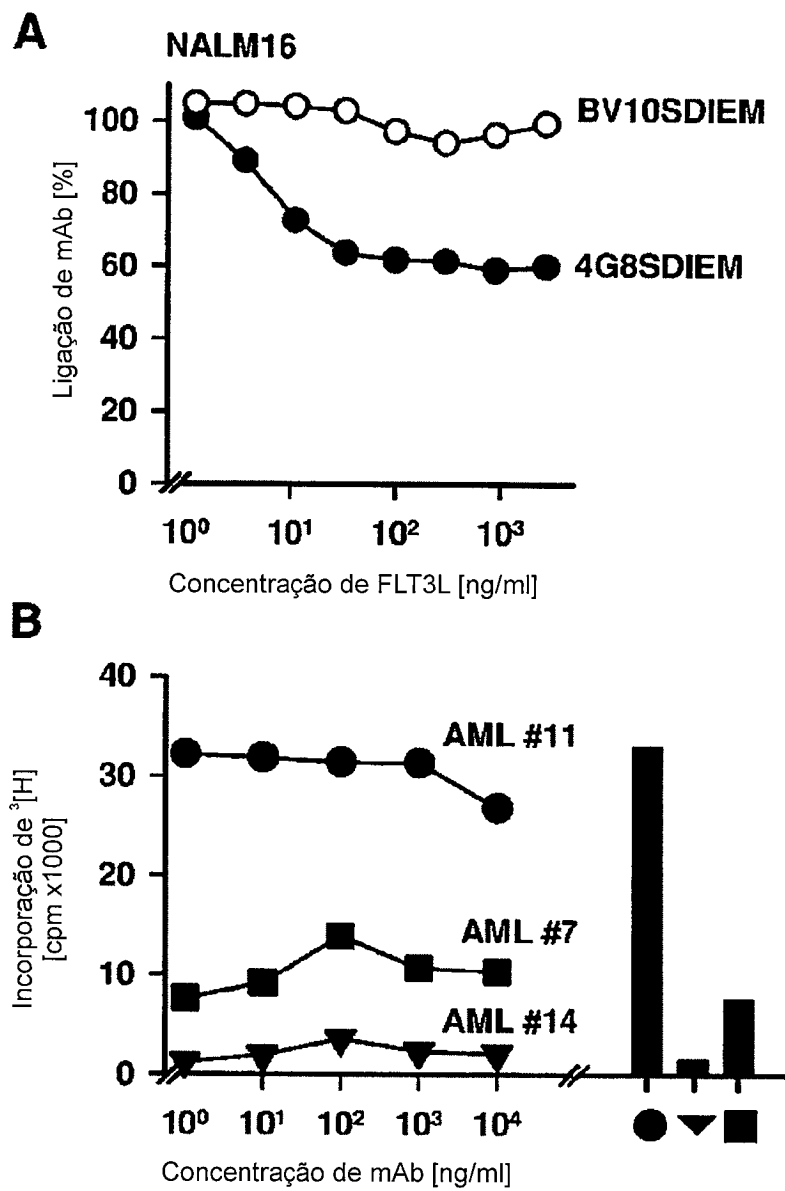




FIG. 8



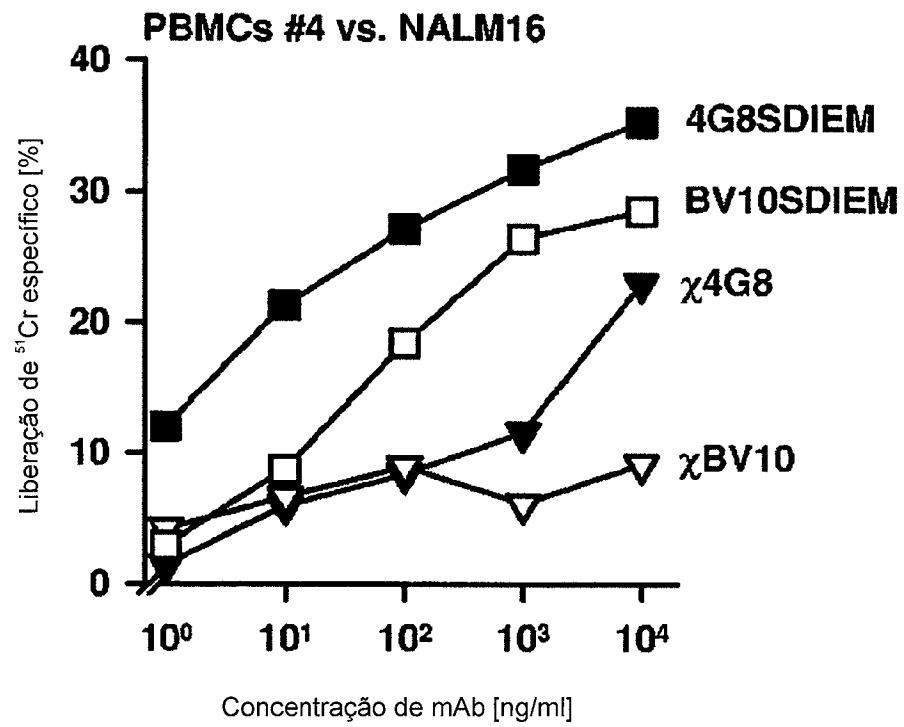


FIG. 9

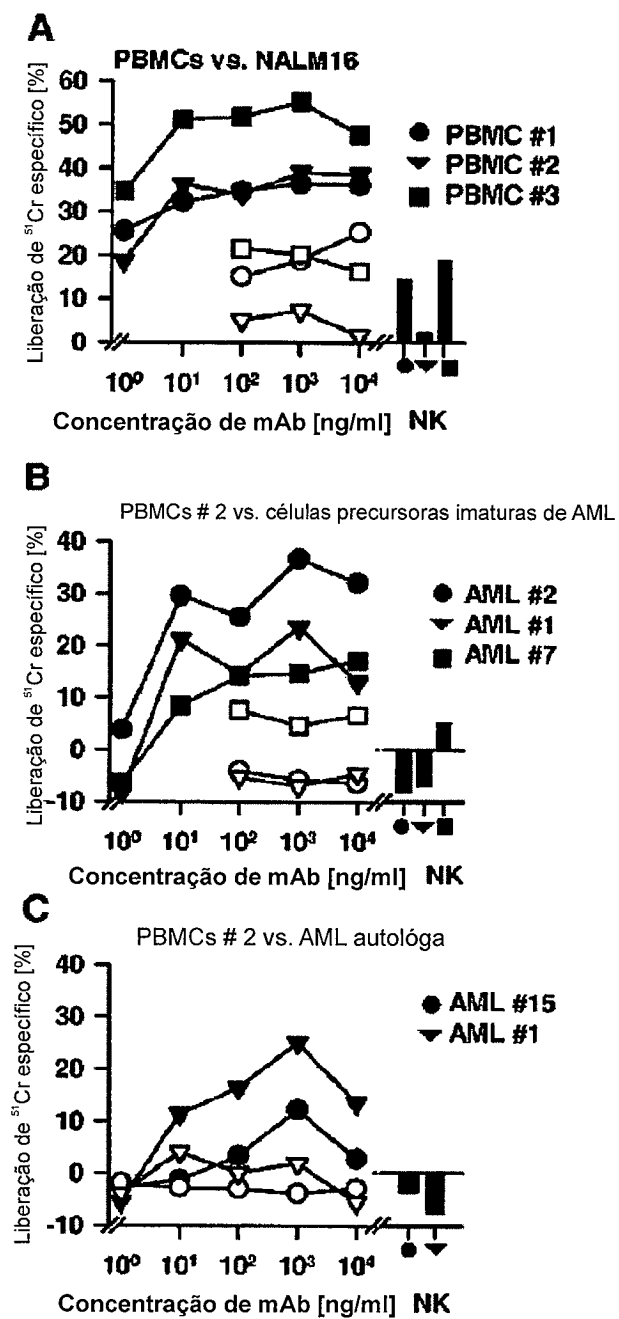


FIG. 10

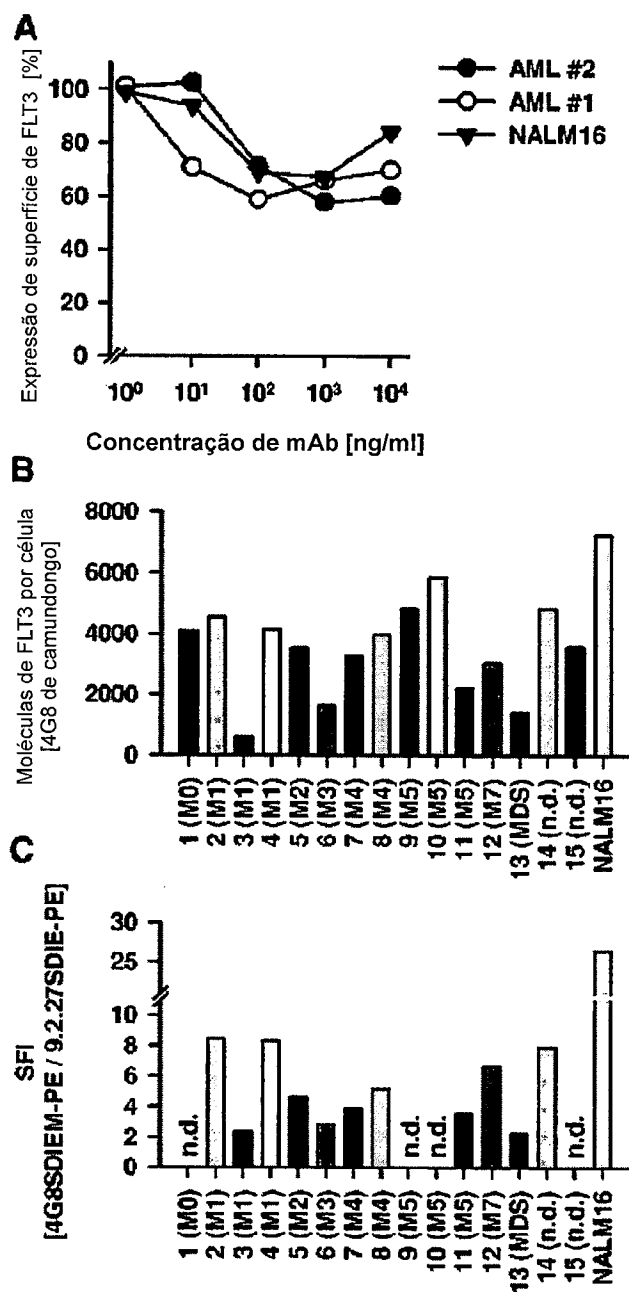


FIG. 11

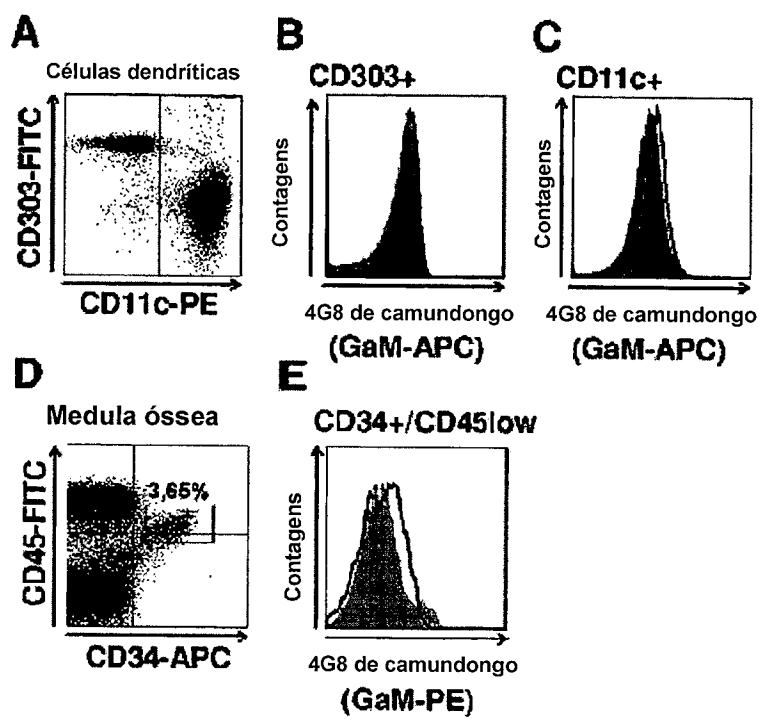


FIG. 12

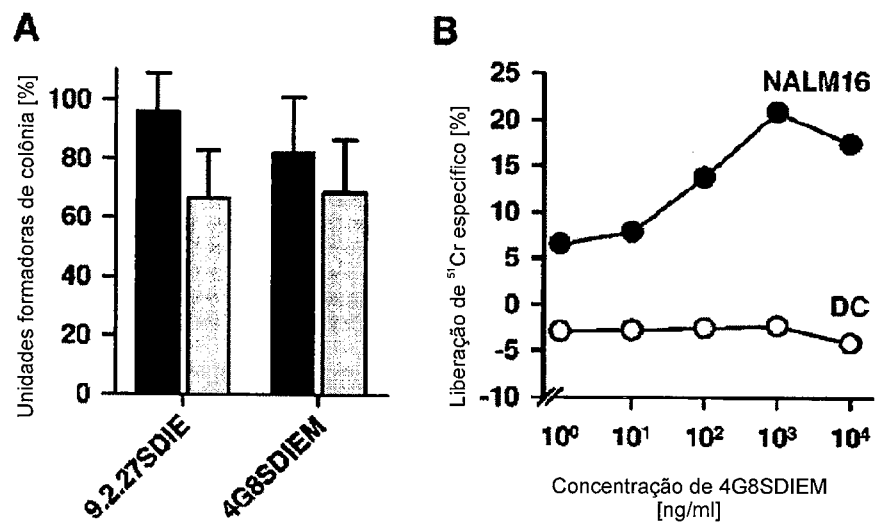


FIG. 13

FIG. 14

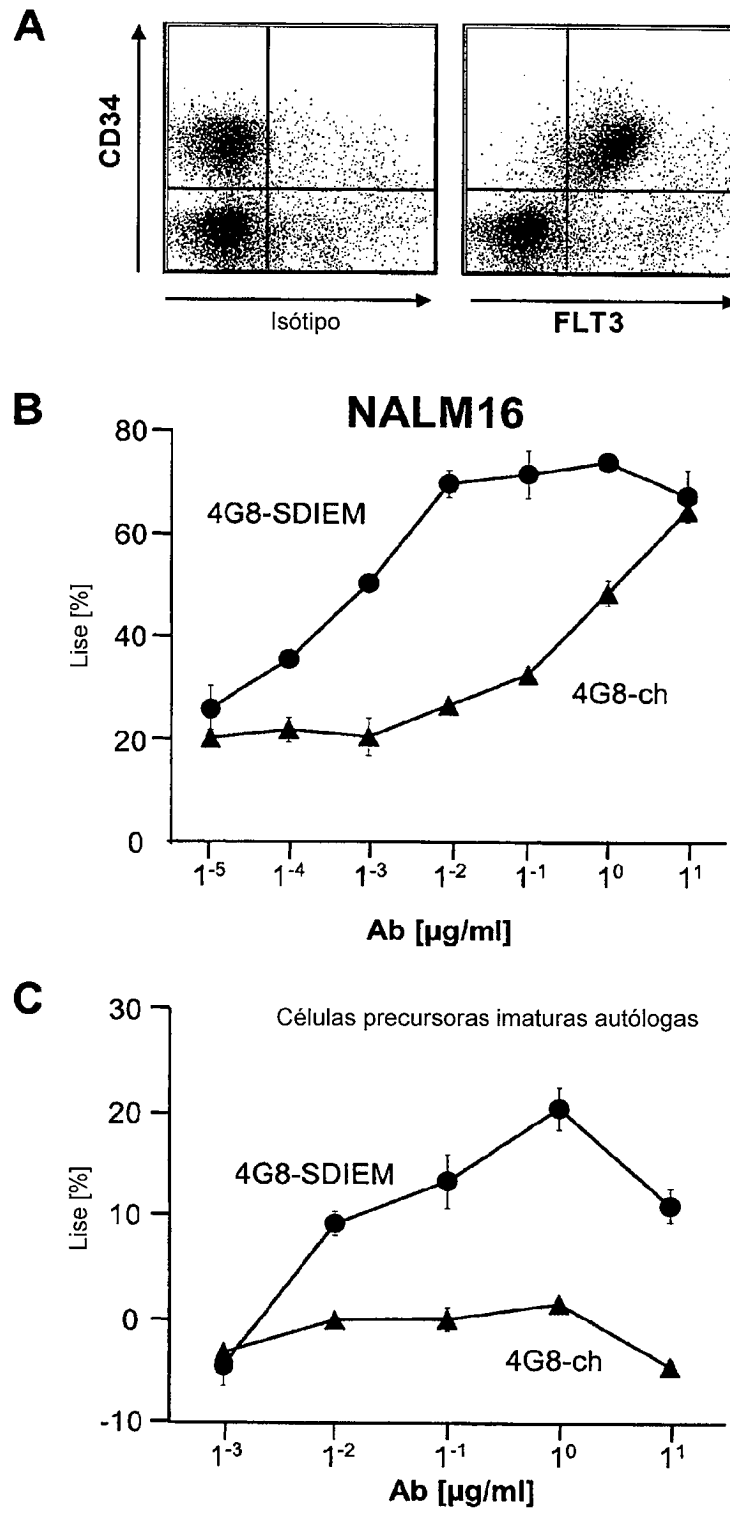


FIG. 15

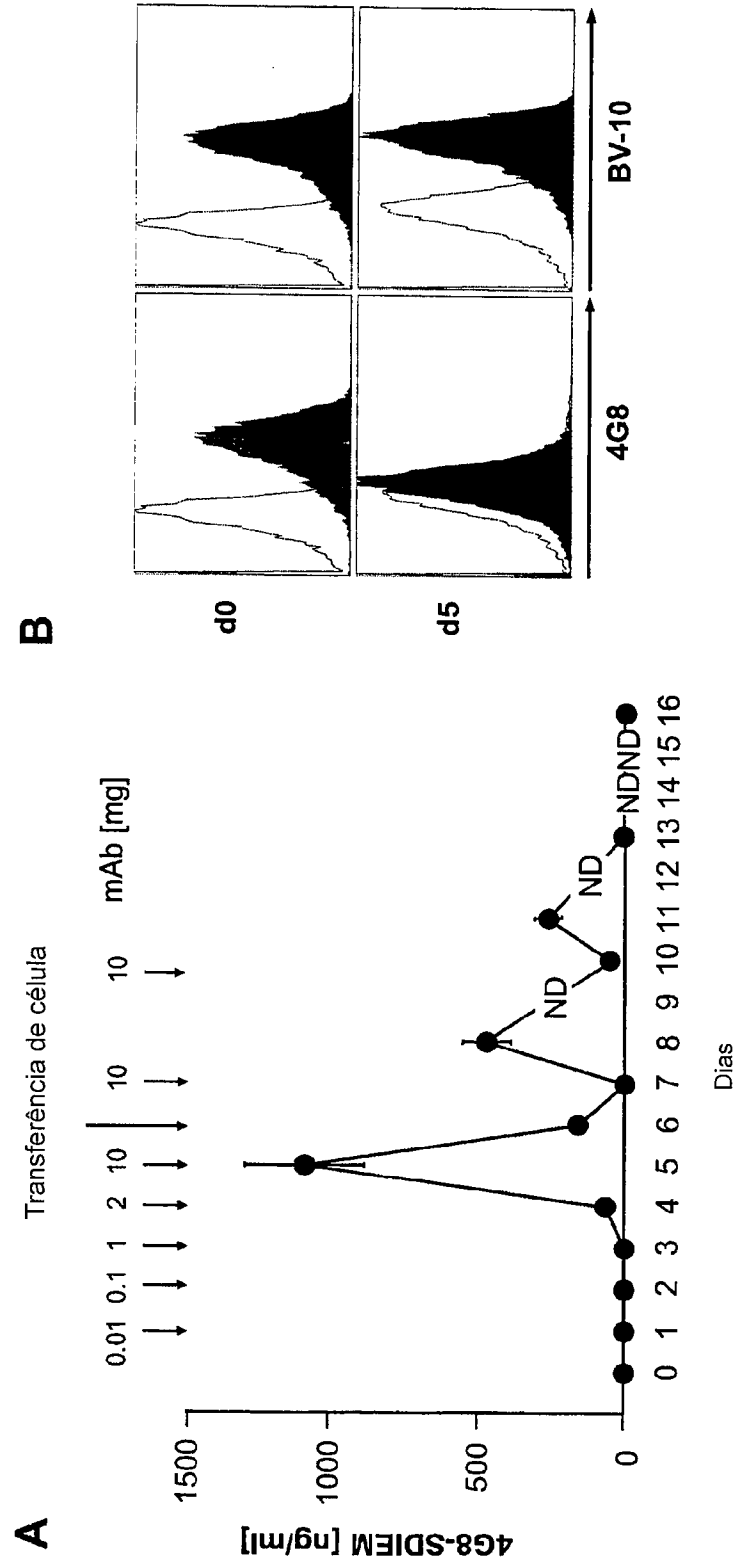




FIG. 16

