

(11) Número de Publicação: **PT 2342233 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/28 (2014.01) **A61P 35/00** (2014.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2009.10.01**

(30) Prioridade(s): **2008.10.01 EP 08305631**
2008.10.01 US 136772 P
2009.04.29 US 173743 P

(43) Data de publicação do pedido: **2011.07.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.06.25**
190/2014

(73) Titular(es):

PIERRE FABRE MEDICAMENT
45, PLACE ABEL GANGE 92100 BOULOGNE-
BILLANCOURT **FR**

(72) Inventor(es):

CHRISTINE KLINGUER-HAMOUR **FR**
VÉRONIQUE GRENIER-CAUSSANEL **FR**

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-CXCR4 E O USO DOS MESMOS PARA O TRATAMENTO DE CANCRO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM NOVO ANTICORPO ISOLADO, OU OS COMPOSTOS DERIVADOS OU FRAGMENTOS FUNCIONAIS DO MESMO, CAPAZ DE LIGAR À CXCR4, MAS TAMBÉM DE INDUZIR ALTERAÇÕES CONFORMACIONAIS DOS HOMODÍMEROS E/OU HETERODÍMEROS DE CXCR4. MAIS PARTICULARMENTE, A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE AOS ANTICORPOS 414H5 E 515H7, ESPECÍFICOS PARA AS PROTEÍNA CXCR4, ASSIM COMO SEU USO PARA O TRATAMENTO DE CANCRO. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE COMPREENDEM ESTES ANTICORPOS E UM PROCESSO PARA A SELEÇÃO DESTES ANTICORPOS TAMBÉM ESTÃO ABRANGIDOS.

RESUMO**"ANTICORPOS ANTI-CXCR4 E O USO DOS MESMOS PARA O TRATAMENTO
DE CANCRO"**

A presente invenção refere-se a um novo anticorpo isolado, ou os compostos derivados ou fragmentos funcionais do mesmo, capaz de ligar à CXCR4, mas também de induzir alterações conformacionais dos homodímeros e/ou heterodímeros de CXCR4. Mais particularmente, a presente invenção refere-se aos anticorpos 414H5 e 515H7, específicos para as proteína CXCR4, assim como seu uso para o tratamento de cancro. Composições farmacêuticas que compreendem estes anticorpos e um processo para a seleção destes anticorpos também estão abrangidos.

DESCRIÇÃO**"ANTI-CORPOS ANTI-CXCR4 E USO DOS MESMOS PARA O TRATAMENTO
DE CANCRO"**

A presente invenção refere-se a novos anticorpos, em particular, anticorpos monoclonais murinos, quiméricos e humanizados, capazes de se ligar especificamente a receptores de quimiocina (CXCR), assim como a sequências de aminoácido e ácidos nucleicos que codificam estes anticorpos. Em um aspecto, a invenção refere-se a novos anticorpos, compostos derivados ou fragmentos funcionais, capazes de se ligar especificamente a CXCR4 e que possuem fortes atividades antitumorais. A invenção compreende, também, o uso destes anticorpos como um fármaco para o tratamento preventivo e/ou terapêutico de cancro, assim como nos procedimentos ou kits relacionados ao diagnóstico de cancro. Por fim, a invenção compreende composições compreendendo tais anticorpos em combinação ou conjugação com outros compostos anticancro, como anticorpos, toxinas, agentes citotóxicos/citostáticos, e o uso dos mesmos para a prevenção e/ou tratamento de determinados cancros.

As quimiocinas são pequenos peptídeos secretados que controlam a migração de leucócitos ao longo de um gradiente químico de ligante, conhecido como gradiente de quimiocina, especificamente durante as reações imunes

(Zlotnick A. et al., 2000). Elas são divididas em duas grandes subfamílias, CC e CXC, com base na posição de seus resíduos de cisteína NH₂ terminais, e se ligam a receptores acoplados à proteína G, cujas duas principais famílias são designadas CCR e CXCR. Mais de 50 quimiocinas humanas e receptores 18 de quimiocina foram descobertos até o momento.

Muitos tipos de cancro possuem uma complexa rede de quimiocinas que influencia a infiltração de células imunes do tumor, assim como o crescimento, sobrevivência, migração e angiogéneses das células tumorais. As próprias células imunes, células endoteliais e células tumorais expressam receptores de quimiocina e podem responder a gradientes de quimiocina. Estudos de amostras de biópsia de cancro humano e modelos de cancro de ratinho mostram que a expressão do receptor de quimiocina na célula de cancro está associada a uma capacidade metastática aumentada. Células malignas de diferentes tipos de cancro possuem diferentes perfis de expressão de receptor de quimiocina, mas o receptor de quimiocina 4 (CXCR4) é o mais comumente encontrado. Células de pelo menos 23 tipos diferentes de cancros humanos de origem epitelial, mesenquimal e hematopoiética expressam o receptor CXCR4 (Balkwill F. et al., 2004). O receptor de quimiocina 4 (também conhecida como fusina, CD184, LESTR ou HUMSTR) existe como duas isoformas que compreendem 352 ou 360 aminoácidos. O resíduo Asn11 é glicosilado, o resíduo Tyr21 é modificado pela adição de um grupo sulfato e Cys 109 e 186 são ligados com

uma ligação de dissulfeto sobre a parte extracelular do receptor (Juarez J. et al, 2004).

Este receptor é expresso por diferentes tipos de tecidos normais, células T naïve não de memória, células T regulatórias, células B, neutrófilos, células endoteliais, monócitos primários, células dendríticas células natural killer, células-tronco hematopoiéticas CD34+ e em baixa quantidade no coração, cólon, fígado, rins e cérebro. O CXCR4 desempenha um papel chave no tráfego de leucócitos, linfopoiese de célula B e mielopoesse.

O receptor CXCR4 está superexpresso em um grande número de cancros incluindo, mas não se limitando a cólon (Ottaiano A. et al., 2004), mama (Kato M. et al., 2003), próstata (Sun Y.X. et al., 2003), pulmão [carcinoma de pequenas células e de células não pequenas (Phillips R.J. et al., 2003)], ovário (Scotton CJ. et al., 2002), pâncreas (Koshiba T. et al., 2000), rins, cérebro (Barbero S et al., 2002), glioblastoma e linfomas.

O único ligante do receptor CXCR4 descrito até o momento é o fator derivado de células do estroma-1 (SDF-1) ou CXCL12. O SDF-1 é secretado em grande quantidade nos nodo linfático, medula óssea, fígado, pulmão e em uma menor quantidade pelos rins, cérebro e pele. O CXCR4 também é reconhecido por uma quimiocina antagonista, a proteína inflamatória de macrófago viral II (vMIP-II) codificada pelo herpes vírus humano tipo III.

O eixo CXCR4/SDF-1 desempenha um papel chave no cancro e está implicado diretamente na migração e invasão que leva às metástases. De facto, as células de cancro expressam o receptor CXCR4, migram e entram na circulação sistêmica. Então, as células de cancro param nos leitos vasculares em órgãos que produzem altos teores de SDF-1 onde elas proliferam, induzem angiogénese e formam tumores metastáticos (Murphy PM., 2001). Este eixo também está envolvido na proliferação celular através da ativação da via de quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (Barbero S. et al., 2003) e angiogénese (Romagnani P., 2004). De facto, o receptor CXCR4 e seu ligante SDF-1 claramente promovem a angiogénese pela estimulação da expressão de VEGF-A que, por sua vez, aumenta a expressão de CXCR4/SDF-1 (Bachelder R.E. et al., 2002). É facto conhecido, ainda, que os macrófagos associados ao tumor (TAM) se acumulam em áreas hipóxicas dos tumores e são estimulados para cooperar com as células tumorais e promover angiogénesse. Foi observado que a hipoxia supra regulou seletivamente a expressão de CXCR4 em vários tipos celulares incluindo TAM (Mantovani A. et al, 2004). Recentemente foi demonstrado que o eixo CXCR4/SDF-1 regula o transporte/residência de células progenitoras/tronco hematopoiéticas (HSC) CXCR4+ e pode desempenhar um papel na neovascularização. Evidências indicam que além de HSC, CXCR4 funcional também está expresso em células-tronco de outros tecidos (células-tronco comprometidas com o tecido = TCSCs) de modo que SDF-1 pode desempenhar um papel central

na quimioatração de TCSCs CXCR4+ necessárias para regeneração de órgãos/tecidos, mas estas TCSC podem, também, ser uma origem celular de desenvolvimento de cancro (teoria de células-tronco cancerígenas). Uma origem de cancro a partir de células-tronco foi demonstrada para leucemia humana e recentemente para vários tumores sólidos como cérebro e mama. Há vários exemplos de tumores CXCR4+ que podem se originar das células-tronco CXCR4+ específicas de tecidos/órgãos normais, como leucemias, tumores cerebrais, cancro de pulmão de células pequenas, cancro de mama, hepatoblastoma, cancros de ovário e cervicais (Kucia M. et al., 2005).

O direcionamento de metástases tumorais pela interferência com o receptor CXCR4 foi demonstrado *in vivo* com o uso de um anticorpo monoclonal dirigido contra o receptor CXCR4 (Muller A. et al., 2001). Resumidamente, foi mostrado que um anticorpo monoclonal dirigido contra o receptor CXCR4 (Mab 173 R&D Systems) reduziu significativamente o número de metástases de linfonodos em um modelo de cancro de mama ortotópico (MDA-MB231) em ratinhos SCID. Outro estudo (Phillips R.J et al., 2003) também mostrou o papel crítico do eixo SDF-1/CXCR4 em metástases em um modelo de carcinoma de pulmão ortotópico (A549) com o uso de anticorpos policlonais contra SDF-1, mas neste estudo não houve efeito sobre o crescimento tumoral nem sobre a angiogénesse. Vários outros estudos também descreveram a inibição de metástases *in vivo* com o uso de duplexes de siRNAs de CXCR4 (Liang Z. et al., 2005),

antagonistas bioestáveis do peptídeo de CXCR4 (Tamamura H. et al., 2003) ou crescimento tumoral *in vivo* com o uso de um antagonista de pequena molécula de CXCR4, como AMD 3100 (Rubin J.B. et al., 2003; De Falco V. et al., 2007) ou Mab (patente WO2004/059285 A2). Desta forma, CXCR4 é um alvo terapêutico validado para cancros.

O receptor de quimiocina 2 (CXCR2), outro receptor de quimiocina, também é descrito como um alvo interessante na oncologia. De facto, o CXCR2 transmite um sinal de crescimento celular autócrino em vários tipos de células tumorais e pode também afetar o crescimento tumoral indiretamente pela promoção de angiogénese (Tanaka T. et al. 2005). O receptor de quimiocina CXCR2 possui 360 aminoácidos. Ele é expresso principalmente em células endoteliais e especialmente durante a neovascularização. Várias quimiocinas se ligam ao receptor CXCR2: CXCL5, -6, -7, IL-8, GRO- α , - β e - γ , que pertencem às quimiocinas pró-angiogénicas ERL+. O receptor CXCR2 compartilha homologias de sequência com o receptor CXCR4: 37% de identidade de sequência e 48% homologia de sequência. O eixo CXCR2/ligantes está envolvido em vários mecanismos de crescimento tumoral, como metástase (Singh RK. et al., 1994) proliferação celular (Owen J.D. et al., 1997) e na angiogénese mediada por quimiocinas ERL+ (Strieter R.M. et al., 2004; Romagnani et al., 2004). Por fim, os macrófagos e neutrófilos associados ao tumor são elementos chave do crescimento tumoral induzido por inflamação e quimiocinas, como CXCL5, IL-8 e GRO- α iniciam o recrutamento de neutrófilos.

A dimerização surgiu como um mecanismo comum para regular a função dos receptores acoplados à proteína G, e dentre estes estão os receptores de quimiocina (Wang J. e Norcross M., 2008). Foi mostrado que a homo e a heterodimerização em resposta à ligação de quimiocinas é necessária para o início e alteração da sinalização por inúmeros receptores de quimiocina. Evidências crescentes suportam o conceito de que dímeros ou oligômeros de receptores provavelmente são a unidade funcional básica dos receptores de quimiocina. Os dímeros do receptor de quimiocina são encontrados na ausência de ligantes e as quimiocinas induzem alterações conformacionais dos dímeros do receptor. Sabe-se que CXCR4 forma homodímeros e também heterodímeros, por exemplo, com o receptor de opioide δ (DOR) (Hereld D., 2008) ou CCR2 (Percherancier Y. et al., 2005). Neste último exemplo, peptídeos derivados dos domínios transmembrana de CXCR4 inibiram a ativação pelo bloqueio de transições conformacionais induzidas pelo ligante do dímero (Percherancier Y. et al., 2005). Outro estudo mostrou que peptídeo de CXCR4-TM4, um peptídeo sintético da região transmembrana de CXCR4, reduz a transferência de energia entre os protômeros de homodímeros de CXCR4 e inibe a migração induzida por SDF-1 e polimerização de actina em células malignas (Wang J. et al., 2006). Mais recentemente, também foi descrito que o CXCR7 formou heterodímeros funcionais com CXCR4 e aumentou a sinalização induzida por SDF-1 (Sierro F. et al., 2007). Outros exemplos de heterodímeros constitutivos incluem

estudos mostrando a interação de CXCR1 e CXCR2 e formação dos respectivos homodímeros. Nenhuma interação foi observada para qualquer um destes com outro GPCR (adrenoreceptor alfa(1A)), indicando a especificidade da interação de CXCR1 e CXCR2 (Wilson S. et al., 2005).

Conforme anteriormente mencionado, os receptores CXCR4 e CXCR2 são interessantes alvos para tumores. A interferência com estes receptores deve inibir o crescimento tumoral e metástases de uma forma muito eficaz pela redução da proliferação e angiogénesse da célula tumoral, migração e invasão celular tumoral, recrutamento de neutrófilos e macrófagos pelos tumores e pela inibição de células-tronco cancerígenas com CXCR4.

Um dos aspectos inventivos da presente invenção é gerar um anticorpo monoclonal de ratinho que induz alterações conformacionais dos dímeros de CXCR4. A invenção abrange um Mab 414H5 de CXCR4 (ou fragmentos do mesmo) capaz de se ligar e induzir alterações conformacionais de homodímeros de CXCR4 e de heterodímeros de CXCR4/CXCR2, e que tem fortes atividades antitumorais tanto em xenoenxerto de ratinhos quanto em modelos de sobrevivência. A invenção também abrange um Mab 515H7 CXCR4 (ou fragmentos do mesmo) capaz de se ligar e induzir alterações conformacionais de homodímeros de CXCR4 e de heterodímeros de CXCR4/CXCR2, e que tem fortes atividades antitumorais. Um Mab 414H5 anti-CXCR4 inibe o crescimento tumoral em modelo de xenoenxerto de MDA-MB-231 e aumenta a sobrevivência de ratinhos em um

modelo de U937. Eles induzem alterações conformatcionais em homodímeros de CXCR4, mas também em heterodímeros de CXCR4/CXCR2. Esta nova propriedade deve ser de interesse para aplicação em terapia do cancro devido aos importantes papéis destes dois receptores de quimiocina no cancro.

Foi observado que o direcionamento de homo e heterodímeros dos receptores aumenta o efeito terapêutico do Mab. De facto, demonstrou-se, por exemplo, que um Mab (h7C10) dirigido para receptores de IGF-IR e híbridos de insulina/IGF-1 foi mais potente em inibir o crescimento tumoral *in vivo* do que um Mab dirigido apenas para IGF-IR (Pandini G., 2007).

Além disso, os Mabs anti-CXCR4 414H5 e 515H7 são antagonistas silenciosos para CXCR4, eles não alteram o sinal basal em ensaios *in vitro*, mas inibem a sinalização induzida por SDF-1 em diferentes ensaios (ligação de GTP γ S, liberação de cAMP) e também são capazes de inibir a proliferação e migração de células tumorais induzida por SDF-1 *in vitro*.

As moléculas que atuam como agonistas parcial ou como agonistas inversos exibem atividade intrínseca na ausência de ligantes. Estes tipos de moléculas estabilizam, respectivamente, um estado de GPCR de alta afinidade ou de baixa afinidade, mesmo na ausência de ligante, ativando ou inibindo, assim, as cascatas de sinalização à jusante (Galandin *et al*, 2007; Kenakin, 2004).

No caso dos Mabs 414H5 e 515H7, estas moléculas se comportaram como antagonistas silenciosos, sem qualquer atividade intrínseca no receptor CXCR4 na ausência de SDF-1. Este aspecto farmacológico é provavelmente associado a menos efeitos colaterais adversos em comparação aos agonistas parciais ou inversos, como já observado para ligantes de receptor opioide (Bosier e Hermans, 2007). De facto, a atividade de funcional de ambos os Mabs 414H5 e 515H7 é totalmente dependente da presença de SDF-1 e nenhuma modulação da atividade do receptor CXCR4 será observada em tecidos e órgãos nos quais o ligante de SDF-1 não é expresso, secretado ou fornecido pela corrente sanguínea. Desta forma, os Mabs 414H5 e 515H7 são, provavelmente, menos tóxicos em comparação a outros ligantes do receptor CXCR4 com eficácia positiva ou negativa. Além disso, os antagonistas silenciosos são a espécie em minoria no espaço farmacológico (Wurch *et al.*, 1999, Kenakin, 2004).

Surpreendentemente, os inventores foram capazes de gerar, pela primeira vez, anticorpos capazes de fazer ligação a CXCR4, e também capazes de induzir alterações conformacionais dos homodímeros e/ou heterodímeros de CXCR4. Mais particularmente, os anticorpos da invenção são capazes de induzir alterações conformacionais dos homodímeros de CXCR4, e também dos heterodímeros de CXCR4/CXCR2.

Anticorpos dirigidos contra CXCR4 eram já conhecidos na técnica anterior (Carnec et al., J Virol, 79(3): 1930-1933, 2005; reevs et al., J Gen Virol., 79(Pt 7): 1793-1799, 1998; Ottaiano et al., Cancer Immunol Immunother. 54(8): 781-791, 2005; WO 04/059285). Mais especificamente, anticorpos com uma ligação a CXCR4 dependente da conformação foram já previamente divulgados (Baribaud et al., J. Virol., 75(19): 8957-8967, 2001). Contudo, estes anticorpos não foram referidos como sendo capazes de induzir uma alteração conformacional nos homodímeros e/ou heterodímeros de CXCR4.

No relatório descritivo a seguir, a expressão no plural "dímeros de CXCR4" deve ser compreendida como abrangendo os homodímeros de CXCR4 e também os heterodímeros de CXCR4/CXCR2.

Deve ser mencionado neste estágio, que estes anticorpos nunca foram descritos na técnica anterior. Além disso, deve ser mencionado que a existência de heterodímeros de CXCR4/CXCR2 nunca foi descrita.

Uma parte da invenção é a observação da existência de um heterodímero formado por CXCR4 e CXCR2.

Então, em um aspecto particular, a presente invenção se refere a um complexo isolado que comprehende ou que consiste em heterodímero de CXCR4/CXCR2.

De preferência, a parte do composto de CXCR4 do dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2 é uma das duas isoformas humanas de CXCR4 selecionada do grupo que consiste em:

- isoforma b do receptor de quimiocina 4 (motivo C-X-C) [Homo sapiens] que tem a sequência mostrada no número de n° de acesso do Genbank NP_003458, SEQ ID No. 29:

MEGISIYTSNDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREEANFNKIFLPTIYSHFLTGIVGN
GLVILVMGYQKKLRSMTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFL
CKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRLAIHVATNSQRPRKLLAEKVVYVGWV
PALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFHIMVGLILPGIVLSC
YCHIISKLHSKGHQKRKALKTTVILAFFACWLPPYYIGISIDSFILEIKQGCEFE
NTVHKWISITEALAFFHCCLNPILY AFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKG
KRGGHSSVSTESESSSFHSS;

- a isoforma a do receptor de quimiocina 4 (motivo C-X-C) [Homo sapiens] que tem a sequência mostrada sob o número de n° de acesso do Genbank NP_001008540, SEQ ID No. 30:

MSIPLPLLQIYTSNDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREEANFNKIFLPTIYSHFLTG
VGNGLVLVMGYQKKLRSMTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFG
NFLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRLAIHVATNSQRPRKLLAEKVVYVG
VWIPALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFHIMVGLILPGIVI
LSCYCIIHSKLSKGHQKRKALKTTVILAFFACWLPPYYIGISIDSFILEIKQGC
EFENTVHKWISITEALAFFHCCLNPILY AFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILS
KGKRGGHSSVSTESESSSFHSS;

- uma variante de splicing alternativo transcricional ou uma variante natural do mesmo, que possui pelo menos

95% de identidade a uma destas isoformas b ou a que possui a SEQ ID No. 29 ou 30; e

- um fragmento da mesma capaz de ser reconhecido especificamente pelo seu ligante natural, fator derivado de célula do estroma-1 (SDF-1), e que tem, de preferência, pelo menos 100, 150 e 200 aminoácidos de comprimento.

De preferência, a parte do composto de CXCR2 do dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2 é selecionada do grupo que consiste em:

- o receptor beta de interleucina 8 [Homo sapiens] que tem a sequência mostrada no número de nº de acesso do Genbank NP_001548, SEQ ID No. 31:

MEDFNMESDSFEDFWKGEDI.SNYSYSSTLPPFLDAAPCEPESLEINKYFVVIIY
ALVFLLSLLGNSLVMLVILYSRVRGSVTDVYLLNLALADLLFALTLPWAASKV
NGWIPGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATRTLTQKRYLVKF
ICLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNNTANWRMLLRILPQSF
GFIVPLLIMLFCYGFTLRTLFKAHMGQKRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLL
ADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLIYAFIQQKFRHGLIKI
LAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHTSTTL;

- uma variante de splicing alternativo transcricional ou uma variante natural do mesmo, que tem pelo menos 95% de identidade com este receptor beta de interleucina 8 que tem a SEQ ID No. 31; e

- um fragmento do mesmo capaz de ser reconhecido especificamente pela IL-8 e que tem, de preferência,

pelo menos 100, 150 e 200 aminoácidos de comprimento. Neste aspecto particular, a presente invenção comprehende, também, um RNA ou DNA isolado que codifica um polipeptídeo que comprehende o dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2.

Esta invenção comprehende, adicionalmente, um construto de ácido nucleico, de preferência, um vetor de expressão, tal como um plasmídeo, que codifica o dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2.

A invenção comprehende, adicionalmente, uma composição que comprehende pelo menos um construto de ácido nucleico, de preferência, um vetor de expressão, tal como um plasmídeo, que codifica a parte CXCR4 do dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2, e um segundo construto, de preferência, um vetor de expressão, tal como um plasmídeo, que codifica a parte CXCR2 do dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2.

Neste aspecto, a invenção comprehende, adicionalmente, um método para a preparação de uma célula hospedeira recombinante que expressa o dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2, em que este método comprehende uma etapa de transformar a dita célula hospedeira:

- a) com um construto de ácido nucleico, de preferência, um vetor de expressão, tal como um plasmídeo, que codifica o dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2;

ou

b) com pelo menos um construto de ácido nucleico, de preferência, um vetor de expressão, tal como um plasmídeo, que codifica a parte CXCR4 do dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2, e um segundo construto, de preferência, um vetor de expressão, tal como um plasmídeo, que codifica a parte CXCR2 do dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2.

Em uma modalidade preferencial, a dita célula hospedeira é uma célula eucariótica, tal como uma célula de mamífero.

Em uma modalidade preferencial, o(s) construto(s) de ácido nucleico que codifica(m) o dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2 codifica(m) também um primeiro marcador que está associado (particularmente por ligação covalente) com a sequência de CXCR4, tal como o marcador luc, e um segundo marcador que está associado (particularmente por ligação covalente) com a sequência de CXCR2, tal como o marcador de GFP (isto é, para análise de BRET).

É também revelado um método para a seleção de um composto que tem atividade anticancro ou que pode ser usado para a preparação de uma composição para o tratamento de cancro, compreendendo o dito método a etapa de:

a) colocar a célula hospedeira recombinante da presente

invenção que expressa o dito complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2, em contato com o composto a ser testado; e b) determinar se este composto é capaz de modular, de preferência, inibir a atividade deste complexo heterodimérico de CXCR4/CXCR2 na célula hospedeira recombinante.

Em um primeiro aspecto, um objetivo da presente invenção é um processo para a geração e seleção dos anticorpos de acordo com a invenção.

Mais particularmente, a invenção se refere a um processo para a seleção de um anticorpo anti-CXCR4, ou um de seus fragmentos funcionais ou derivados, capazes de inibir a ativação dependente do ligante e a ativação independente do ligante de CXCR4, o dito processo compreendendo as seguintes etapas:

- i) fazer uma triagem dos anticorpos gerados e selecionar os anticorpos capazes de ligar especificamente a CXCR4 e também modular a ativação de CXCR4;
- ii) testar os anticorpos selecionados na etapa i) e selecionar os anticorpos capazes de induzir alteração conformacional dos homodímeros de CXCR4, e então
- iii) testar os anticorpos selecionados na etapa i) e selecionar os anticorpos capazes de induzir alteração conformacional dos homodímeros de CXCR4.

A expressão "modular", deve ser compreendida como um aumento ou uma inibição. De preferência, os anticorpos selecionados da invenção devem inibir a ativação de CXCR4.

Conforme explicado anteriormente, a indução de alterações conformacionais dos dímeros de CXCR4 é um aspecto importante da invenção, uma vez que estes anticorpos apresentarão um real interesse para uma população maior de pacientes.

A geração do anticorpo pode ser feita através de qualquer método conhecido por um versado na técnica como, por exemplo, fusão de uma célula de mieloma com células de baço de ratinhos imunizados ou outras espécies compatíveis com as células de mieloma selecionadas [Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497]. Os animais imunizados podem incluir ratinhos transgênicos com loci de imunoglobulina humana que, então, produzem anticorpos humanos diretamente. Outra modalidade possível pode consistir em uso de tecnologias de apresentação em fago para a triagem de bibliotecas.

A etapa de triagem i) pode ser feita por qualquer método ou processo conhecido pelo versado na técnica. Como exemplos não restritivos, pode-se mencionar ELISA, BIACore, imunoistoquímica , análise de FACS e triagens funcionais. Um processo preferencial consiste em uma triagem por análise de FACS do transfetante de CXCR4 e de pelo menos uma linhagem celular tumoral para se certificar de que os

anticorpos produzidos serão capazes de reconhecer também o receptor nativo sobre células tumorais. Este processo será descrito mais precisamente nos exemplos a seguir.

A expressão "modular a ativação de CXCR4" se destina a modular pelo uma das atividades mostradas nos exemplos 4, 5, 7 e 13 abaixo.

De preferência, modular:

- A ligação específica nas membranas celulares do SDF-1 ligante sobre o receptor CXCR4 (vide Exemplo 4), particularmente, por competição sobre a membrana da célula eucariótica transformada, tais como membranas de CHO-K1, expressando de maneira estável o receptor CXCR4 humano selvagem;
- A ligação específica nas membranas celulares do GTP γ S no receptor CXCR4 (vide Exemplo 5), particularmente, sobre a membrana de células eucarióticas transformadas, tais como células NIH-3T3, expressando de maneira estável e constitutiva as membranas do receptor CXCR4 selvagem;
- A inibição mediada por CXCR4 da produção de cAMP (vide Exemplo 7); e
- A mobilização mediada pelo receptor CXCR4 dos estoques de cálcio intracelular (vide Exemplo 13).

Com mais preferência, esta modulação de pelo menos uma destas atividades é uma inibição da atividade.

Em uma modalidade preferencial das etapas ii) e iii) de seleção do processo da invenção, as ditas etapas ii) e iii) consistem em avaliação dos anticorpos por análise BRET sobre células que expressam CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP e CXCR4-Rluc/CXCR2-YFP, respectivamente, e seleção de anticorpos capazes de inibir pelo menos 40%, de preferência, 45 %, 50 %, 55 % e, com a máxima preferência, 60% do sinal de BRET.

A tecnologia BRET é uma tecnologia conhecida como sendo representativa da dimerização de proteína [Angers et al, PNAS, 2000, 97:3684-89].

A tecnologia BRET, usada nas etapas ii) e iii) do processo, é bem conhecida pelo versado na técnica e será detalhada nos exemplos a seguir. Mais particularmente, BRET (Bio luminescence Resonance Energy Transfer) é uma transferência de energia não radiativa que ocorre entre um doador bioluminescente (*Renilla Luciferase* (Rluc)) e um acceptor fluorescente, um mutante de GFP (proteína verde fluorescente) ou YFP (proteína amarela fluorescente). No presente caso, EYFP (proteína amarela fluorescente intensificada) foi usada. A eficácia da transferência depende da orientação e da distância entre o doador e o acceptor. Então, a transferência de energia só pode ocorrer se as duas moléculas estiverem próximas (1 a 10 nm). Esta propriedade é usada para gerar ensaios de interação proteína- proteína. De facto, de modo a estudar a interação

entre os dois parceiros, o primeiro é fundido geneticamente à luciferase de Renilla e o segundo ao mutante amarelo da GFP. As proteínas de fusão são geralmente, mas não obrigatoriamente, expressas em células de mamífero. Na presença de seu substrato de membrana permeável (coelenterazina), a Rluc emite luz azul. Se o mutante de GFP estiver mais perto do que 10 nm da Rluc, pode ocorrer uma transferência de energia e um sinal amarelo adicional pode ser detectado. O sinal de BRET é medido como a razão entre a luz emitida pelo acceptor e a luz emitida pelo doador. Desta forma, o sinal de BRET aumentará conforme as duas proteínas de fusão forem colocadas em proximidade ou se uma alteração conformacional colocar os mutantes de Rluc e GFP mais próximos.

Se a análise BRET consistir em uma modalidade preferencial, qualquer método conhecido pelo versado na técnica pode ser usado para medir as alterações conformacionais dos dímeros de CXCR4. Sem limitação, as seguintes tecnologias podem ser mencionadas: FRET (transferência de energia de ressonância por fluorescência [Fluorescence Resonance Energy Transfer]), HTRF (fluorescência homogênea resolvida no tempo [Homogenous Time resolved Fluorescence]), FLIM (microscopia de fluorescência de formação de imagens ao longo do tempo de vida [Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy]) ou SW-FCCS (espectroscopia de fluorescência de correlação cruzada ao comprimento de onda único [single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy]).

Outras tecnologias clássicas também podem ser usadas, como coimunoprecipitação, AlphaScreen, reticulação química, Duplo-híbrido, cromatografia de afinidade, ELISA ou Far-Western Blotting.

Em um aspecto particular do processo de acordo com a invenção, a etapa ii) consiste em avaliar os anticorpos por análise BRET sobre células que expressam CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP e selecionar anticorpos capazes de inibir pelo menos 40% do sinal do BRET.

Em um outro aspecto particular do processo de acordo com a invenção, a etapa iii) consiste em avaliar os anticorpos por análise BRET em células que expressam CXCR4-RLuc/CXCR2-YFP e selecionar anticorpos capazes de inibir pelo menos 40% do sinal de BRET.

Em um segundo aspecto, um objeto da invenção é um anticorpo isolado, ou um de seus fragmentos funcionais ou derivados, que é obtido pelo dito processo. O dito anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados, é capaz de se ligar especificamente a CXCR4 humano e, se necessário, de preferência, também é capaz de inibir a ligação natural de seu ligante, o dito anticorpo sendo também capaz de induzir alterações conformacionais de dímeros de CXCR4.

As expressões "fragmentos funcionais e derivados"

será definida em detalhes posteriormente no presente relatório descritivo.

Deve ser compreendido que a invenção não se refere aos anticorpos na forma natural, isto quer dizer, eles não estão no seu ambiente natural, mas eles foram capazes de serem isolados ou obtidos por purificação a partir de fontes naturais, ou ainda obtidos por recombinação genética, ou por síntese química, e que eles podem, então, conter aminoácidos não naturais, conforme será descrito posteriormente.

Mais particularmente, de acordo com um outro aspecto da invenção, é descrito um anticorpo, ou um de seus fragmentos funcionais ou derivados, o dito anticorpo sendo caracterizado pelo facto de que comprehende pelo menos uma região determinante de complementaridade, CDR, escolhida a partir de CDRs que comprehendem as sequência de aminoácido SEQ ID Nos. 1 to 12.

Mais particularmente, de acordo com um outro aspecto da invenção, reivindica-se um anticorpo, ou um de seus fragmentos funcionais ou derivados, o dito anticorpo sendo caracterizado pelo facto de que comprehende pelo menos uma região determinante de complementaridade, CDR, escolhida a partir de CDRs que comprehendem as sequência de aminoácido SEQ ID Nos. 2, 5 ou 40 a 49.

De acordo com um primeiro aspecto, a invenção

refere-se a um anticorpo isolado, ou um composto derivado ou fragmento funcional do mesmo, que comprehende pelo menos uma CDR escolhida dentre as CDRs das sequências SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ou pelo menos uma CDR cuja sequência tem pelo menos 80%, de preferência, 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

De acordo com um outro aspecto, a invenção se refere a um anticorpo isolado, ou um composto derivado ou fragmento funcional do mesmo, que comprehende pelo menos uma CDR escolhida dentre as CDRs das sequências SEQ ID Nos. 40, 2, 41, 42, 5 ou 43 ou pelo menos uma CDR cuja sequência tem pelo menos 80%, de preferência, 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID Nos. 40, 2, 41, 42, 5 ou 43.

Um "fragmento funcional" de um anticorpo significa, em particular, um fragmento de anticorpo, como fragmentos Fv, scFv (sc=cadeia única), Fab, F(ab')2, Fab', scFv-Fc ou diacorpos, ou qualquer fragmento cuja meia-vida tenha sido aumentada. Estes fragmentos funcionais serão descritos em detalhes posteriormente na presente descrição.

Um "composto derivado" ou "derivado" de um anticorpo significa, em particular, uma proteína de ligação composta de uma estrutura de peptídeo e pelo menos uma das CDRs do anticorpo original de modo a preservar sua capacidade de reconhecer CXCR4. Estes compostos derivados,

bem conhecidos de um versado na técnica, serão descritos em detalhes posteriormente na presente descrição.

Com mais preferência, a invenção compreende os anticorpos, seus compostos derivados ou seus fragmentos funcionais, de acordo com a presente invenção, nomeadamente quiméricos ou humanizados, obtidos por recombinação genética ou síntese química.

De acordo com uma modalidade preferencial, o anticorpo de acordo com a invenção, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, é caracterizado pelo facto de consistir em um anticorpo monoclonal.

"Anticorpo monoclonal" é compreendido como significando um anticorpo originado a partir de uma população quase homogênea de anticorpos. Mais particularmente, os anticorpos individuais de uma população são idênticos, com a exceção de algumas possíveis mutações de ocorrência natural que podem ser encontradas em proporções mínimas. Em outras palavras, um anticorpo monoclonal consiste em um anticorpo homogêneo que se origina do crescimento de um único clone de célula (por exemplo, um hibridoma, uma célula hospedeira eucariótica transfetada com uma molécula de DNA que codifica o anticorpo homogêneo, uma célula hospedeira procariótica transfetada com uma molécula de DNA que codifica o anticorpo homogêneo, etc.) e é caracterizado, geralmente, por cadeias pesadas de uma e apenas uma classe e subclasse,

e cadeia leve de apenas um tipo. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos e são direcionados contra um único抗原. Além disso, ao contrário das preparações de anticorpos policlonais que incluem tipicamente vários anticorpos dirigidos contra vários determinantes, ou epitopos, cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único epitopo do抗原.

Mais particularmente, o anticorpo, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, é caracterizado por compreender uma cadeia leve que compreende pelo menos uma CDR escolhida dentre as CDRs das sequências de aminoácido SEQ ID No. 1, 2 ou 3, ou pelo menos uma CDR cuja sequência tem pelo menos 80%, de preferência 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID No. 1, 2 ou 3; ou ele compreende uma cadeia pesada que compreende pelo menos uma CDR escolhida dentre as CDRs das sequências de aminoácido SEQ ID Nos. 4, 5 ou 6, ou pelo menos uma CDR cuja sequência tem pelo menos 80%, de preferência 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID Nos. 4, 5 ou 6.

De acordo com outra modalidade, os anticorpos da invenção, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia leve que compreende pelo menos uma das três CDRs das sequências SEQ ID No. 1, 2 ou 3, ou pelo menos uma sequência com pelo menos 80%, de preferência 85%,

90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID Nos. 1, 2 ou 3.

Em uma forma preferencial, os anticorpos da invenção, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia leve que comprehende as três seguintes CDRs, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, sendo que:

- a CDR-L1 comprehende a sequência SEQ ID No. 1 ou 9, ou uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID No. 1 ou 9;
- a CDR-L2 comprehende a sequência SEQ ID No. 2 ou 10, ou uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID No. 2 ou 10;
- a CDR-L3 comprehende a sequência SEQ ID No. 3, ou uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID No. 3.

De acordo com uma modalidade particular, os anticorpos, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia leve que comprehende a CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 1, a CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 2 e a CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 3.

De acordo com outra modalidade particular, os anticorpos, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos

funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia leve que compreende a CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 9, a CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 10 e a CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 3.

Mais particularmente, os anticorpos da invenção, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia pesada que compreende pelo menos uma de três CDRs das sequências SEQ ID Nos. 4, 5 ou 6, ou pelo menos uma sequência com pelo menos 80%, de preferência, 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID Nos. 4, 5 ou 6.

Com mais preferência ainda, os anticorpos da invenção, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia pesada comprendendo as três seguintes CDRs, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, em que:

- a CDR-H1 compreende a sequência SEQ ID Nos. 4, 7 ou 11, ou uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID Nos. 4, 7 ou 11;
- a CDR-H2 compreende a sequência SEQ ID Nos. 5 ou 12, ou uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID No. 5 ou 12; e
- a CDR-H3 compreende a sequência SEQ ID No. 6 ou 8, ou

uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID No. 6 ou 8.

De acordo com outra modalidade particular, os anticorpos, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia pesada que compreende a CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 7, a CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 5 e a CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 8.

De acordo com outra modalidade particular, os anticorpos, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia pesada compreendendo a CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 11, a CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 12 e a CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 6.

Mais particularmente, o anticorpo, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, é caracterizado pelo facto de que ele compreende uma cadeia leve que compreende pelo menos uma CDR escolhida dentre as CDRs das sequências de aminoácido SEQ ID Nos. 40, 2 ou 41 ou pelo menos uma CDR cuja sequência tem pelo menos 80%, de preferência 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID No. 40, 2 ou 41; ou ele compreende uma cadeia pesada que compreende pelo menos uma CDR escolhida dentre as CDRs das sequências de aminoácido SEQ ID Nos. 42, 5 ou 43, ou pelo menos uma CDR cuja sequência tem pelo menos 80%, de preferência, 85%,

90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID Nos. 42, 5 ou 43.

De acordo com outra modalidade, os anticorpos da invenção, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia leve que compreende pelo menos uma das três CDRs das sequências SEQ ID Nos. 40, 2 ou 41, ou pelo menos uma sequência com pelo menos 80%, de preferência, 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID Nos. 40, 2 ou 41.

De uma forma preferencial, os anticorpos da invenção, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia leve que compreende as três seguintes CDRs, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, em que:

- a CDR-L1 compreende as sequências SEQ ID No. 40 ou 46, ou uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID No. 40 ou 46;
- a CDR-L2 compreende as sequências SEQ ID No. 2 ou 47, ou uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID No. 2 ou 47; e
- a CDR-L3 compreende a sequência SEQ ID No. 41, ou uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID No 41.

De acordo com uma modalidade particular, os anticorpos, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia leve que comprehende a CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 40, a CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 2 e a CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 41.

De acordo com outra modalidade particular, os anticorpos, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia leve que comprehende a CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 46, a CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 47 e a CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 41.

Mais particularmente, os anticorpos, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia pesada que comprehende pelo menos uma das três CDRs das sequências SEQ ID Nos. 42, 5 ou 43, ou pelo menos uma sequência com pelo menos 80%, de preferência, 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID Nos. 42, 5 ou 43.

Com mais preferência ainda, os anticorpos, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles compreendem uma cadeia pesada comprehendendo as três seguintes CDRs, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, em que:

- a CDR-H1 comprehende a sequênci SEQ ID Nos. 42, 44 ou 48, ou uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID Nos. 42, 44 ou 48;

- a CDR-H2 comprehende a sequênci SEQ ID No. 5 ou 49, ou uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID No. 5 ou 49;

- a CDR-H3 comprehende a sequênci SEQ ID No. 45 ou 43, ou uma sequência com pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID No. 45 ou 43.

De acordo com outra modalidade particular, os anticorpos, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles comprehendem uma cadeia pesada que comprehende a CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 44, a CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 5 e a CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 45.

De acordo com outra modalidade particular, os anticorpos, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, são caracterizados pelo facto de que eles comprehendem uma cadeia pesada que comprehende a CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 48, a CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 49 e a CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 43.

Na presente descrição, os termos "polipeptídeos", "sequências de polipeptídeo", "peptídeos" e "proteínas

ligadas a compostos de anticorpo ou suas sequências" são intercambiáveis.

Em uma primeira modalidade, a região determinante de complementaridade, ou CDR, significa as regiões hipervariáveis das cadeias pesada e leve de imunoglobulinas, como definido por Kabat *et al.* (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5^a Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, e edições posteriores). Há três CDRs de cadeia pesada e três CDRs de cadeia leve. Aqui, os termos "CDR" e "CDRs" são usados para indicar, dependendo do caso, uma ou mais, ou mesmo todas as regiões contendo a maior parte dos resíduos de aminoácido responsáveis pela afinidade de ligação do anticorpo pelo antigénio ou epitopo que ele reconhece.

Em uma segunda modalidade, por regiões de CDR ou CDR(s), pretende-se indicar as regiões hipervariáveis das cadeias pesadas e leves das imunoglobulinas, como definido por IMGT.

A numeração única de IMGT foi definida para comparar os domínios variáveis independentemente do receptor de antigénio, do tipo de cadeia, ou da espécie [Lefranc M. -P., Immunology Today 18, 509 (1997)/Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)/Lefranc, M.-P., Pommie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. e Lefranc, Dev. Comp. Immunol, 27,

55-77 (2003)]. Na numeração única de IMGT, os aminoácidos conservados sempre possuem a mesma posição, por exemplo, cisteína 23 (1st-CYS), triptofano 41 (TRP-conservado), aminoácido hidrofóbico 89, cisteína 104 (2^a-CYS), fenilalanina ou triptofano 118 (J-PHE ou J- TRP). A numeração única de IMGT fornece uma delimitação padronizada das regiões estruturais (FR1-IMGT: posições 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 e FR4-IMGT: 118 a 128) e das regiões determinantes de complementaridade: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 e CDR3-IMGT: 105 a 117. As lacunas representam posições desocupadas, os comprimentos de CDR-IMGT (mostrado entre parênteses e separados por pontos, por exemplo, [8.8.13]) se tornam informação crucial. A numeração única de IMGT é usada em representações gráficas bidimensionais, chamadas de IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. e Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q. e Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], e em estruturas tridimensionais em IMGT/estrutura 3D-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Há três CDRs de cadeia pesada e três CDRs de cadeia leve. O termo CDR ou CDRs é usado aqui para indicar, dependendo do caso, uma destas regiões, ou várias, ou mesmo todas as regiões contendo a maior parte dos resíduos de aminoácido responsáveis pela afinidade de ligação do anticorpo pelo抗原 ou epitopo que ele reconhece.

Para maior clareza, deve ser compreendido que na descrição a seguir, e mais particularmente nas tabelas 2 e 3, as CDRs serão definidas pela numeração de IMGT, pela numeração de Kabat e pela numeração comum.

A numeração comum reagrupa parte dos resíduos de cada CDR que são comuns para as CDRs, conforme definido pelos sistemas de numeração de IMGT e de Kabat.

O sistema de numeração de IMGT define as CDRs de acordo com o sistema de IMGT definido acima, enquanto o sistema de numeração de Kabat define as CDRs de acordo com o sistema de Kabat definido acima.

Mais particularmente, a CDR-L1 consiste na SEQ ID No. 1 (QSLYNSRTRKNY) nos sistemas de numeração comum e de IMGT e SEQ ID No. 9 (KSSQSLYNSRTRKNYLA) no sistema de numeração de Kabat.

Com relação a CDR-L2, ela consiste na SEQ ID No. 2 (WAS) nos sistemas de numeração comum e de IMGT e SEQ ID No. 10 (WASTRES) no sistema de numeração de Kabat. A CDR-L3 consiste na SEQ ID No. 3 (KQSYNLRT) para todos os três sistemas de numeração.

Para a cadeia pesada, a CDR-H1 consiste na SEQ ID No. 4 (TDYY) no sistema de numeração comum, na SEQ ID No. 7 (GFTFTDYY) no sistema de numeração de IMGT e na SEQ ID No. 11 (TDYYMS) no sistema de numeração de Kabat. A CDR-H2

consiste na SEQ ID No. 5 (IRNKANGYTT) nos sistemas de numeração comum e de IMGT e na SEQ ID No. 12 (FIRNKANGYTTEYSASVKG) no sistema de numeração de Kabat.

Finalmente, a CDR-H3 consiste na SEQ ID No. 6 (DIPGFAY) nos sistemas de numeração comum e de Kabat, e consiste na SEQ ID No. 8 (ARDIPGFAY) no sistema de numeração de IMGT.

Mais particularmente, a CDR-L1 consiste na SEQ ID No. 40 (**QSLFNSRTRKNY**) nos sistemas de numeração comum e de IMGT e SEQ ID No. 46 (KSSQSLFNSRTRKNYLA) no sistema de numeração de Kabat.

Com relação a CDR-L2, ela consiste na SEQ ID No. 2 (WAS) nos sistemas de numeração comum e de IMGT e SEQ ID No. 47 (WASARDS) no sistema de numeração de Kabat. A CDR-L3 consiste na SEQ ID No. 41 (MQSFNLRT) para todos os três sistemas de numeração.

Para a cadeia pesada, a CDR-H1 consiste na SEQ ID No. 42 (DNY) no sistema de numeração comum, na SEQ ID No. 44 (GFTFTDNY) no sistema de numeração de IMGT e na SEQ ID No. 48 (DNYMS) no sistema de numeração de Kabat.

A CDR-H2 consiste em SEQ ID No. 5 (IRNKANGYTT) nos sistemas de numeração comum e IMGT e na SEQ ID No. 49 (FIRNKANGYTTDYSASVRG) no sistema de numeração de Kabat.

Finalmente, a CDR-H3 consiste na SEQ ID No. 43 (DVGSNYFDY) nos sistemas de numeração comum e de Kabat, e consiste em SEQ ID No. 45 (**ARDVGSNYFDY**) no sistema de numeração de IMGT.

No sentido da presente invenção, a "percentagem de identidade" entre duas sequências de ácidos nucleicos ou aminoácidos significa a percentagem de resíduos de nucleotídeos ou de aminoácidos idênticos entre as duas sequências a serem comparadas, obtida após alinhamento ótimo, esta percentagem sendo puramente estatística e as diferenças entre as duas sequências sendo distribuídas aleatoriamente ao longo de seu comprimento. A comparação entre duas sequências de ácido nucleico ou de aminoácido é tradicionalmente executada pela comparação das sequências após alinhamento ótimo das duas, a dita comparação sendo podendo ser conduzida por segmento ou pelo uso de uma "janela de alinhamento". O alinhamento ótimo das sequências para comparação pode ser executado, além da comparação manual, através do algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], através do algoritmo de homologia local de Neddleman e Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], através do método de pesquisa de similaridade de Pearson e Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] ou através de programas de computador com o uso destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou pelo programa de comparação BLAST NR ou BLAST P).

A percentagem de identidade entre duas sequências de ácido nucleico ou de aminoácido é determinada pela comparação das duas sequências otimamente alinhadas, na qual a sequência de ácido nucleico ou de aminoácido sendo comparadas podem ter adições ou deleções em relação à sequência de referência para alinhamento ótimo entre as duas sequências. A percentagem de identidade é calculada pela determinação do número de posições nas quais o resíduo de aminoácido ou nucleotídeo é idêntico entre as duas sequências, de preferência, entre as duas sequências completas, dividindo o número de posições idênticas pelo número total de posições na janela de alinhamento e multiplicando o resultado por 100 para obter a percentagem de identidade entre as duas sequências. Por exemplo, o programa BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol, 1999, Lett. 174:247-250) disponível na página da internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, pode ser usado com os parâmetros padrão (notavelmente para os parâmetros "penalidade por lacuna aberta" ("open gap penalty"): 5, e "penalidade por extensão da lacuna" ("extension gap penalty"): 2; a matriz selecionada sendo, por exemplo, a matriz "BLOSUM 62" proposta pelo programa); a percentagem de identidade entre as duas sequências a comparar é calculada diretamente pelo programa.

Para a sequência de aminoácido que exibe pelo

menos 80%, de preferência, 85%, 90%, 95% e 98% de identidade a uma sequência de aminoácido de referência, exemplos preferenciais incluem as que contêm a sequência de referência, determinadas modificações, notavelmente uma deleção, adição ou substituição de pelo menos um aminoácido, truncamento ou extensão. No caso de substituição de um ou mais aminoácidos consecutivos ou não consecutivos, são preferenciais as substituições nas quais os aminoácidos substituídos são trocados por aminoácidos "equivalentes". Aqui, a expressão "aminoácidos equivalentes" se destina a indicar quaisquer aminoácidos que serão provavelmente substituídos por um dos aminoácidos estruturais, entretanto, sem modificar as atividades biológicas dos anticorpos correspondentes e dos exemplos específicos definidos abaixo.

Os aminoácidos equivalentes podem ser determinados tanto por sua homologia estrutural com os aminoácidos pelos quais eles são substituídos ou com base nos resultados de ensaios comparativos de atividade biológica entre os vários anticorpos que serão provavelmente gerados.

Como um exemplo não limitador, a tabela 1 abaixo resume as possíveis substituições que serão provavelmente executadas sem resultar em uma modificação significativa da atividade biológica do anticorpo modificado correspondente; substituições inversas são naturalmente possíveis sob as mesmas condições.

Tabela 1

Resíduo original	Substituição (s)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tir
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

É conhecido pelos versados na técnica que no estado atual da técnica a maior variabilidade (comprimento e composição) entre as seis CDRs é encontrada nas três CDRs de cadeia pesada e, mais particularmente, na CDR-H3 desta

cadeia pesada. Consequentemente, será evidente que as CDRs características preferenciais dos anticorpos da invenção, ou de um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, serão as três CDRs da cadeia pesada, isto é, para o 414H5, as CDRs codificadas pelas sequências SEQ ID Nos. 7, 5, 8 e 11, 12, 6, respectivamente, definidas de acordo com IMGT e Kabat e, para o 515H7, as CDRs codificadas pelas sequências SEQ ID Nos. 44, 5, 45 e 48, 49, 43, respectivamente, definidas de acordo com IMGT e Kabat. Com mais preferência ainda, a CDR correspondente à CDR-H3 codificada pela sequência SEQ ID No. 8 ou 6 para o 414H5 e 45 ou 43 para o 515H7.

A presente invenção refere-se a um anticorpo murino, ou compostos derivados ou fragmentos funcionais do mesmo.

Outra modalidade da invenção apresenta um anticorpo, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, que compreende/

uma cadeia leve que compreende as três CDRs a seguir: CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 1; CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 2; e CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 3 e uma cadeia pesada que compreende as três CDRs a seguir: CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 4; CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 5; e CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 6.

Um anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, de acordo com a invenção, é caracterizado por compreender:

- uma cadeia leve que compreende o CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 1, o CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 2 e o CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 3; e
- uma cadeia pesada que compreende as três CDRs a seguir:
- CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 7, o CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 5 e o CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 8.

Numa outra modalidade da invenção, um anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, é caracterizado por compreender:

- uma cadeia leve que compreende o CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 9, o CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 10 e o CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 3; e
- uma cadeia pesada que compreende o CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 11, o CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 12 e o CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 6.

De acordo com ainda outra modalidade da invenção, o anticorpo da invenção, ou seus fragmentos funcionais, é caracterizado por compreender uma sequência de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 13 e por compreender uma sequência de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 14.

Outra modalidade da invenção apresenta um anticorpo, ou seus fragmentos funcionais, que compreende/

- uma cadeia leve que compreende as três seguintes CDRs: CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 40; CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 2; e CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 41 ou de uma sequência com pelo menos 80%, de preferência 85%, 90%, 95% e 98% identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID No. 41, e
- uma cadeia pesada que compreende as três CDRs a seguir: CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 42; CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 5; e CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 43.

Um anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, de acordo com a invenção, é caracterizado por compreender:

- uma cadeia leve que compreende a CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 40, a CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 2 e a CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 41; e
- uma cadeia pesada que compreende a CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 44, a CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 5 e a CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 45.

Em outra modalidade da invenção, um anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, é caracterizado por compreender:

- uma cadeia leve que compreende a CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 46, a CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 47 e a CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 41; e

- uma cadeia pesada que comprehende a CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 48, a CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 49 e a CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 43.

De acordo com mais uma outra modalidade, o anticorpo da invenção, ou seus fragmentos funcionais, é caracterizado pelo facto de que ele comprehende uma sequência de cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 50 e em que ele comprehende uma sequência de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 51.

Como observado acima, a invenção também se refere a qualquer composto derivado de um anticorpo conforme descrito na invenção.

Mais particularmente, é aqui revelado um anticorpo, ou seus fragmentos funcionais, é caracterizado pelo facto de que o dito composto derivado consiste em uma proteína de ligação que comprehende um arcabouço de peptídeo sobre o qual pelo menos uma CDR é enxertada de modo a preservar todo ou parte das propriedades de reconhecimento de parátopo do anticorpo inicial.

Uma ou mais sequências dentre as seis sequências de CDR descritas na presente invenção podem também estar presentes sobre o arcabouço de proteína das várias imunoglobulinas. Nesse caso, a sequência de proteína torna possível recriar um esqueleto de peptídeo favorável ao

enovelamento das CDRs enxertadas, permitindo a eles preservar suas propriedades de reconhecimento de antígenio do parátopo.

Em geral, um versado na técnica sabe como determinar o tipo de arcabouço de proteína sobre o qual enxertar pelo menos uma das CDRs que geradas a partir do anticorpo original. Mais particularmente, sabe-se que para serem selecionados, tais arcabouços devem satisfazer o maior número de critérios, da seguinte forma (Skerra A., J. Mol. Recogn., 2000, 13:167-187):

- boa conservação filogenética;
- estrutura tridimensional conhecida (como, por exemplo, por cristalografia, espectroscopia de RMN ou qualquer outra técnica conhecida de um versado na técnica);
- pequeno tamanho;
- pouca ou nenhuma modificação pós-transcricional; e/ou
- facilidade para serem produzidos, expressos ou purificados.

A origem destes arcabouços de proteína pode ser, mas não se limita às estruturas selecionadas dentre: fibronectina e, de preferência, o domínio de fibronectina tipo III 10, lipocalina, anticalina (Skerra A., J. Biotechnol, 2001, 74(4):257-75), proteína Z originada do domínio B da proteína A de *Staphylococcus aureus*, tioredoxina A ou proteínas com um motivo repetido, como a "repetição de anquirina" (Kohl et al., PNAS, 2003, vol.

100, N° 4, 1700- 1705), a "repetição de Armadillo", a "repetição rica em leucina" e os "tetratricopeptídeos repetidos".

Os arcabouços derivados de toxinas como, por exemplo, toxinas de escorpiões, insetos, plantas, moluscos etc., e os inibidores de proteína da sintase neuronal do óxido nítrico (PIN) também devem ser mencionados.

Um exemplo não restritivo destas construções híbridas é a inserção da CDR-H1 (cadeia pesada) de um anticorpo antiCD4, especialmente, 13B8.2, em uma das alças na PIN, a nova proteína de ligação assim obtida preservando as mesmas propriedades de ligação que o anticorpo original (Bes *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344). De forma puramente ilustrativa, a enxertia da CDR-H3 (cadeia pesada) de um anticorpo antilisozima VHH em uma das alças da neocarzinostatina (Nicaise *et al.*, Protein Science, 2004, 13(7):1882-1891) pode também ser mencionada.

Por fim, conforme descrito acima, estes arcabouços de peptídeo podem compreender de uma a seis CDRs originadas do anticorpo original. De preferência, mas sem ser um requisito, um versado na técnica selecionará pelo menos uma CDR da cadeia pesada, a última sendo conhecida como sendo primariamente responsável pela especificidade do anticorpo. A seleção de uma ou mais CDRs relevantes é óbvia para um versado na técnica, que então escolherá técnicas conhecidas adequadas (Bes *et al.*, FEBS Letters 508, 2001, 67-74).

É também aqui revelado um método para selecionar um composto derivado de um anticorpo de acordo com a invenção, o dito composto derivado sendo capaz de inibir *in vitro* e/ou *in vivo* o crescimento de células tumorais e o dito composto derivado compreendendo um arcabouço de peptídeo sobre o qual pelo menos uma CDR de anticorpo é enxertado, caracterizado pelo facto de que ele inclui as seguintes etapas:

- a) a colocação em contato, *in vitro*, de um composto, que compreende um arcabouço de peptídeo sobre o qual pelo menos uma CDR de anticorpo é enxertada, com uma amostra biológica contendo células tumorais capazes de crescer sob condições que permitem que estas células cresçam; e
- b) seleção do dito composto, caso o dito composto seja capaz de inibir o crescimento destas células tumorais, e caracterizado pelo facto de que a dita pelo menos uma CDR enxertada é selecionada dentre as seguintes CDRs:
 - a CDR da sequência SEQ ID No. 1, 9, 40, 46 ou uma sequência com pelo menos 80%, de preferência, 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID No. 1, 9, 40, 46;
 - a CDR das sequências SEQ ID No. 2, 10, 47 ou uma sequência com pelo menos 80%, de preferência, 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID No. 2, 10, 47;

- a CDR das sequências SEQ ID No. 3, 41 ou uma sequência com pelo menos 80%, de preferência, 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID No. 3, 41;
- a CDR das sequências SEQ ID No. 4, 7, 11, 42, 44, 48 ou uma sequência com pelo menos 80%, de preferência 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID No. 4, 7, 11, 42, 44, 48;
- a CDR das sequências SEQ ID No. 5, 12, 49 ou uma sequência com pelo menos 80%, de preferência 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID No. 5, 12, 49; e
- a CDR das sequências SEQ ID No. 6, 8, 43, 45 ou uma sequência com pelo menos de preferência 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID No. 6, 8, 43, 45.

De acordo com um modo preferencial, o método pode incluir na etapa a) a colocação em contato *in vitro* de um composto que compreende um arcabouço de peptídeo sobre o qual pelo menos duas ou três CDRs de anticorpo são enxertadas.

De acordo com um modo ainda preferencial deste método, o arcabouço de peptídeo é selecionado dentre os arcabouços ou proteínas de ligação cujas estruturas foram mencionadas acima.

Obviamente, estes exemplos não são de forma alguma restritivos, e qualquer outra estrutura conhecida ou óbvia para um versado na técnica deve ser considerada como estando abrangida pela proteção conferida pelo presente pedido de patente.

A presente invenção refere-se, desta forma, a um anticorpo, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, caracterizado pelo facto de que o arcabouço de peptídeo é selecionado dentre proteínas que são a) bem conservadas filogeneticamente, b) de arquitetura robusta, c) com uma organização molecular tridimensional bem conhecida, d) de pequeno tamanho e/ou e) compreendendo regiões que podem ser modificadas por deleção e/ou inserção sem modificação das propriedades de estabilidade.

De acordo com uma modalidade preferencial, o anticorpo da invenção, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, é caracterizado pelo facto de que o dito arcabouço de peptídeo é selecionado dentre i) arcabouços originados de fibronectina, de preferência, domínio 10 de fibronectina tipo 3, lipocalina, anticalina, proteína Z originada do domínio B da proteína A de *Staphylococcus aureus*, tioredoxina A ou proteínas com um motivo repetido, como a "repetição de anquirina" (Kohl et al, PNAS, 2003, vol. 100, Nº 4, 1700-1705), a "repetição de armadillo", a "repetição rica em leucina" e os "tetratricopeptídeos repetidos" ou iii) inibidores de proteína da sintase neuronal do óxido nítrico (PIN).

Um outro aspecto da invenção refere-se aos fragmentos funcionais do anticorpo descrito acima.

Mais particularmente, a invenção refere-se a um anticorpo, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, caracterizado pelo facto de que o dito fragmento funcional é selecionado dentre os fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc e diacorpos, ou qualquer fragmento cuja meia-vida tenha sido aumentada, como fragmentos peguilados.

Tais fragmentos funcionais do anticorpo de acordo com a invenção consistem, por exemplo, nos fragmentos Fv, scFv (sc = cadeia única), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc ou diacorpos, ou qualquer fragmento cuja meia-vida tenha sido aumentada por modificação química, como pela adição de polialquíleno glicol, como polietileno glicol (PEGilação) (fragmentos peguilados são chamados de Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG e Fab'-PEG), ou pela incorporação em um lipossomo, microesferas ou PLGA, os ditos fragmentos possuindo pelo menos uma das CDRs características da invenção que é notavelmente capaz de exercer atividade, de uma maneira geral, ainda que parcial, do anticorpo a partir do qual ele se origina.

De preferência, os ditos fragmentos funcionais irão compreender ou incluir uma sequência parcial da cadeia pesada ou leve variável do anticorpo a partir do qual eles são derivados, a dita sequência parcial sendo suficiente

para reter a mesma especificidade de ligação que o anticorpo a partir do qual ele se origina e afinidade suficiente, de preferência, pelo menos igual a 1/100, com mais preferência, pelo menos 1/10 daquela do anticorpo a partir do qual ele se origina.

Tal fragmento funcional irá conter pelo menos cinco aminoácidos, de preferência 6, 7, 8, 10, 15, 25, 50 ou 100 aminoácidos consecutivos da sequência do anticorpo a partir do qual ele se origina.

De preferência, estes fragmentos funcionais serão dos tipos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc ou diacorpos, que possuem geralmente a mesma especificidade de ligação que o anticorpo a partir do qual eles resultam. De acordo com a presente invenção, os fragmentos do anticorpo da invenção podem ser obtidos a partir dos anticorpos descritos acima por métodos tais como digestão enzimática, incluindo pepsina ou papainha, e/ou por clivagem das pontes de dissulfeto por redução química. Os fragmentos de anticorpo podem também ser obtidos por técnicas de genética recombinante também conhecidas do versado na técnica ou por síntese de peptídeo através, por exemplo, de sintetizadores automáticos de peptídeo, como aquelas disponíveis junto à Applied BioSystems, etc.

Para maior clareza, a tabela 2 abaixo resume as várias sequências de aminoácido correspondentes ao anticorpo da invenção.

Tabela 2 (em que Mu. = murino e Ch. = quimérico)

Anti-corpo	Numeração da CDR	Cadeia pesada	Cadeia leve	SEQ ID NO.
414H5	Comum		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		4
		CDR-H2		5
		CDR-H3		6
	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		7
		CDR-H2		5
		CDR-H3		8
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	10
			CDR-L3	3
		CDR-H1		11
		CDR-H2		12
		CDR-H3		6
			Domínio variável Mu.	13
		Domínio variável Mu.		14
			Domínio variável Ch.	64
		Domínio variável Ch.		65

(continuação)

Anti-corpo	Numeração da CDR	Cadeia pesada	Cadeia leve	SEQ ID NO.
515H7	Comum		CDR-L1	40
			CDR-L2	2
			CDR-L3	41
		CDR-H1		42
		CDR-H2		5
		CDR-H3		43
	IMGT		CDR-L1	40
			CDR-L2	2
			CDR-L3	41
		CDR-H1		44
		CDR-H2		5
		CDR-H3		45
	Kabat		CDR-L1	46
			CDR-L2	47
			CDR-L3	41
		CDR-H1		48
		CDR-H2		49
		CDR-H3		43
			Domínio variável Mu.	50
		Domínio variável Mu.		51
			Domínio variável Ch.	66
		Domínio variável Ch.		67

Outro aspecto específico da presente invenção refere-se a um anticorpo quimérico, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, caracterizado pelo facto de que o dito anticorpo compreende, também, regiões constantes de cadeia leve e cadeia pesada derivadas de um anticorpo de uma espécie heteróloga ao ratinho, especialmente, homem.

Ainda outro aspecto específico da presente invenção refere-se a um anticorpo humanizado, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, caracterizado pelo facto de que as regiões constantes da cadeia leve e da cadeia pesada derivadas do anticorpo humano são, respectivamente, a região lambda ou kappa e a região gama-1, gama-2 ou gama-4.

De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a um hibridoma murino capaz de secretar um anticorpo monoclonal de acordo com a invenção, nomeadamente o hibridoma de origem murina depositado na coleção francesa para culturas de micro-organismos (CNCM, Pasteur Institute, Paris, França) em 22 de outubro de 2007, sob o número 1-3860. O dito hibridoma foi obtido pela fusão de esplenócitos de ratinhos Balb/C imunizados e células das linhagens de mieloma Sp 2/0- Ag 14.

O anticorpo monoclonal, aqui chamado de 414H5, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, carac-

terizado pelo facto de que o dito anticorpo é secretado pelo hibridoma depositado na CNCM em 22 de outubro de 2007, sob o número 1-3860 obviamente faz parte da presente invenção.

De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a um hibridoma murino capaz de secretar um anticorpo monoclonal de acordo com a invenção, nomeadamente o hibridoma de origem murina depositado na coleção francesa para culturas demicro-organismos (CNCM, Pasteur Institute, Paris, França) em 25 de junho de 2008, sob o número 1-4019. O dito hibridoma foi obtido pela fusão de esplenócitos de ratinhos Balb/C imunizados e células das linhagens de mieloma Sp 2/O-Ag 14.

O anticorpo monoclonal, aqui chamado de 515H7, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, caracterizado pelo facto de que o dito anticorpo é secretado pelo hibridoma depositado na CNCM em 25 de junho de 2008, sob o número 1-4019 obviamente faz parte da presente invenção.

O anticorpo da invenção compreende, também, anticorpos quiméricos ou humanizados.

Um anticorpo químérico é um que contém uma região variável natural (cadeia leve e cadeia pesada) derivada de um anticorpo de uma dada espécie em combinação com regiões

constantes da cadeia leve e da cadeia pesada de um anticorpo de uma espécie heteróloga a dita dada espécie.

Os anticorpos, ou fragmentos quiméricos dos mesmos, podem ser preparados com o uso de técnicas de genética recombinante. Por exemplo, o anticorpo quimérico poderia ser produzido pela clonagem de DNA recombinante contendo um promotor e uma sequência que codifica a região variável de um anticorpo monoclonal não humano da invenção, nomeadamente, murino, e uma sequência que codifica a região constante do anticorpo humano. Um anticorpo quimérico de acordo com a invenção codificado por tal gene recombinante poderia ser, por exemplo, uma quimera ratinho-humano, a especificidade deste anticorpo sendo determinada pela região variável derivada do DNA murino e seu isotipo determinado pela região constante derivada do DNA humano. É feita referência a Verhoeven et al. (BioEssays, 8:74, 1988) para métodos para preparar anticorpos quiméricos.

Em outro aspecto, a invenção descreve um anticorpo, ou um composto derivado ou fragmento funcional do mesmo, que consiste em um anticorpo quimérico.

Em uma modalidade preferencial particular, o anticorpo quimérico, ou composto derivado ou fragmento funcional do mesmo da invenção compreende uma sequência de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos SEQ

ID No. 64, e que compreende uma sequência de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 65.

Em uma outra modalidade preferencial, o anticorpo quimérico da invenção, ou composto derivado ou fragmento funcional do mesmo, compreende uma sequência de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 66, e que compreende uma sequência de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 67.

"Anticorpos humanizados" significa um anticorpo que contém regiões de CDR derivadas de um anticorpo de origem não humana, as outras partes da molécula de anticorpo sendo derivadas de um (ou vários) anticorpos humanos. Além disso, alguns dos resíduos do segmento do esqueleto (chamados FR) podem ser modificados para preservar a afinidade de ligação (Jones et al., *Nature*, 321 :522-525, 1986; Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327, 1988).

Os anticorpos humanizados da invenção, ou fragmentos dos mesmos, podem ser preparados por técnicas conhecidas de um versado na área (como, por exemplo, as descritas nos documentos Singer et al., *J. Immun.*, 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10:1-142, 1992; e Bebbington et al., *Bio/Technology*, 10:169-175, 1992). Tais anticorpos humanizados são preferenciais por seu uso nos métodos

envolvendo diagnósticos *in vitro* ou tratamento preventivo e/ou terapêutico *in vivo*. Outras técnicas de humanização, também conhecidas de um versado na técnica, como, por exemplo, a técnica de "enxertia de CDR" descrita por PDL nas patentes EP 0 451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 ou US 5.530.101, US 6.180.370, US 5.585.089 e US5.693.761. As patentes US 5.639.641 ou 6.054.297, 5.886.152 e 5.877.293 podem também ser citadas.

Além disso, a invenção também refere-se a anticorpos humanizados originados dos anticorpos murinos descritos acima.

De uma forma preferencial, as regiões constantes da cadeia leve e da cadeia pesada derivadas do anticorpo humano são, respectivamente, a região lambda ou kappa e a gama-1, gama-2 ou gama-4.

Na modalidade correspondente ao isotipo IgG1, uma característica adicional do anticorpo é a de exibir funções efetoras, como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente do complemento (CDC).

Um novo aspecto da presente invenção refere-se a um ácido nucleico isolado caracterizado pelo facto de que é selecionado dentre os seguintes ácidos nucleicos (incluindo qualquer código genético degenerado):

- um ácido nucleico, DNA ou RNA, que codifica um anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, de acordo com a invenção;
- um ácido nucleico complementar de um ácido nucleico como definido em a);
- um ácido nucleico de pelo menos 18 nucleotídeos, capaz de hibridizar sob condições altamente estringentes com pelo menos uma das CDRs das sequências de ácido nucleico SEQ ID Nos. 15 a 26 ou SEQ ID Nos. 52 a 61 ou uma sequência com pelo menos 80%, de preferência 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID Nos. 15 a 26 ou SEQ ID Nos. 52 a 61; e
 - um ácido nucleico de pelo menos 18 nucleotídeos, capaz de hibridizar sob condições altamente estringentes com pelo menos a cadeia leve da sequência de ácido nucleico SEQ ID No. 27 ou SEQ ID No. 62 ou SEQ ID No. 68 ou 70 e/ou a cadeia pesada da sequência de ácido nucleico SEQ ID No. 28 ou SEQ ID No. 63 ou SEQ ID No. 69 ou 71 ou uma sequência com pelo menos 80%, de preferência 85%, 90%, 95% e 98% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID Nos. 27 e/ou 28 ou SEQ ID Nos. 62 e/ou 63 ou SEQ ID Nos. 68 e/ou 69 ou SEQ ID Nos. 70 e/ou 71.

A tabela 3 abaixo resume as várias sequências de nucleotídeo que dizem respeito ao anticorpo da invenção.

Tabela 3

Anti-corpo	Numeração da CDR	Cadeia pesada	Cadeia leve	SEQ ID No.
414H5	Comum		CDR-L1	15
			CDR-L2	16
			CDR-L3	17
		CDR-H1		18
		CDR-H2		19
		CDR-H3		20
	IMGT		CDR-L1	15
			CDR-L2	16
			CDR-L3	17
		CDR-H1		21
		CDR-H2		19
		CDR-H3		22
	Kabat		CDR-L1	23
			CDR-L2	24
			CDR-L3	17
		CDR-H1		25
		CDR-H2		26
		CDR-H3		20
			Domínio variável Mu.	27
		Domínio variável Mu.		28
			Domínio variável Ch.	68
		Domínio variável Ch.		69

(continuação)

Anti-corpo	Numeração da CDR	Cadeia pesada	Cadeia leve	SEQ ID No.
515H7	Comum		CDR-L1	52
			CDR-L2	16
			CDR-L3	53
		CDR-H1		54
		CDR-H2		19
		CDR-H3		55
	IMGT		CDR-L1	52
			CDR-L2	16
			CDR-L3	53
		CDR-H1		56
		CDR-H2		19
		CDR-H3		57
	Kabat		CDR-L1	58
			CDR-L2	59
			CDR-L3	53
		CDR-H1		60
		CDR-H2		61
		CDR-H3		55
			Domínio variável Mu.	62
		Domínio variável Mu.		63
			Domínio variável Ch.	70
		Domínio variável Ch.		71

Os termos "ácido nucleico", "sequência nucleica", "sequência de ácido nucleico", "polinucleotídeo", "oligo-nucleotídeo", "sequência de polinucleotídeo" e "sequência de nucleotídeo", usados de maneira intercambiável na presente descrição, significam uma sequência precisa de nucleotídeos, modificada ou não, que define um fragmento ou uma região de um ácido nucleico, contendo nucleotídeos não naturais ou não, e sendo um DNA de fita dupla, um DNA de fita simples ou produtos de transcrição dos ditos DNAs.

Deve-se também incluir aqui que a presente invenção não se refere a sequências de nucleotídeo no seu ambiente cromossômico natural, isto é, em um estado natural. As sequências da presente invenção foram isoladas e/ou purificadas, isto é, elas foram amostradas diretamente ou indiretamente, por exemplo, por uma cópia, seu ambiente tendo sido pelo menos parcialmente modificado. Os ácidos nucleicos isolados obtidos por genética recombinante, através, por exemplo, de células hospedeiras, ou obtidos por síntese química também devem ser mencionados aqui.

"As sequências nucleicas que exibem uma percentagem de identidade de pelo menos 80%, de preferência, 85%, 90%, 95% e 98%, após alinhamento ótimo com uma sequência preferencial" significa sequências nucleicas que exibem, com relação a uma sequência de ácido nucleico de referência, determinadas modificações como, em particular, uma deleção, um truncamento, uma extensão, uma

fusão químérica e/ou uma substituição, nomeadamente pontual. De preferência, estas são sequências que codificam as mesmas sequências de aminoácido que a sequência de referência, isto estando relacionado à degeneração do código genético, ou sequências complementares que provavelmente hibridizarão especificamente com as sequências de referência, de preferência sob condições altamente estringentes, especialmente as definidas abaixo.

Hibridização sob condições altamente estringentes significa que as condições relacionadas à temperatura e força iônica são selecionadas de tal forma que elas permitem que a hibridização seja mantida entre dois fragmentos de DNA complementares. De modo puramente ilustrativo, as condições altamente estringentes da etapa de hibridização com o propósito de definir os fragmentos de polinucleotídeo descritos acima são vantajosamente as seguintes.

A hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA é executada em duas etapas: (1) pré-hibridização a 42 °C durante três horas em tampão de fosfato (20 mM, pH 7,5) contendo SSC 5X (SSC 1X corresponde a uma solução de NaCl 0,15 M + citrato de sódio a 0,015 M), 50% de formamida, 7% de dodecil sulfato de sódio (SDS), Denhardt 10X, 5% de sulfato de dextrano e 1% de DNA de esperma de salmão; (2) hibridização primária durante 20 horas a uma temperatura que depende do comprimento da sonda (isto é, 42 °C para uma sonda >100 nucleotídeos de comprimento) seguido de duas lavagens de 20

minutos a 20 °C em SSC 2X + 2% de SDS, uma lavagem de 20 minutos a 20 °C em SSC 0,1X + SDS 0,1%. A última lavagem é executada em SSC 0,1X + SDS 0,1% durante 30 minutos a 60 °C para uma sonda de >100 nucleotídeos de comprimento. As condições de hibridização altamente estringentes descritas acima para um polinucleotídeo de tamanho definido podem ser adaptadas por um versado na técnica para oligonucleotídeos mais longos ou mais curtos, de acordo com os procedimentos descritos em Sambrook, et al. (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3^a edição, 2001).

A invenção também refere-se a um vetor compreendendo um ácidos nucleicos conforme descrito na invenção.

A invenção refere-se, especialmente, a vetores de clonagem e/ou expressão que contêm tal sequência de nucleotídeo.

Os vetores da invenção contêm, de preferência, elementos que permitem a expressão e/ou a secreção de sequências de nucleotídeo em uma dada célula hospedeira. O vetor deve, então, conter um promotor, sinais de início e término de tradução, assim como regiões de regulação de transcrição adequadas. Ele deve ser capaz de ser mantido de uma forma estável na célula hospedeira e pode, opcionalmente, ter sinais específicos que especificam a secreção da proteína traduzida. Estes vários elementos são selecionados e otimizados por um versado na técnica de

acordo com a célula hospedeira usada. Para este propósito, as sequências de nucleotídeo podem ser inseridas em vetores autorreplicantes no interior do hospedeiro escolhido ou podem ser vetores integrados do hospedeiro escolhido.

Tais vetores são preparados por métodos tipicamente usados por um versado na técnica e os clones resultantes podem ser introduzidos em um hospedeiro adequado por métodos padrão como lipofecção, eletroporação, choque térmico ou métodos químicos.

Os vetores são, por exemplo, vetores de origem plasmidial ou viral. Eles são usados para transformar células hospedeiras de modo a clonar ou expressar as sequências de nucleotídeo da invenção.

A invenção compreende, também, células hospedeiras transformadas por, ou que compreendem um vetor conforme descrito na presente invenção.

A célula hospedeira pode ser selecionada dentre sistemas procarióticos ou eucarióticos, como células bacterianas, por exemplo, mas também células de levedura ou células animais, especialmente, células de mamífero. Células de insetos ou de plantas também podem ser usadas.

A invenção também refere-se a animais, diferentes de seres humanos, que possuem uma célula transformada de acordo com a invenção.

Um outro aspecto da invenção refere-se a um método para a produção de um anticorpo de acordo com a invenção, ou um de seus fragmentos funcionais, o dito método sendo caracterizado pelo facto de que inclui as seguintes etapas:

- a) a cultura em um meio e nas condições de cultura adequadas para uma célula hospedeira de acordo com a invenção; e
- b) a recuperação do dito anticorpo, ou um de seus fragmentos funcionais, produzido desta forma a partir do meio de cultura ou a partir das ditas células cultivadas.

As células transformadas de acordo com a invenção são úteis nos métodos para a preparação dos polipeptídeos recombinantes de acordo com a invenção. Métodos para a preparação de um polipeptídeo de acordo com a invenção na forma recombinante, caracterizados pelo facto de que usam um vetor e/ou uma célula transformada pelo vetor de acordo com a invenção, também estão compreendidos na presente invenção. De preferência, uma célula transformada por um vetor de acordo com a invenção é cultivado sob condições que permitem a expressão do polipeptídeo supracitado e a recuperação do dito peptídeo recombinante.

Conforme já mencionado, a célula hospedeira pode ser selecionada dentre sistemas procarióticos ou eucarióticos. Em particular, é possível identificar as

sequências de nucleotídeo da invenção que facilitam a secreção em um tal sistema procariótico ou eucariótico. Um vetor de acordo com a invenção transportando tal sequência pode, então, ser usado vantajosamente para a produção das proteínas recombinantes a serem secretadas. De facto, a purificação destas proteínas recombinantes de interesse será facilitada pelo facto de que elas estão presentes no sobrenadante da cultura celular e não dentro das células hospedeiras.

Os polipeptídeos da invenção podem também ser preparados por síntese química. Um versado na técnica conhece métodos para síntese química, tais como técnicas em fase sólida (vide, especialmente, Steward et al., 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2^a ed.) ou técnicas em fase sólida parcial, por condensação de fragmentos ou por síntese convencional em solução. Os polipeptídeos obtidos por síntese química e capazes de conter aminoácidos não naturais correspondentes também estão compreendidos na invenção.

Os anticorpos, ou os compostos derivados ou fragmentos funcionais dos mesmos, que serão provavelmente obtidos pelo método da invenção também estão compreendidos na presente invenção.

De acordo com mais um aspecto, a presente invenção refere-se a um anticorpo, conforme descrito acima, caracterizado pelo facto de que ele é capaz,

adicionalmente, de se ligar especificamente a um receptor da família quimiocinas humanas e/ou é capaz de inibir especificamente a sinalização deste receptor.

De acordo com uma nova modalidade, a presente divulgação refere-se a um anticorpo, ou seus fragmentos funcionais, que consiste em um anticorpo biespecífico, no sentido em que compreende um segundo motivo capaz de interagir com qualquer receptor envolvido no desenvolvimento de tumores, como, por exemplo, VEGFR, VEGF, EGFR, IGF-1R, HER2neu, HGF, cMET, FGF, tetraspaninas, integrinas, CXCR4 (diferente do anticorpo da presente invenção, isto é, direcionando outro epítopo), CXCR7 ou CXCR2.

Os anticorpos biespecíficos ou bifuncionais constituem uma segunda geração de anticorpos monoclonais nos quais duas regiões variáveis diferentes são combinadas na mesma molécula (Hollinger e Bohlen, 1999, *Cancer and metastasis*, rev. 18:411-419). Sua utilidade foi demonstrada nos domínios diagnóstico e terapêutico em relação a sua capacidade de recrutar novas funções efetoras ou atingir várias moléculas sobre a superfície de células tumorais; estes anticorpos podem ser obtidos por métodos químicos (Glennie MJ et al., 1987, *J. Immunol.* 139, 2367-2375; Repp R. et al, 1995, *J. Hemat.*, 377-382) ou métodos somáticos (Staerz U.D. e Bevan M.J., 1986, *PNAS* 83, 1453-1457; Suresh M.R. et al, 1986, *Method Enzymol.*, 121: 210-228) mas também, de preferência, por técnicas de engenharia genética que tornam possível forçar a heterodimerização e, assim,

facilitar a purificação do anticorpo pretendido (Merchand *et al*, 1998, *Nature Biotech.*, 16:677-681).

Estes anticorpos biespecíficos podem ser construídos como uma IgG inteira, um Fab'2 biespecífico, Fab'PEG, diacorpos ou um scFv biespecífico, mas também como um anticorpo biespecífico tetravalente no qual dois sítios de ligação estão presentes para cada抗igénio direcionado (Park *et al*, 2000, *Mol. Immunol.*, 37(18): 1123-30) ou os fragmentos do mesmo, conforme descrito acima.

Em adição a uma vantagem económica dado que a produção e a administração de um anticorpo biespecífico são mais económicas do que a produção de dois anticorpos específicos, o uso dos tais anticorpos biespecíficos tem a vantagem de reduzir a toxicidade do tratamento. De facto, o uso de um anticorpo biespecífico torna possível diminuir a quantidade global de anticorpos circulantes e, consequentemente, uma possível toxicidade.

Em uma modalidade preferencial da invenção, o anticorpo biespecífico é um anticorpo bivalente ou tetravalente.

Por fim, a presente invenção refere-se ao anticorpo descrito acima, ou seus compostos derivados ou fragmentos funcionais, para uso como um fármaco.

A invenção também refere-se a uma composição

farmacêutica que compreende um composto que consiste em um anticorpo da invenção, ou um de seus compostos derivados ou fragmentos funcionais como um ingrediente ativo. De preferência, o dito anticorpo é suplementado por um excipiente e/ou um veículo farmaceuticamente aceitável.

A invenção também refere-se a uma composição, caracterizada pelo facto de que compreende, adicionalmente, como um produto combinado para uso de uma forma simultânea, separada ou prolongada, um anticorpo antitumoral diferente de um anticorpo dirigido contra CXCR4.

De acordo com mais uma outra modalidade, a presente invenção refere-se também a uma composição farmacêutica, conforme descrita acima, que compreende pelo menos um segundo composto antitumoral selecionado dentre os compostos capazes de inibir especificamente a atividade de tirosina quinase de receptores como IGF-1R, EGFR, HER2/neu, cMET, VEGFR ou VEGF, ou qualquer outro composto antitumoral conhecido de um versado na técnica.

Em um segundo aspecto preferencial da invenção, o dito segundo composto pode ser selecionado dentre os anticorpos antiEGFR, anti-IGF-1R, anti-HER2/neu, anticMET, VEGFR, VEGF, etc., isolados, ou seus fragmentos funcionais e compostos derivados, capazes de inibir a atividade proliferativa e/ou antiapoptótica e/ou angiogénica e/ou indutiva da disseminação metastática promovida pelos ditos receptores.

Também é adequado mencionar os anticorpos antiCD20 como, por exemplo, rituximabe, ibritumomabe ou tositumomabe; anticorpos antiCD33 como gemtuzumabe ou lintuzumabe; anticorpos antiCD22 como epratuzumabe; anticorpos antiCD52 como alemtuzumabe; anticorpos antiEpCAM como edrecolomabe, Ch 17-1A ou IGN-101; anticorpos antiCTP21 ou 16 como Xactin; anticorpos antiDNA-Ag como ^{131}I -Cotara TNT-1; anticorpos antimUC1 como pemtumomabe ou R1150; anticorpos antimUC18 como ABX-MA1; anticorpos antiGD3 como mitumomabe; anticorpos antiECA como CeaVac ou labetuzumabe; anticorpos antiCA125 como OvaRex; anticorpos anti-HLA-DR como apolizumabe; anticorpos antiCTLA4 como MDX-010; anticorpos antiPSMA como MDX-070, ^{111}In , ^{90}Y -J591, ^{177}Lu J591, J591-DM1; anticorpos antiLewis Y como IGN311; anticorpos antiangiogénesse como AS 1405 e ^{90}Y muBC1; anticorpos antiTrail-R1 como TRAIL R1mAb ou TRAIL R2mAb

.

Outra modalidade complementar à invenção consiste em uma composição como descrita acima que compreende, adicionalmente, como um produto combinado ou conjugado, para uso em uma forma simultânea, separada ou prolongada, um agente citotóxico/citostático.

"Uso simultâneo" significa a administração de ambos os compostos da composição compreendidos em uma forma de dosagem única.

"Uso separado" significa a administração, simultâ-

nea, de ambos os compostos da composição, compreendidos em formas de dosagem distintas.

"Uso prolongado" significa a administração sucessiva de ambos os compostos da composição, cada um deles estando compreendido em uma forma de dosagem distinta.

Em geral, a composição de acordo com a invenção aumenta consideravelmente a eficácia do tratamento para cancro. Em outras palavras, o efeito terapêutico do anticorpo da invenção é intensificado de forma inesperada pela administração de um agente citotóxico. Outra vantagem subsequente produzida por uma composição da invenção refere-se à possibilidade de usar doses eficazes menores do ingrediente ativo tornando possível, desta forma, evitar ou reduzir os riscos do aparecimento de efeitos colaterais, em particular, o efeito do agente citotóxico. Além disso, esta composição torna possível obter o efeito terapêutico esperado mais rapidamente.

"Agente terapêutico anticancro" ou "agente citotóxico" significa uma substância a qual, quando é administrada a um paciente, trata ou previne o desenvolvimento de cancro no paciente. Exemplos não limitadores destes agentes incluem agentes "alquilantes", antimetabólitos, antibióticos antitumorais, inibidores mitóticos, inibidores do funcionamento da cromatina, antiangiogênicos, antiestrôgenos, antiandrógenos e imunomoduladores.

Tais agentes são citados em VIDAL, por exemplo, na página dedicada aos compostos relacionados à oncologia e hematologia sob o título "Citotóxico"; os compostos citotóxicos citados pela referência a este documento são citados na presente invenção como agentes citotóxicos preferenciais.

"Agente alquilante" refere-se a qualquer substância que pode se ligar covalentemente com ou que pode alquilar qualquer molécula, de preferência, um ácido nucleico (por exemplo, DNA), no interior de uma célula. Exemplos destes agentes alquilantes incluem mostardas de nitrogênio, como mecloretamina, clorambucila, melfalan, cloridrato, pipobromo, prednimustina, fosfato dissódico ou estramustina; oxazafosforinas como ciclofosfamida, altretamina, trifosfamida, sulfofosfamida ou ifosfamida; aziridinas ou etileno-iminas como tiotepa, trietilenoamina ou altetramina; nitrosoureas como carmustina, estreptozocina, fotemustina ou lomustina; sulfonatos de alquila como busulfam, treosulfam ou improsulfam; triazenos como dacarbazina; ou complexo de platina como cisplatina, oxaliplatina ou carboplatina.

"Antimetabólito" refere-se a uma substância que bloqueia o crescimento e/ou metabolismo celular pela interferência com determinadas atividades, geralmente, a síntese de DNA. Exemplos de antimetabólitos incluem metotrexato, 5-fluorouracila, floxuridina, 5- fluorodesoxi-

uridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, citosina arabinosídeo, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gencitabina, cladribina, desoxicofomicina e pentostatina.

"Antibióticos antitumoriais" refere-se a um composto que pode evitar ou inibir a síntese de DNA, RNA e/ou proteínas. Exemplos destes antibióticos antitumoriais incluem doxorrubicina, daunorrubicina, idarrubicina valrrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina e procarbazina.

"Inibidores mitóticos" evitam a progressão normal do ciclo celular e mitose. Em geral, os inibidores de microtúbulos ou "taxoides" como paclitaxel e docetaxel são capazes de inibir a mitose. Os alcaloides da vinca, como vinblastina, vincristina, vindesina e vinorelbina, também são capazes de inibir a mitose.

"Os inibidores de cromatina" ou "inibidores de topoisomerase" são substâncias que inibem o funcionamento normal de proteínas que formam a cromatina, como as topoisomerases I e II. Exemplos destes inibidores incluem, para topoisomerase I, camptotecina e seus derivados, como irinotecano ou topotecano; para topoisomerase II, etoposídeo, fosfato de etiposídeo e teniposídeo.

Um agente "antiangiogênico" é qualquer fármaco, composto, substância ou agente que inibe o crescimento dos

vasos sanguíneos. Exemplos de agentes antiangiogênicos incluem, sem limitação, razoxina, marimastato, batimastato, prinomastato, tanomastato, ilomastato, CGS- 27023A, halofuginona, COL-3, neovastato, BMS-275291, talidomida, CDC 501, DMXAA, L-651582, esqualamina, endostatina, SU5416, SU6668, interferão-alfa, EMD 121974, interleucina-12, IM862, angiostatina e vitaxina.

"Antiestrógeno" ou "antagonista de estrogénio" refere-se a qualquer substância que reduz, antagoniza ou inibe a ação do estrogénio. Exemplos destes agentes são tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, iodoxifeno, anastrozol, letrozol e exemestano. Agente "antiandrógeno" ou "antagonista de androgênio" refere-se a qualquer substância que reduz, antagoniza ou inibe a ação do androgênio. Exemplos de antiandrógenos incluem flutamida, nilutamida, bicalutamida, espironolactona, acetato de ciproterona, finasterida e cimetidina.

Imunomoduladores são substâncias que estimulam o sistema imune. Exemplos de imunomoduladores incluem interferão, interleucinas como aldesleucina, OCT-43, denileucina diftitox ou interleucina-2, fatores de necrose tumoral como tasonermina, ou outros tipos de imunomoduladores como lentinano, sizofirano, roquinimex, pidotimode, pegademase, timopentina, poli I:C ou levamisol em combinação com 5-fluorouracila.

Para mais detalhes, um versado na técnica pode se

referir ao manual publicado pela associação francesa de professores de química intitulado "Therapeutic chemistry, vol. 6, Antitumor drugs and perspectives in the treatment of cancer", edição TEC e DOC, 2003 [em francês].

Em uma modalidade particularmente preferencial, a dita composição como um produto combinado é caracterizada pelo facto de que o dito agente citotóxico é ligado quimicamente ao dito anticorpo para uso simultâneo.

Em uma modalidade particularmente preferencial, a dita composição é caracterizada pelo facto de que o dito agente citotóxico/citostático é selecionado dentre os inibidores ou estabilizadores de fuso, de preferência, vinorelbina e/ou vinflunina e/ou vincristina.

De modo a facilitar a ligação entre o dito agente citotóxico e o anticorpo de acordo com a invenção, moléculas espaçadoras podem ser introduzidas entre os dois compostos a ligar, como o poli(alquíleno)glicol polietileno glicol ou os aminoácidos; ou, em outra modalidade, os derivados ativos dos ditos agentes citotóxicos, nos quais funções capaz de reagir com o dito anticorpo foram introduzidas, podem ser usados. Estas técnicas de ligação são bem conhecidas de um versado na técnica e não serão discutidas em mais detalhes na presente descrição.

Outros inibidores de EGFR incluem, sem limitação, anticorpos monoclonais C225 e 22Mab antiEGFR (ImClone

Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA) ou os compostos ZD-1834, ZD-1838 e ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), flunomida (Pharmacia/Sugen), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis), CI-1033/PD 183, 805 (Warner Lambert Parke Davis), CL-387, 785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GMBH/Roche), Naamidine A (Bristol-board Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co), VRCTC-310 (Ventech Research), toxina de fusão de EGF (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Center Cancer), WHI-P97 (Parker Hughes Center Cancer), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) ou a "vacina de EGFR" (York Medical/Centro of Immunologia Molecular).

Um outro aspecto da invenção refere-se a uma composição caracterizada pelo facto de que pelo menos um dos ditos anticorpos, ou dos fragmentos funcionais dos mesmos, é combinado ou conjugado com uma toxina celular e/ou um radioisótopo.

De preferência, a dita toxina ou o dito radioisótopo é capaz de evitar o crescimento ou a proliferação da célula tumoral, especialmente, inativando completamente a dita célula tumoral.

Também de preferência, a dita toxina é uma toxina

de enterobactéria, especialmente, exotoxina A de *Pseudomonas*.

Os radioisótopos que são preferencialmente combinados com os anticorpos terapêuticos são radioisótopos que emitem raios gama, de preferência, iodo¹³¹, ítrio⁹⁰, ouro¹⁹⁹, paládio¹⁰⁰, cobre⁶⁷, bismuto²¹⁷ e antimônio²¹¹. Os radioisótopos que emitem raios alfa e beta também podem ser usados na terapia.

"Toxina ou radioisótopo combinado com pelo menos um anticorpo da invenção, ou um fragmento funcional do mesmo" refere-se a qualquer meio que torna possível ligar a dita toxina ou o dito radioisótopo a este pelo menos um anticorpo, especialmente, por ligação covalente entre os dois compostos, com ou sem a introdução da molécula de ligação.

Exemplos de agentes que permitem a ligação química (covalente), eletrostática, ou não covalente de todo ou de parte dos elementos do conjugado incluem, em particular, benzoquinona, carbodi-imida e mais particularmente, EDC (cloridrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-carbodi-imida), dimaleimida, ácido ditio bis-nitrobenzoico (DTNB), S-acetil tio-acetato de N-succinimidila (SATA), agentes de ligação com um ou mais grupos, com um ou mais grupos de fenilasida, reagindo com raios ultravioleta (UV), com a máxima preferência N-[4-(azidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida (APDP), N-sucinimidil-3(2-piri-

dilditio)-propionato (SPDP) e 6-hidrazino-nicotinamida (HYNIC).

Outra forma de ligação, especialmente para radioisótopos, pode consistir no uso de agentes quelantes de íons bifuncionais.

Exemplos destes quelantes incluem os quelantes derivados de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) ou DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético) que foram desenvolvidos para ligar metais, particularmente, metais radioativos, com imunoglobulinas. Desta forma, o DTPA e seus derivados podem ser substituídos sobre a cadeia carbônica por vários grupos de modo a aumentar a estabilidade e a rigidez do complexo ligante-metal (Krejcarek *et al.*, 1977; Brechbiel *et al.*, 1991; Gansow, 1991; Patente US 4.831.175).

Por exemplo, o DTPA (ácido dietilenotriaminopen-tacético) e seus derivados, que há muito são amplamente usados em fármacos e biologia tanto na sua forma livre quanto na forma de um complexo com um íon metálico, exibem a notável característica de formar quelatos estáveis com íons metálicos, que podem ser acoplados com proteínas de interesse terapêutico ou diagnóstico, como anticorpos, para o desenvolvimento de conjugados radioimunes para a terapia do cancro (Meases *et al.*, 1984; Gansow *et al.*, 1990).

Ainda de preferência, o dito pelo menos um anti-corpo da invenção que forma o dito conjugado é selecionado

entre seus fragmentos funcionais, especialmente, fragmentos que perderam seu componente Fc, como fragmentos scFv.

A presente invenção comprehende, também, o uso da composição para a preparação de um fármaco destinado à prevenção ou tratamento de cancro.

A presente invenção também se refere ao uso de um anticorpo, ou um composto derivado ou fragmento funcional do mesmo, de preferência humanizado, e/ou de uma composição de acordo com a invenção para a preparação de um fármaco para inibir o crescimento de células tumorais. Em geral, a presente invenção refere-se ao usar de um anticorpo, ou um composto derivado ou fragmento funcional do mesmo, de preferência, humanizado, e/ou de uma composição para a preparação de um fármaco para a prevenção ou tratamento de cancro.

Os cancros preferenciais que podem ser prevenidos e/ou tratados incluem cancro de próstata, osteossarcoma, cancro de pulmão, cancro de mama, cancro endometrial, cancro de cólon, mieloma múltiplo, cancro de ovário, cancro pancreático ou qualquer outro cancro.

A invenção também se refere ao uso de um anticorpo, ou um composto derivado ou fragmento funcional do mesmo, e/ou de uma composição conforme descrita acima, para a preparação de um fármaco para modular a atividade de CXCR4 em uma célula.

É também revelado o uso do anticorpo conforme descrito em aquum método de diagnóstico, de preferência, *in vitro*, de doenças relacionadas ao nível de expressão de CXCR4. De preferência, as ditas doenças relacionadas à proteína CXCR4 no dito método de diagnóstico serão cancros.

Desta forma, os anticorpos da invenção, ou os compostos derivados ou fragmentos funcionais dos mesmos, podem ser empregados em um método para a detecção e/ou quantificação de proteína CXCR4 em uma amostra biológica *in vitro*, especialmente, para o diagnóstico de doenças associadas a uma expressão anormal com esta proteína, como cancros, em que o dito método compreende as seguintes etapas:

- a) colocar a amostra biológica em contato com um anticorpo de acordo com a invenção, ou um composto derivado ou fragmento funcional do mesmo;
- b) demonstrar o complexo antigénio-anticorpo possivelmente formado.

Desta forma, a presente divulgação diz respeito, também, aos kits ou acessórios para a implementação de um método conforme descrito, que compreendem os seguintes elementos:

- a) um anticorpo policlonal ou monoclonal da invenção;
- b) opcionalmente, reagentes para constituir o meio favorável às reações imunológicas;

c) opcionalmente, reagentes que revelam os complexos antigénio-anticorpo produzidos pela reação imunológica.

Vantajosamente, os anticorpos ou fragmentos funcionais do mesmo podem ser imobilizados sobre um suporte, especialmente, um chip de proteínas.

Vantajosamente, os chips de proteína podem ser usados nos kits ou acessórios necessários para detectar e/ou quantificar a proteína CXCR4 em uma amostra biológica.

Deve ser mencionado que o termo "amostra biológica" refere-se, na presente invenção, a amostras retiradas de um organismo vivo (especialmente, sangue, tecido, órgão ou outras amostras retiradas de um mamífero, especialmente ser humano) ou qualquer amostra que provavelmente conterá uma tal proteína CXCR4 (como uma amostra de células, transformadas, se necessário).

O dito anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, pode estar sob a forma de um imunoconjunto ou de um anticorpo marcado de modo a obter um sinal detectável e/ou quantificável. Os anticorpos marcados da invenção, ou os fragmentos funcionais do mesmo, incluem, por exemplo, conjugados de anticorpo (imunoconjuntos), que podem ser combinados, por exemplo, com enzimas como peroxidase, fosfatase alcalina, α -D-galactosidase, glicose oxidase, glicose amilase, anidrase carbônica, acetilcolinesterase, lisozima, malato desidrogenase ou glicose-6 fosfato desi-

drogenase ou por uma molécula como biotina, digoxigenina ou 5-bromo-desoxiuridina. Marcadores fluorescentes também podem ser combinados com os anticorpos da invenção ou fragmentos funcionais do mesmo, incluindo especialmente, fluoresceína e seus derivados, fluorocromo, rodamina e seus derivados, proteína verde fluorescente (GFP), dansila, umbelifera, etc. Nestes conjugados, os anticorpos da invenção ou fragmentos funcionais dos mesmos podem ser preparados por métodos conhecidos de um versado na técnica. Eles podem ser ligados com enzimas ou marcadores fluorescentes diretamente; através de um grupo espaçador ou um grupo de ligação como polialdeído, glutaraldeído, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA); ou na presença de agentes de ligação como os mencionados acima para os conjugados terapêuticos. Os conjugados transportando marcadores de fluoresceína podem ser preparados por reação com um isotiocianato.

Outros conjugados podem também incluir marcadores quimioluminescentes como luminol e dioxetano, marcadores bioluminescentes como luciferase e luciferina, ou marcações radioativas como iodo¹²³, iodo¹²⁵, iodo¹²⁶, iodo¹³³, bromo⁷⁷, tecnécio^{99m}, índio¹¹¹, índio^{113m}, gálio⁶⁷, gálio⁶⁸, rutênio⁹⁵, rutênio⁹⁷, rutênio¹⁰³, rutênio¹⁰⁵, mercúrio¹⁰⁷, mercúrio²⁰³, rênio^{99m}, rênio¹⁰¹, rênio¹⁰⁵, escândio⁴⁷, telúrio^{121m}, telúrio^{122m}, telúrio^{125m}, túlio¹⁶⁵, túlio¹⁶⁷, túlio¹⁶⁸, flúor¹⁸, ítrio¹⁹⁹ e iodo¹³¹. Os métodos existentes conhecidos de um versado na técnica para ligação de radioisótopos com anticorpos, diretamente ou através de um agente quelante

como o EDTA ou DTPA acima mencionados, podem ser usados tal como para radioisótopos de diagnóstico. Desta forma, deve ser mencionada a marcação com $I^{125}Na$ pela técnica de cloramina-T [Hunter W.M. e Greenwood F. C. (1962) Nature 194:495]; marcação com tecnécio 99m conforme descrito por Crockford *et al.* (Patente US 4.424.200) ou ligação através de DTPA conforme descrito por Hnatowich (Patente US 4.479.930).

A invenção também se refere ao uso de um anticorpo de acordo com a invenção para a preparação de um fármaco para o direcionamento específico de um composto que é biologicamente ativa com relação a células que expressam ou superexpressam CXCR4.

No sentido da presente descrição, um "composto biologicamente ativo" é qualquer composto capaz de modular, especialmente, inibir, a atividade celular, especialmente, o crescimento, proliferação, transcrição e tradução génica.

A invenção também se refere a um reagente para diagnóstico *in vivo* que compreende um anticorpo de acordo com a invenção, ou um fragmento funcional do mesmo, de preferência, marcado, especialmente, radiomarcado, e seu uso em formação de imagens para fins médicos, especialmente para a detecção de cancro relacionado à expressão ou superexpressão celular de CXCR4.

A invenção também se refere a uma composição, como

um produto combinado ou a um conjugado anti-CXCR4/toxina ou radioisótopo, de acordo com a invenção, usado como um fármaco.

De preferência, a dita composição como um produto combinado ou o dito conjugado será suplementado por um excipiente e/ou um veículo farmacêutico.

Na presente descrição, "veículo farmacêutico" significa um composto, ou uma combinação de compostos, presente em uma composição farmacêutica que não causa reações secundárias e que, por exemplo, facilita administração dos compostos ativos, aumenta seu tempo de vida e/ou eficácia no organismo, aumenta sua solubilidade em solução ou melhora seu armazenamento. Estes veículos farmacêuticos são bem conhecidos e serão adaptados por um versado na técnica de acordo com a natureza e a via de administração dos compostos ativos selecionados.

De preferência, tais compostos serão administrados por via sistêmica, especialmente, por via intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea ou oral. Com mais preferência, a composição que compreende o anticorpo de acordo com a invenção será administrada em várias doses espaçadas igualmente ao longo do tempo. Suas vias de administração, esquemas de dosagem e formas galênicas ótimas podem ser determinadas de acordo com os critérios geralmente levados em consideração quando se estabelece um tratamento adequado para um paciente como,

por exemplo, a idade ou o peso corporal do paciente, a severidade do estado geral do paciente, sua tolerância ao tratamento e os efeitos colaterais sentidos.

Desta forma, a invenção refere-se ao uso de um anticorpo, ou um de seus fragmentos funcionais, para a preparação de um fármaco para o direcionamento específico de um composto que é biologicamente ativo a células que expressam ou superexpressam CXCR4.

Outras características e vantagens da invenção ainda aparecem na descrição com os exemplos e figuras cujas legendas são apresentadas abaixo.

LEGENDAS DAS FIGURAS

As figuras 1A e 1B mostram a expressão de CXCR4 e CXCR2 em células de cancro por análise de qPCR, respectivamente.

A figura 2 mostra a expressão das proteínas CXCR4 e CXCR2 em células de cancro por análise de FACS.

As figuras 3A e 3B mostram a competição da ligação específica de I^{125} SDF-1 por SDF-1 não marcado (figura 3A) e Mabs 414H5 e 515H7 (figura 3B) sobre membranas celulares de células CHO-K1 que expressam de maneira estável CXCR4 humano selvagem (T: ligação total; NS: ligação inespecífica).

As figuras 4A e 4B mostram a modulação da ativação de proteína G pelo Mab 414H5 (figura 4A) e pelo Mab 515H7 (figura 4B) através do monitoramento das respostas de ligação de [³⁵S]GTP γ S no receptor CXCR4 selvagem expresso de maneira estável em células NIH-3T3. A figura 5 mostra a modulação da ativação da proteína G pelos Mabs anti-CXCR4 414H5 e 515H7 através do monitoramento das respostas de ligação de [³⁵S]GTP γ S em células tumorais humanas HeLa estimuladas com SDF-1 (10 and 100 nM).

As figuras 6A-6F mostram a modulação da associação do receptor CXCR4 com diferentes parceiros de interação por SDF-1 e pelos Mabs 414H5 e 515H7 através de uma abordagem de transferência de energia por ressonância de bioluminescência (BRET) em células HEK293. (figuras 6A e 6B: homodimerização de CXCR4:CXCR4; figuras 6C e 6D: heterodimerização de CXCR2:CXCR4 e figuras 6E e 6F: recrutamento mediado por CXCR4 de β -arrestina).

As figuras 7A e 7B mostram a inibição da produção de cAMP estimulada por forscolina por SDF-1 e Mabs 414H5 e 515H7 em células NIH3T3 que expressam de maneira estável o receptor CXCR4.

A figura 8 mostra a modulação da ativação de proteína G pelos Mabs anti-CXCR4 414H5 e 515H7 através do monitoramento das respostas de ligação de [³⁵S]GTP γ S no receptor CXCR4 mutante Asn<119>Ser constitutivamente ativo expresso de maneira estável em células CHO-K1.

A figura 9 ilustra a inibição da proliferação de células HeLa induzida por SDF-1 pelo Mab 414H5 *in vitro*.

As figuras 10A e 10B mostram a inibição da migração de células U937 induzida por SDF-1 pelo Mab para CXCR4 414H5 (figura 10A) e Mab 515H7 (figura 10B) *in vitro*.

A figura 11 mostra a inibição do crescimento tumoral de xenoenxerto MDA-MB-231 pelo Mab anti-CXCR4 414H5 (A) e pelo Mab 515H7 (B) em ratinhos Nod/Scid. A figura 12 mostra a atividade do Mab anti-CXCR4 414H5 em modelo de sobrevivência de ratinhos Nod/Scid U937.

As figuras 13A a 13C mostram a inibição da liberação de cálcio induzida por SDF-1 pelo Mab anti-CXCR4 515H7 em células CHO-CXCR4 (figura 13A) e células de cancro MDA-MB-231 (figura 13B), U937 (figura 13C).

A figura 14 mostra a inibição de tumor de xenoenxerto KARPAS 299 de célula T em ratinhos Nod/Scid por 414H5.

A figura 15 mostra a atividade do Mab anti-CXCR4 murino m515H7 em modelo de sobrevivência em ratinhos Nod/Scid U937.

A figura 16 mostra a atividade do Mab anti-CXCR4 murino m515H7 na inibição do crescimento de tumor de xenoenxerto KARPAS 299 de célula T em ratinhos Nod/Scid.

A figura 17 mostra a competição pela ligação específica de [¹²⁵I]SDF-1 pelos Mabs murinos m414H5 e m515H7 e Mabs quiméricos c414H5 e c515H7 sobre membranas celulares de células CHO-K1 que expressam de maneira estável CXCR4 humano do tipo selvagem (T: ligação total; NS: ligação inespecífica).

A figura 18 mostra a modulação da ativação da proteína G pelos Mabs murinos m414H5 e m515H7 e pelos Mabs quiméricos c414H5 e c515H7 pelo monitoramento das respostas de ligação de [³⁵S]GTP γ S no receptor CXCR4 selvagem expresso de maneira estável em células NIH-3T3 estimuladas com SDF-1 (10 nM).

A figura 19 mostra a modulação da ativação de proteína G pelos Mabs murinos anti-CXCR4 m414H5 e m515H7 Mabs e pelos Mabs quiméricos c414H5 e c515H7 pelo monitoramento das respostas de ligação de [³⁵S]GTP γ S em células tumorais humanas HeLa estimuladas com SDF-1 (10 nM).

As figuras 20A-20C mostram a modulação da associação do receptor CXCR4 com diferentes parceiros de interação por SDF-1 e pelos Mabs m414H5, c414H5, m515H7 e c515H7 através de uma abordagem de transferência de energia por ressonância de bioluminescência (BRET) em células HEK293. (figuras 20A: homodimerização de CXCR4:CXCR4; figura 20B: heterodimerização de CXCR2:CXCR4 e figuras 20C: recrutamento de β -arrestina mediado por CXCR4).

As figuras 21A e 21B mostram a inibição da liberação de cálcio induzida por SDF-1 em células CHO-CXCR4 (figura 21A) e em células U937 (figura 21B).

As figuras 22A e 22B mostram a inibição da migração de células U937 induzida por SDF-1 pelos Mabs para CXCR4 m414H5 e c414H5 (figura 22A) e Mabs m515H7 e c515H7 (figura 22B) *in vitro*.

A figura 23 mostra a atividade dos Mabs anti-CXCR4 químéricos c414H5 e c515H7 em modelo de sobrevivência de ratinhos Nod/Scid U937.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Expressão de CXCR4 e CXCR2 em células de cancro

- Análise por Q-PCR

De modo a quantificar a expressão relativa de CXCR4 e CXCR2 em diferentes linhagens celulares de cancro, um RT-PCR em tempo real foi usado.

As amostras de RNA foram extraídas a partir de diferentes linhagens celulares com o uso dos protocolos RNeasy Mini ou Midi (Qiagen Corporation, França). As amostras de RNA foram então controladas com o uso do sistema automatizado de eletroforese Experion (BIO-RAD Corporation, França) e mostrou uma boa qualidade/in-

tegridade. Um μ g de cada amostra de RNA foi convertido em molde de cDNA com o uso do kit iScript cDNA Synthesis (BIO-RAD Corporation, França). Os níveis de cDNA foram quantificados com o uso de qPCR com uma sonda TaqMan para CXCR2 ou como uma sonda SYBERGreen para CXCR4. A comparação das amostras exige normalização, então a referência interna RPL0 foi introduzida. As sondas TaqMan (usadas para CXCR2) carregavam um marcador repórter 5' FAM e um grupo "quencher" 3' TAMRA. A enzima de PCR foi ativada através de aquecimento durante 2 minutos a 50°C e 10 min a 95°C. Um procedimento em duas etapas foi usado, 15 segundos 95°C e 1 min a 62°C durante 40 ou 45 ciclos em uma mistura de PCR contendo 5 μ l de molde de cDNA (diluição 1/20), 1 x qPCR Mastermix (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems Corporation, Branchburg New Jersey, EUA), 50 a 900 nM de cada iniciador e 50 a 100 nM de sonda em um volume total de 50 μ l. Todas as reações foram realizadas com o uso do instrumento iCycler (BIO-RAD Corporation). O Q-PCR permitiu a determinação do limiar de detecção (Ct). Quanto menor o valor de Ct, mais expresso está o gene testado. Os iniciadores e a sonda para a proteína ribossomal humana, grande, P0 foram:

iniciador de sentido direto, 5'-GAAACTCTGCAT-TCTCGCTTCCTG-3' (SEQ ID No.32);

iniciador de sentido reverso, 5'-AGGACTCGTT-TGTACCCGTTGA-3' (SEQ ID No.33);

sonda, 5'-(FAM)-TGCAGATTGGCTACCCAACGTGGCA-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 34).

Os iniciadores para o CXCR4 humano (receptor de quimiocina 4) foram:

iniciador de sentido direto, 5 ' -CTCCTTCATCCT-CCTGGAAATC-3 ' (SEQ ID No. 35);

iniciador de sentido reverso, 5 '-CCAAGGAAAGCATAGAGGATGG-S ' (SEQ ID NO. 36).

Os iniciadores e a sonda para CXCR2 humano (receptor de quimiocina 2) foram:

iniciador de sentido direto, 5 '-GTGGTCATTATC-TATGCCCTGG-S ' (SEQ ID NO. 37);

iniciador de sentido reverso, 5 '-CGACCCTGCT-GTATAAGATGAC-S ' (SEQ ID NO.38);

sonda, 5 -(FAM)- TATTCCCTGCTGAGCCTGCTGGGAAA-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 39).

No nosso estudo comparativo, a expressão de dois genes [o gene testado (CXCR4 ou CXCR2) e RPL0] foi quantificada em duas amostras diferentes: a linhagem celular testada e uma linhagem celular de referência. A linhagem celular de referência correspondeu à linhagem celular contendo a menor expressão do gene quantificado. O cálculo da expressão génica comparativa foi feito com o uso da seguinte fórmula:

$$\text{Expressão génica relativa} = (1 + E_{\text{gene}})^{-\Delta Ct(1)} / (1 + E_{RPL0})^{-\Delta Ct(2)}$$

E_{gene} = eficiência da reação de PCR com o uso de iniciadores/sonda do gene quantificado

E_{RPL0} = eficiência da reação de PCR com o uso dos iniciadores/sonda de RPL0

Ct = limiar de detecção

$\Delta Ct(1) = Ct_{gene} \text{ (linhagem celular testada)} - Ct_{gene}$
(linhagem celular de referência)

$\Delta Ct(2) = Ct_{RPL0} \text{ (linhagem celular testada)} - Ct_{RPL0}$
(linhagem celular de referência).

Para cada série de PCR, um valor de quantidade relativa do gene foi calculado, e as linhagens celulares de cancro foram classificadas em grupos considerando seus níveis de expressão do maior para o negativo. Todos os dados são apresentados nas figuras 1A e 1B. Todas as linhagens celulares de cancro testadas expressaram CXCR4 (figura 1A) e CXCR2 com a exceção de DU145 e U-87MG para CXCR2 (figura 1B).

- Análise de FACS:

As linhagens celulares de cancro MDA-MB-231 , PC3 e U937 foram permeabilizadas e, então, incubadas com 10 µg/mL de anticorpos monoclonais anti-CXCR4 [44717 (R&D Systems) versus seu controle isotípico IgG2b [SIGMA] ou 10 µg/mL de anticorpos monoclonais anti-CXCR2 (anti h-CXCR2, clone 48311, R&D Systems, Mab 331 versus seu controle isotípico IgG2a). As células foram então lavadas com 1%BSA/PBS/0.01% NaN3. A seguir, anticorpos secundários

marcados com Alexa foram adicionados às células, que foram deixadas em incubação a 4°C durante 20 min. As células foram então lavadas novamente duas vezes. Após a segunda lavagem, a análise de FACS foi feita. Os resultados destes estudos de ligação são fornecidos na figura 2. Desta forma, as células tumorais, tais como MDA-MB-231, PC3 e U937, expressaram ambas as proteínas CXCR4 e CXCR2.

Exemplo 2: Geração de anticorpos monoclonais (Mabs) contra CXCR4 humano.

Para gerar anticorpos monoclonais para CXCR4, ratinhos Balb/c foram imunizados com células NIH3T3-CXCR4 recombinantes e/ou peptídeos correspondentes à terminação N e alças extracelular de CXCR4. Ratinhos de 6 a 16 semanas de idade na primeira imunização, foram imunizados uma vez com o抗igénio em adjuvante de Freund completo subcutaneamente (subcutaneamente) seguido de 2 a 6 imunizações com抗igénio em adjuvante de Freund incompleto subcutaneamente. A resposta imunológica foi monitorada por coletas de sangue retro-orbitais. O soro foi rastreado por ELISA (conforme descrito abaixo) e os ratinhos com títulos altos de anticorpos anti-CXCR4 foram usados para as fusões. Os ratinhos foram estimulados intravenosamente com o抗igénio dois dias antes do sacrifício e remoção do baço.

- ELISA

Para selecionar os ratinhos produtores de

anticorpos anti-CXCR4, os soros dos ratinhos imunizados foi testado por ELISA. Resumidamente, placas de microtitulação foram revestidas com peptídeo N-terminal [1-41] purificado conjugado a BSA a um equivalente de 5 μ g de peptídeo/mL, 100 μ L/poço, incubadas a 4°C de um dia para o outro e, então, bloqueadas com 250 μ L/poço de 0,5% de gelatina em PBS. As diluições de plasma dos ratinhos imunizados com CXCR4 foram adicionadas a cada poço e incubadas por 2 horas a 37°C. As placas foram lavadas com PBS e, então, incubadas com um anticorpo cabra anti-IgG de ratinho conjugado a HRP (Jackson Laboratories) durante 1 hora a 37°C. Após a lavagem, as placas foram reveladas com substrato de TMB, a reação foi paralisada 5 min após pela adição de 100 μ L/poço de H₂SO₄ 1M. Os ratinhos que desenvolveram os maiores títulos de anticorpos anti-CXCR4 foram usados para a geração de anticorpo.

- *Geração de hibridomas produtores de Mabs para CXCR4.*

Os esplenócitos de ratinho, isolados de ratinhos Balb/c que desenvolveram os títulos mais elevados de anticorpos anti-CXCR4 foram fundidos com PEG a uma linhagem de células de mieloma de ratinho Sp2/0. As células foram plaqueadas a aproximadamente 1x10⁵ /poço em placas de microtitulação seguido de uma incubação de duas semanas em meio seletivo contendo ultra meio de cultura + 2 mM de L-glutamina + 1 mM de piruvato de sódio + HAT 1x. Os poços foram então rastreados por ELISA quanto a anticorpos IgG monoclonais anti-CXCR4. Os hibridomas secretores de

anticorpo foram então subclonados pelo menos duas vezes por diluição limitante, cultivados in vitro para gerar anticorpo para análise posterior.

Exemplo 3: Caracterização por análise de FACS da especificidade de ligação dos Mabs anti-CXCR4 414H5 e 515H7 e reconhecimento de linhagens de células de cancro.

Neste experimento, a ligação específica a CXCR4 humano dos Mabs anti-CXCR4 414H5 e 515H7 foi examinada por análise de FACS.

NIH3T3, células transfetadas NIH3T3-hCXCR4 e linhagens de células de cancro MDA-MB-231, HeLa e U937 foram incubadas com 10 µg/mL de anticorpo monoclonal 414H5 e 515H7. As células foram então lavadas com 1%BSA/PBS/0,01% de NaN3. A seguir, anticorpos secundários marcados com Alexa foram adicionados às células e que foram deixadas em incubação a 4°C durante 20 min. As células foram então lavadas novamente duas vezes. Após a segunda lavagem, a análise de FACS foi feita. Os resultados destes estudos de ligação são fornecidos na Tabela 4 a seguir, que mostra [média de intensidade de fluorescência (MFI) obtida por FACS] que os Mabs anti-CXCR4 414H5 e 515H7 se ligaram especificamente à linhagem celular transfetada CXCR4 humano-NIH3T3 enquanto que não houve reconhecimento nas células NIH3T3 parentais. Estes Mab também foram capazes de reconhecer linhagens de células de cancro humanas, por exemplo, células de cancro de mama MDA-MB-231, células de

cancro pró-mieolocítico U937 e células de cancro de colo do útero HeLa.

Os Mabs anti-CXCR4 414H5 e 515H7 reconheceram NIH3T3-hCXCR4 transfetante, mas não houve reconhecimento das células NIH3T3 selvagens parentais. Os Mabs 414H5 e 515H7 também foram capazes de reconhecer as linhagens de células de cancro.

Tabela 4

Clone (10 µg/ml)	MFI nas linhagens celulares				
	NIH3T3	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231	HeLa	U937
414H5	21	2162	32	467	95
515H7	16	2752	239	1851	645

Exemplo 4: Ligação por competição dos Mabs anti-CXCR4 414H5 e 515H7 por [¹²⁵I]SDF-1 em membranas de CHO-K1 expressando de maneira estável o receptor CXCR4 humano

Este ensaio permite avaliar a capacidade dos Mabs 414H5 e 515H7 competirem pela ligação de [¹²⁵I]SDF-1 radiomarcado ao receptor CXCR4 humano, nos sítios de ligação ortostéricos ou alostéricos.

As células CHO-K1, expressando de maneira estável e constitutiva o receptor CXCR4 humano foram obtidas mediante transfeção de células CHO-K1 naïve (ATCC CCL-61)

com um vetor de expressão de mamífero transportando a sequência de codificação inteira do receptor CXCR4 humano (RefSeq NM_ 003467). As células foram propagadas em meio de cultura completo [DMEM-Ham F12 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 500 µg/ml de geneticina]. Os experimentos de ligação do radioligante foram conduzidos em membranas celulares obtidas mediante raspagem mecânica de células CHO/CXCR4 em tampão de lise [Hepes 20mM, pH 7,4, NaCl 150mM] seguido de centrifugação (10.000 g, 15 min). A ligação de [¹²⁵I]SDF-1 (atividade específica: 1500 Ci/mmol) foi realizada com o uso da tecnologia de SPA (ensaio de cintilação por proximidade - GE Healthcare). Resumidamente, as membranas celulares (30 µg/poço) foram incubadas em tampão de ligação [Hepes 20 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, BSA 1%] junto com o composto a ser avaliado (SDF-1 ou mAb), radioligante (1 nM) e finalmente, microesferas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/poço). O equilíbrio da ligação foi atingido após 1 hora a 25°C. Após centrifugação [1000 g durante 10 minutos], as contagens radioativas foram medidas em um contador de cintilação (TopCount, Perkin Elmer). A ligação inespecífica foi estimada na presença de 10 µM de SDF-1 não-marcado.

O SDF-1 não-marcado inibiu de forma dose-dependente a ligação de [¹²⁵I]SDF-1 com um valor de pKi (IC₅₀ = concentração de ligante que gera 50% de inibição da ligação específica de [¹²⁵I]SDF-1) de 7,75 ± 0,27 nM (n=4) (figura 3A). Sob as mesmas condições experimentais, nossos Mabs anti-CXCR4 (100 nM) competiram de forma eficaz pela ligação

de [¹²⁵I]SDF-1 com a seguinte ordem de classificação de eficácia de competição (% de inibição de [¹²⁵I]SDF-1): 515H7 (64 ± 3%) 414H5 (43 ± 4 %) (figura 3B).

Exemplo 5: Modulação de ligação de [³⁵S] GTP γ S nas membranas celulares expressando receptor CXCR4 selvagem pelos Mabs anti-CXCR4 414H5 e 515H7.

Este ensaio funcional permite monitorar a ativação da proteína G através do receptor CXCR4 humano selvagem e sua modulação por ligantes de CXCR4 e Mabs 414H5 e 515H7. As células NIH-3T3 expressando de maneira estável e constitutiva o receptor CXCR4 selvagem foram obtidas conforme descrito no exemplo acima para células CHO-K1. As células HeLa (carcinoma de colo de útero humano) foram propagadas em meio de cultura completo [EMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 2 μ M de bicarbonato de sódio]. A ligação de [³⁵S]GTP γ S foi feita sobre membranas celulares obtidas mediante raspagem mecânica de em tampão de lise [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] e centrifugação adicional (10000 g, 15 min). A incorporação e detecção de [³⁵S]GTP γ S (atividade específica: 1000 Ci/mmol) foi feita com o uso da tecnologia de SPA (ensaio de cintilação por proximidade - GE Healthcare). Resumidamente, as membranas celulares (10 μ g/poço) foram incubadas em tampão de ligação [Hepes 20 mM, GDP 3 μ M, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,4] junto com o composto a ser avaliado (SDF-1 ou Mab de interesse), [³⁵S]GTP γ S (0,2 a 0,4 nM) e finalmente, microesferas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/poço). A reação de

ligação foi realizada durante 1 hora a 25°C. Após centrifugação [1000 g durante 10 minutos], as contagens radioativas foram medidas em um contador de cintilação (TopCount, Perkin Elmer). A potência do antagonista foi calculada pela aplicação da equação de Cheng Prussof: KB= [conc. antago]/{(EC50'/EC50)-1} onde EC50 e EC50' são, respectivamente, a potência de SDF-1 na ausência e na presença de mAb. O SDF-1 induziu um aumento dose-dependente da ligação de [³⁵S]GTPγS, como o resultado da ativação da proteína G pelo receptor CXCR4. A estimulação máxima da ligação de [³⁵S]GTPγS representa, respectivamente, 167% e 320% sobre a ligação basal de [³⁵S]GTPγS para as membranas celulares de HeLa e NIH3T3/CXCR4. A potência de SDF-1 foi similar para ambas as linhagens celulares e correspondeu a 41,3 ± 9,7 nM (figuras 4A a 4B). Sob estas condições experimentais, a potência do antagonista dos Mabs 414H5 e 515H7, como determinado nas células NIH3T3/CXCR4 foi de 51 nM e 15 nM, respectivamente. Uma eficácia antagonista similar foi observada para células HeLa (figura 5).

Exemplo 6: Associação de CXCR4 com diferentes parceiros de interação: homo e heterodimerização, recrutamento de β-arrestina através de uma abordagem de transferência de energia por ressonância de bioluminescência (BRET) e efeito dos Mabs 414H5 e 515H7 sobre estes dímeros

Este ensaio funcional permite avaliar as alterações conformacionais induzidas mediante a ligação de SDF-1 e/ou Mabs 414H5 e 515H7 ao receptor CXCR4 com relação à

formação de homodímero de CXCR4 e heterodímero de CXCR2/CXCR4 assim como o recrutamento da proteína de sinalização de β -arrestina-2.

Vetores de expressão para cada um dos parceiros de interação investigados foram construídos como proteínas de fusão com o corante correspondente (luciferase de *Renilla reniformis*, Rluc e proteína amarela fluorescente, YFP) pela aplicação de técnicas de biologia molecular convencionais. Dois dias antes da realização dos experimentos de BRET, as células HEK293 foram transitoriamente transfetadas com vetores de expressão que codificam os parceiros de BRET correspondentes: [CXCR4/Rluc + CXCR4 /YFP] para estudar homo dimerização de CXCR4, [CXCR4/Rluc + CXCR2:YFP] para estudar a heterodimerização de CXCR4 e CXCR2 e [CXCR4/Rluc + β -arr2:YFP] para estudar o recrutamento mediado por CXCR4 de β -arrestina-2.

No dia seguinte, as células foram distribuídas em placas brancas de 96 MW pré-revestidas de polilisina em meio de cultura completo [DMEM suplementado com 10 % de SFB]. As células foram primeiro cultivadas a 37°C com 5 % de CO₂ de modo a permitir a adesão das células à placa. As células foram então privadas de alimento com 200 μ L de DMEM/poço de um dia para o outro. Imediatamente antes do experimento de BRET, o DMEM foi removido e as células foram lavadas rapidamente com PBS. As células foram então incubadas em PBS na presença ou ausência de anticorpo, 10 min a 37°C antes da adição de coelenterazina H 5 μ M com ou

sem SDF-1 300 nM em um volume final de 50 µL. Após a incubação por mais 10 minutos a 37°C, a captura de emissão de luz a 485 nm e 530 nm foi iniciada com o uso do leitor multimarcador Mithras LB940 (Berthold) (1 seg./comprimento de onda/poço repetida 15 vezes à temperatura ambiente).

O cálculo da razão de BRET foi feito conforme anteriormente descrito (Angers et al., 2000): [(emissão 530 nm) - (emissão 485 nm) X Cf]/(emissão 485 nm), onde Cf = (emissão 530 nm)/(emissão 485 nm) para células que expressam a proteína de fusão Rluc sozinha sob as mesmas condições experimentais. A simplificação desta equação mostra que a razão de BRET corresponde à razão de 530/485 nm obtida quando os dois parceiros de BRET estão presentes, corrigida pela razão de 530/485 nm obtida sob as mesmas condições experimentais, quando apenas o parceiro fundido a Rluc está presente no ensaio. Com o propósito de legibilidade, os resultados são expressos em unidades de milliBRET (mBU); mBU corresponde à razão de BRET multiplicada por 1000.

O SDF-1 (300 nM) aumentou em cerca de 20% o sinal de BRET resultante da proximidade espacial das proteínas adaptadoras e aceptoras fundidas ao receptor CXCR4, indicando provavelmente a formação de homodímeros de CXCR4/CXCR4 ou alterações conformacionais de dímeros pré-existentes (Figures 6A e 6B). De forma interessante, o SDF-1 (300 nM) reduziu em cerca de 24 % o sinal de BRET resultante da proximidade espacial das proteínas

adaptadoras e aceitoras fundidas a CXCR2 e CXCR4, também indicando provavelmente a formação de heterodímeros de CXCR2/CXCR4 ou alterações conformacionais de dímeros pré-existentes (figuras 6C e 6D). Neste último caso, a conformação ativada por SDF-1 de CXCR4/CXCR2 parece menos favorável para a transferência de energia de BRET. Em ambos os casos, os Mabs 414H5 e 515H7 foram capazes de modular alterações conformacionais induzidas por SDF-1 para homodímeros de CXCR4 (63 % de inibição do aumento de BRET induzido por SDF-1 para 414H5 e 69 % de inibição do aumento de BRET induzido por SDF-1 para 515H7, figuras 6A e 6B, respectivamente) assim como para a formação de heterodímeros de CXCR2/CXCR4 (50% de inibição da redução de BRET induzida por SDF-1 para 414H5 e 90% de inibição da redução induzida por SDF-1 para 515H7, figuras 6C e 6D, respectivamente). Os Mabs 414H5 e 515H7 também foram capazes de modular sozinhos a proximidade espacial de CXCR4/CXCR4 e CXCR2/CXCR4, respectivamente, indicando uma influência dos Mabs 414H5 e 515H7 na conformação dos homodímeros de CXCR4/CXCR4 e heterodímeros de CXCR2/CXCR4 (figuras 6A, 6B, 6C e 6D).

A ativação de CXCR4 por SDF-1 (300 nM) gerou um forte recrutamento da molécula de sinalização intracelular β -arrestina, conforme mostrado pela intensificação de 233% no sinal de BRET (figuras 6E e 6F). Este recrutamento foi parcialmente inibido pelos Mabs 414H5 e 515H7 (inibição de cerca de 20% para 414H5 e 95% para 515H7, figuras 6E e 6F, respectivamente) mostrando o efeito dos Mabs 414H5 e 515H7 sobre a sinalização.

Exemplo 7: Inibição mediada por CXCR4 da produção de cAMP

Este ensaio funcional foi delineado para monitorar a sinalização do receptor CXCR4 ao nível das adenilato ciclases através de proteínas inibitórias de Gi/o. O procedimento LANCE para cAMP (Perkin Elmer) foi aplicado conforme detalhado pelo fabricante. Resumidamente, células NIH3T3 expressando de maneira estável e constitutiva o receptor CXCR4 selvagem foram obtidas e propagadas conforme descrito acima. As células foram coletadas com o uso do agente isento de tripsina Versene e ressuspensas a uma concentração de 10^6 células/ml em uma solução contendo o Mab anti-AMP ligado a AlexaFluor (diluição de 1/100) e o composto (forscolina, SDF-1 e/ou Mabs 414H5 e 515H7). Mediante incubação durante 30 min. à temperatura ambiente, a mistura de detecção contendo os complexos de európio-estreptavidina (diluição de 1/125) e biotina-cAMP (diluição de 1/125) foi adicionada. Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente, o sinal de FRET resultante foi medido em um leitor multimarcador Mithras LB940 (Berthold). Os dados são expressos como valores fluorescentes arbitrários ou como estimulação relativa em relação à resposta de SDF-1 mediante subtração do efeito de FK.

A forscolina (FK) estimulou de forma dose-dependente a produção de cAMP com uma potência de cerca de $0,3 \mu\text{M}$ em células NIH3T3/CXCR4 (figura 7A). Na co-presença de SDF-1, os níveis de cAMP intracelular diminuíram como um

resultado da ativação da proteína inibitória Gi/o pelo receptor CXCR4. A potência de SDF-1 foi de 5,0 ± 3,1 nM (figura 7A). Os Mabs 414H5 e 515H7 inibiram de forma eficaz o efeito estimulado por forscolina de SDF-1 (100 nM) em mais de 60 % para 414H5 e em mais de 80 % para 515H7 (figura 7B).

Exemplo 8: Modulação da ligação de [³⁵S]GTPyS em membranas celulares expressando constitutivamente ativo o receptor CXCR4 mutante Asn¹¹⁹Ser pelos Mabs 414H5 e 515H7.

Este ensaio funcional permite monitorar a ativação da proteína G através de um receptor CXCR4 mutante constitutivamente ativo (CAM) Asn¹¹⁹Ser (consulte Zhang et al., 2002). Este ensaio sensível permite discriminar os ligantes de CXCR4 com base na sua atividade intrínseca (agonista parcial, antagonista silencioso ou agonista inverso). Conforme anteriormente descrito por Zhang e outros, ligantes de CXCR4 como AMD3100 ou T140 se comportaram, respectivamente, como agonista parcial e agonista inverso no receptor CXCR4 CAM. A identificação do antagonista silencioso pode ser difícil uma vez que esta classe de moléculas deve apresentar afinidades similares por ambos os estados ativo e inativo de CXCR4 (Wurch et al., 1999).

A introdução de uma mutação Asn119Ser na sequência de codificação do receptor CXCR4 foi realizada pela

aplicação de técnicas de biologia molecular convencionais (kit de mutagênese sítio-dirigida QuickChange, Stratagene, EUA). Células CHO-K1 expressando de maneira estável e constitutiva o receptor CXCR4 CAM foram obtidas conforme descrito no exemplo acima. A ligação de [³⁵S]GTP γ S foi feita em membranas celulares obtidas por raspagem mecânica em tampão de lise [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] e centrifugação adicional (10000 g, 15 min). A incorporação de [³⁵S]GTP γ S (atividade específica: 1000 Ci/mmol) foi feita com o uso da tecnologia de SPA (ensaio de cintilação por proximidade - GE Healthcare). Resumidamente, as membranas celulares (10 μ g/poço) foram incubadas em tampão de ligação [Hepes 20 mM, GDP 3 μ M, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,4] junto com o composto a ser avaliado (SDF-1 ou mAb), [³⁵S]GTP γ S (0,4 nM) e finalmente, microesferas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/poço). A reação de ligação foi realizada durante 1 hora a 25°C. Após centrifugação [1000 g durante 10 minutos], as contagens radioativas foram medidas em um contador de cintilação (TopCount, Perkin Elmer).

O SDF-1 (100 nM) estimulou a ligação de [³⁵S]GTP γ S em 130 %. O agonista inverso T140 inibiu a ligação basal (- 17 %) e estimulada por SDF-1 (- 159 %) de [³⁵S]GTP γ S. Em contrapartida, os Mabs 414H5 e 515H7 se comportaram como os antagonistas silenciosos de CXCR4 CAM, sem alterar a ligação basal de [³⁵S]GTP γ S (figura 8), mas inibindo a ligação de [³⁵S]GTP γ S induzida por SDF-1 (figura 8).

Exemplo 9: Inibição da proliferação de células HeLa induzida por SDF-1 pelo Mab anti-CXCR4 414H5 *in vitro*

Células HeLa da ATCC foram cultivadas de forma rotineira em meio EMEM (Lonza Corporation. Venders. Bélgica), 10% de SFB (SIGMA Corporation. St Louis. EUA), 1% de L-glutamina (Invitrogen Corporation. Escócia, UK), 2% de bicarbonato de sódio solução a 7,5% (Invitrogen Corporation. Escócia, UK). As células foram repicadas 3 dias antes dos ensaios de proliferação para que elas ficassem confluentes.

- Proliferação de células HeLa induzida por SDF-1

As células HeLa foram plaqueadas em placas para cultura de tecido de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/poço em 200 μl de meio sem soro (meio EMEM mais 1% de L-glutamina, 2% de bicarbonato de sódio, solução a 7,5%). Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as diluições adequadas de SDF-1 foram adicionadas às células HeLa. Após um total de 76 horas de cultura, as células foram pulsadas com 0,25 μCi de [³H]timidina (Amersham Biosciences AB. Uppsala. Suécia) durante 16 horas. A magnitude de [³H] timidina incorporada no DNA foi quantificada por contagem por cintilação líquida.

Os resultados foram expressos como índice de proliferação = [cpm médio de células + SDF-1/cpm médio de células - SDF-1].

As células HeLa foram incubadas com SDF-1 (0 a 1000ng/ml). O SDF-1 estimulou a proliferação in vitro de células HeLa em 1,5 a 2 vezes. A concentração de SDF-1 necessária para obter o índice de proliferação mais alto e reproduzível foi de 200 ng/ml (25 nM).

- *Inibição da proliferação in vitro de células HeLa induzida por SDF-1 pelo Mab para CXCR4 414H5*

As células HeLa foram plaqueadas em placas para cultura de tecido de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/poço em 200 μl de meio sem soro (meio EMEM mais 1% de L-glutamina, 2% de bicarbonato de sódio, solução a 7,5%). Vinte e quatro horas após o plaqueamento, diluições adequadas de Mab anti-CXCR4 414H5 em meio de diluição, foram adicionadas em triplicata às células HeLa na presença ou na ausência de SDF-1 a uma concentração final de 200 ng/ml (25 nM). Após um total de 76 horas de cultura, as células foram pulsadas com 0,25 μCi de [^3H]timidina (Amersham Biosciences AB. Uppsala. Suécia) durante 16 horas. A magnitude de [^3H] timidina incorporada no DNA foi quantificada por contagem por cintilação líquida.

Os resultados foram expressos como a fração afetada (F_a) calculada com o uso da fórmula: $F_a = [1 - (\text{cpm médio de células incubadas com Mab + SDF-1}/\text{cpm médio de células incubadas com meio de diluição + SDF-1})] \times 100$.

O efeito in vitro do Mab anti-CXCR4 414H5 sobre a proliferação de células HeLa induzida por SDF-1 foi caracterizado. As células HeLa foram incubadas com Mab 414H5 ou controle com ou sem SDF-1 (200 ng/ml). O SDF-1 estimulou o crescimento in vitro de células HeLa (1,5 a 2 vezes). A curva dose-resposta para Mab 414H5 foi obtida pelo tratamento das células com diluições seriadas duas vezes de Mab variando de 0 a 1500 nM, 24 h após o plaqueamento das células. Como a proliferação celular foi avaliada 76 horas após o plaqueamento, cada condição testada corresponde a um tempo de exposição de 48 h ao Mab ou controle. Os resultados foram expressos como a fração afetada (Fa) com o uso da fórmula descrita acima. Os resultados (representados na figura 9) mostraram que o Mab para CXCR4 414H5 inibiu a proliferação de células HeLa induzida por SDF-1 in vitro.

Exemplo 10: Efeito dos Mabs anti-CXCR4 414H5 e 515H7 sobre a migração de células U937 induzida por SDF-1

Para avaliar o efeito inibidor dos anticorpos monoclonais anti-CXCR4 414H5 e 515H7 sobre o processo de migração, 100 000 células U-937 em meio RPMI 1640 suplementado com 2% de SFB, foram plaqueadas na câmara superior de câmaras de migração (placas de 24 poços com tamanho dos poros de 8 µm) na presença ou na ausência de SDF- 1 na parte inferior dos poços e com ou sem os Mabs 414H5 e 515H7 na câmara superior. Neste ensaio, IgG2a e IgG2B murinas foram introduzidas como controles de isotípo.

Duas horas após o plaqueamento, as células em migração foram contadas. Os resultados apresentados nas figuras 10A para 414H5 e 10B para 515H7 demonstraram que, conforme esperado, o SDF-1 foi capaz de induzir um aumento significativo da migração das células U-937. Nenhum efeito foi observado quando as células foram incubadas com o controle isotípico de IgG2 . Em contrapartida, para as células incubadas com os Mabs 414H5 e 515H7, uma redução significativa e reproduzível na migração de células U937 induzida por SDF-1 foi observada: 50% com Mab 414H5 e mais de 80% com o Mab 515H7.

Exemplo 11: Inibição pelo Mab anti-CXCR4 414H5 do crescimento tumoral de xenoenxerto de MDA-MB-231 em ratinhos Nod/Scid.

O objetivo destes experimentos foi avaliar a capacidade dos Mabs anti-CXCR4 414H5 e 515H7 em inibir o crescimento de xenoenxerto de MDB-MB-231 em ratinhos Nod/Scid. As células MDA-MB-231 da ECACC foram cultivadas de forma rotineira em meio DMEM (Invitrogen Corporation, Escócia, UK), 10% de SFB (Sigma, St Louis MD, EUA). As células foram repicadas 48 horas antes da enxertia para que elas estivessem na fase exponencial do crescimento. Dez milhões de células MDA-MB-231 foram enxertadas em PBS a ratinhos Nod/Scid com 7 semanas de idade (Charles River, França). Cinco dias após a implantação, os tumores eram mensuráveis ($34 \text{ mm}^3 < V < 40 \text{ mm}^3$) e os animais foram divididos em grupos de 6 ratinhos com tamanho de tumor comparável. Os

ratinhos foram tratados intraperitoneal. com uma dose de carregamento de 2 mg/ratino de Mab 414H5 e Mab 515H7, respectivamente.

A seguir, os ratinhos foram injetados com 1 mg/dose/ratino de Mab 414H5 duas vezes por semana ou 0,5 mg/dose/ratino de Mab 515H7 três vezes por semana. Um grupo com PBS foi introduzido como um grupo de controle neste experimento. O volume do tumor foi medido duas vezes por semana e calculado pela fórmula: $\pi/6 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura}$. As análises estatísticas foram feitas em cada medida com o uso de um ensaio de Mann-Whitney.

Nestes experimentos, nenhuma mortalidade foi observada durante o tratamento. Em comparação ao grupo com PBS, houve uma inibição significativa do crescimento tumoral entre D7 e D39 ($p < 0,002$) para o Mab 415H5 1 mg/dose ou 515H7 0,5 mg/dose e o volume tumoral médio após 5 semanas de tratamento foi reduzido em 82% e 50% em relação ao PBS para os Mab 415H5 e 515H7, respectivamente (figuras 11A e 11B).

Exemplo 12: Atividade do Mab anti-CXCR4 414H5 em modelo de sobrevivência de ratinhos de U937

Células U937 da ATCC foram cultivadas em meio RPMI 1640, 10% de SFB, 1% de L-glutamina. As células foram repicadas dois dias antes da enxertia para que elas estivessem na fase exponencial do crescimento. Dez milhões

de células U937 foram injetadas intraperitoneal. a ratinhos Nod/Scid fêmeas. Dois dias após a implantação, os ratinhos foram tratados subcutaneamente com uma dose de carregamento de 2 mg de 414H5 mAb/ratinho e, então, duas vezes por semana com 1 mg de anticorpo/ratinho. Os ratinhos de controle receberam injeções de PBS, uma vez que foi mostrado em estudos anteriores que nenhuma diferença foi observada na sobrevivência entre ratinhos injetados com PBS e ratinhos administrados com um controle isotípico de IgG ratinho. A sobrevivência dos ratinhos foi monitorada todos os dias.

Os resultados descritos na figura 12 mostraram que os ratinhos tratados com o Mab 414H5 tiveram um aumento dramático e significativo na longevidade com T/C% de cerca de 343.

Exemplo 13: Mobilização mediada pelo receptor CXCR4 dos estoques de cálcio intracelular.

Este ensaio funcional foi projetado para monitorar a sinalização do receptor CXCR4 através da estimulação da via da fosfolipase C, induzindo a liberação de cálcio a partir dos estoques intracelulares do retículo endoplás-mico.

As células CHO-K1 expressando de maneira estável e constitutiva o receptor CXCR4 selvagem foram obtidas conforme descrito no exemplo acima. As células MDA-MB-231

(adenocarcinoma de mama humano) e U937 (linfoma humano) foram propagadas em meio de cultura completo, respectivamente [DMEM suplementado com 10% de SFB] e [RPMI 1640 suplementado com 10% SFB, 20 mM HEPES, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato de sódio, 1% de L-glutamina, 4,5 g/L de glicose]. Todos os tipos celulares foram plaqueados em placas de 96MW pretas a uma densidade de 100.000 células/poço em meio de cultura adequado. As células foram privadas de alimento de um dia para o outro antes de conduzir os experimentos. As células são carregadas com corante de cálcio fluorescente (Fluo-4 No Wash, Invitrogen US) em tampão de carregamento [HBSS 1x, HEPES 20 mM, ácido de probenicide 25 mM] durante 30 min. a 37°C seguido de 30 min. a 25°C. A estimulação por SDF-1 foi feita por injeção direta em cada poço. Para os experimentos de antagonismo, 10 µl de solução de Mab são adicionadas diretamente no tampão de carregamento pelo menos 10 min. antes do SDF-1. As medições cinéticas da fluorescência são realizadas em um leitor de microplacas por fluorescência multimodo Mithras LB940 (Berthold) com o uso dos seguintes ajustes: excitação a 485 nm, emissão a 535 nm, energia de excitação a 10000 unidades arbitrárias. A fluorescência em cada poço é registrada durante 0,1 segundo por segundo e durante um período de tempo de 20 segundos antes da injeção de SDF-1 (sinal basal). A seguir, 20 µl de SDF- 1 são injetados e o registro dos dados ocorreu durante um período de tempo de 2 min. Cada condição experimental é realizada em duplicata. Os valores para cada poço são primeiro corrigidos pela subtração da fluorescência basal e da

fluorescência emitida por um poço de controle sem células. Os dados relativos são expressos como uma percentagem da estimulação máxima obtida por SDF- 1 (100 nM).

O SDF-1 (100 nM) induziu uma liberação rápida e forte de cálcio intracelular em CHO/CXCR4 recombinante, enquanto nenhum sinal de fluorescência foi detectado em células CHO-K1 naïve. A intensidade máxima atingiu > 160 % sobre a fluorescência basal e foi observada cerca de 30 segundos após a estimulação por SDF-1; curvas cinéticas similares foram observadas com MDA-MB-231 e U-937 (figuras 13 A, 13B, 13C), embora a intensidade de fluorescência máxima por SDF-1 (100 nM) tenha sido inferior (130 a 140 % acima do basal). O anticorpo 515H7 (133 nM) gerou uma inibição forte e quase completa do sinal de cálcio induzido por SDF-1 (100 nM) em todas as três linhagens celulares investigadas.

Exemplo 14: Inibição pelo Mab anti-CXCR4 414H5 do crescimento tumoral de xenoenxerto de KARPAS 299 de célula T em ratinhos Nod/Scid.

O objetivo deste experimento foi avaliar a capacidade do Mab anti-CXCR4 414H5 em inibir o crescimento de xenoenxerto de KARPAS 299 em ratinhos Nod/Scid.

Células KARPAS 299 da ECACC foram cultivadas de modo rotineiro em meio RPMI, 1% de L-GIu e 10% de SFB (Sigma, St Louis MD, EUA). As células foram repicadas 48

horas antes da enxertia para que elas estivessem na fase exponencial do crescimento. Cinco milhões de células KARPAS 299 foram enxertadas em PBS a ratinhos Nod/Scid com 7 semanas de idade (Charles River, França). Cinco dias após a implantação, os tumores eram mensuráveis ($32 \text{ mm}^3 < V^3 < 49 \text{ mm}^3$) e os animais foram divididos em grupos de 6 ratinhos com tamanho de tumor comparável. Os ratinhos foram tratados intraperitoneal com uma dose de carregamento de 2 mg/ratinho de Mab 414H5.

A seguir, os ratinhos foram injetados duas vezes por semana a 1 mg/dose/ratinho de Mab 414H5. Um grupo com PBS foi introduzido como um grupo de controle neste experimento. O volume do tumor foi medido duas vezes por semana e calculado pela fórmula: $\pi/6 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura}$. As análises estatísticas foram feitas em cada medida com o uso de um ensaio de Mann-Whitney.

Neste experimento, nenhuma mortalidade foi observada durante o tratamento. Em comparação ao grupo com PBS, houve uma inibição significativa do crescimento tumoral entre D7 e D33 ($p < 0,002$) para o Mab 414H5 1 mg/dose e o volume tumoral médio após 5 semanas de tratamento foi reduzido em 73% em relação ao PBS para o Mab 414H5 (figura 14).

Exemplo 15: Atividade do Mab anti-CXCR4 515H7 em modelo de sobrevivência de ratinhos de U937.

Células U937 da ATCC foram cultivadas em meio RPMI

1640, 10% de SFB, 1% de L-glutamina. As células foram repicadas dois dias antes da enxertia para que elas estivessem na fase exponencial do crescimento. Dez milhões de células U937 foram injetadas intraperitoneal. a ratinhos Nod/Scid fêmeas. Dois dias após a implantação, os ratinhos foram tratados subcutaneamente com uma dose de carregamento de 2 mg de Mab 515H7/ratinho e, então, duas vezes por semana com 1 mg de anticorpo/ratinho. Os ratinhos de controle receberam injeções de PBS, uma vez que foi mostrado em estudos anteriores que nenhuma diferença foi observada na sobrevivência entre ratinhos injetados com PBS e ratinhos administrados com um controle isotípico de IgG ratinho. A sobrevivência dos ratinhos foi monitorada todos os dias. Os resultados descritos na figura 15 mostraram que os ratinhos tratados com o Mab 515H7 tiveram um aumento dramático e significativo na longevidade com T/C% de cerca de 280 para o Mab 515H7 (figura 15).

Exemplo 16: Inibição pelo Mab anti-CXCR4 515H7 do crescimento tumoral de xenoenxerto de KARPAS 299 de célula T em ratinhos Nod/Scid.

O objetivo deste experimento foi avaliar a capacidade do Mab anti-CXCR4 515H7 em inibir o crescimento de xenoenxerto de KARPAS 299 em ratinhos Nod/Scid.

Células KARPAS 299 da ECACC foram cultivadas de modo rotineiro em meio RPMI, 1% de L-GIu e 10% de SFB (Sigma, St Louis MD, EUA). As células foram repicadas 48

horas antes da enxertia para que elas estivessem na fase exponencial do crescimento. Cinco milhões de células KARPAS 299 foram enxertadas em PBS a ratinhos Nod/Scid com 7 semanas de idade (Charles River, França). Cinco dias após a implantação, os tumores eram mensuráveis ($32 \text{ mm}^3 < V^3 < 49 \text{ mm}^3$) e os animais foram divididos em grupos de 6 ratinhos com tamanho de tumor comparável. Os ratinhos foram tratados intraperitoneal com uma dose de carregamento de 2 mg/ratinho de Mab 515H7.

A seguir, os ratinhos foram injetados duas vezes por semana a 1 mg/dose/ratinho de Mab 515H7. Um grupo com PBS foi introduzido como um grupo de controle neste experimento. O volume do tumor foi medido duas vezes por semana e calculado pela fórmula: $\pi/6 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura}$. As análises estatísticas foram feitas em cada medida com o uso de um ensaio de Mann-Whitney. Nestes experimentos, nenhuma mortalidade foi observada durante o tratamento.

Em comparação ao grupo com PBS, houve uma inibição significativa do crescimento tumoral entre D7 e D33 ($p < 0,002$) para o Mab 515H7 1 mg/dose e o volume tumoral médio após 5semanas de tratamento foi reduzido em 63% para o Mab 515H7 em relação ao PBS (figura 16).

Exemplo 17: Produção de Mabs quiméricos anti-CXCR4 c414H5 e C515H7.

Formatos quiméricos dos Mabs 414H5 e 515H7 murinos

foram projetados: eles correspondem aos domínios variáveis de cadeia leve e cadeia pesada dos anticorpos murinos de interesse, fundidos geneticamente aos domínios constantes humanos C κ e IgG1. Todos os Mabs recombinantes foram produzidos por transfecção temporária com o uso do sistema HEK293/EBNA com um vetor de expressão pCEP4 (Invitrogen, EUA). As sequências de nucleotídeo completas correspondentes aos domínios variáveis das cadeias pesada e leve dos Mabs 414H5 e 515H7 foram sintetizadas por síntese de gene global (Genecust, Luxemburgo). Elas foram subclonadas em um vetor pCEP4 (Invitrogen, EUA) transportando a sequência de codificação inteira da domínio constante da cadeia leve [C κ] ou pesada [CH1-dobradiça-CF β -CF β] de uma imunoglobulina IgG1 humana. Todas as etapas de clonagem foram feitas de acordo com técnicas de biologia molecular convencionais conforme descrito na referência Laboratory Manual (Sambrook e Russel, 2001) ou de acordo com as instruções do fabricante. Cada construto genético foi completamente validado por sequenciamento de nucleotídeo com o uso do kit de sequenciamento Big Dye Terminator Cycle (Applied Biosystems, EUA) e analisado com o uso de um analisador genético 3100 (Applied Biosystems, US).

As células HEK293 EBNA adaptadas em suspensão (Invitrogen, US) foram cultivadas de forma rotineira em frascos de 250 ml em 50 ml de meio isento de soro Excell 293 (SAFC Biosciences) suplementado com 6 mM de glutamina em um agitador orbital (velocidade de rotação a 110 rpm). A transfecção temporária foi feita com 2.106 células/ml com o

uso de polietilenoimina (PEI) de 25 kDa linear (Polysciences) preparada em água a uma concentração final de 1 mg/ml misturada e DNA plasmidial (concentração final de 1,25 µg/ml para uma razão de plasmídeo de cadeia pesada para cadeia leve de 1 :1). 4 horas após a transfecção, a cultura foi diluída com um volume de meio de cultura fresco para atingir uma densidade celular final de 10⁶ células/ml. O processo de cultivo foi monitorado com base na viabilidade celular a produção de Mab. Tipicamente, as culturas foram mantidas por 4 a 5 dias. Os Mabs foram purificados com o uso de uma abordagem de cromatografia convencional sobre uma resina de proteína A (GE Healthcare, EUA). Todos os Mabs diferentes foram produzidos em teores adequados para avaliações funcionais. Os níveis de produtividade variam tipicamente entre 6 e 15 mg/L de Mabs purificados.

Exemplo 18: Caracterização por análise de FACS da especificidade de ligação dos Mabs anti-CXCR4 quiméricos c414H5 e c515H7 e reconhecimento de linhagem de células de cancro.

Neste experimento, a ligação específica dos Mabs quiméricos anti-CXCR4 c414H5 e c515H7 a CXCR4 humano foi examinada por análise de FACS.

NIH3T3, células transfectadas NIH3T3-hCXCR4 e a linhagem de células de cancro MDA-MB-231 foram incubadas com 10 µg/mL de anticorpo monoclonal c414H5 e c515H7. As células foram então lavadas com 1% de BSA/PBS/ 0,01% de

NaN3. A seguir, anticorpos secundários marcados com Alexa foram adicionados às células e que foram deixadas em incubação a 4°C durante 20 min. As células foram então lavadas novamente duas vezes. Após a segunda lavagem, a análise de FACS foi feita. Os resultados destes estudos de ligação são fornecidos na Tabela 5 a seguir, que mostra [média de intensidade de fluorescência (MFI) obtida por FACS] que os Mabs quiméricos anti-CXCR4 c414H5 e c515H7 se ligaram especificamente à linhagem celular transfetada CXCR4 humano-NIH3T3 e também reconheceu linhagens de células de cancro humanas, por exemplo, células de cancro de mama MDA-MB- 231.

Tabela 5

Clone (10 µg/ml)	MFI nas linhagens celulares	
	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231
c414H5	1039	Não testado
c515H7	2294	118

Exemplo 19: Ligação por competição dos Mabs anti-CXCR4 murinos m414H5 e m515H7 e Mabs quiméricos c414H5 e c515H7 por [¹²⁵I]SDF-1 em membranas de CHO-K1 expressando de maneira estável o receptor CXCR4 humano

Este ensaio permite avaliar a capacidade dos Mabs m414H5, m515H7 e Mabs quiméricos c414H5, c515H7 competirem pela ligação de [¹²⁵I]SDF-1 radiomarcado ao receptor CXCR4 humano, nos sítios de ligação ortostéricos ou alostéricos .

As células CHO-K1, expressando de maneira estável e constitutiva o receptor CXCR4 humano foram obtidas mediante transfeção de células CHO-K1 naïve (ATCC CCL-61) com um vetor de expressão de mamífero transportando a sequência de codificação inteira do receptor CXCR4 humano (RefSeq NM_003467). As células foram propagadas em meio de cultura completo [DMEM-Ham F12 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 500 µg/ml de geneticina]. Os experimentos de ligação do radioligante foram conduzidos em membranas celulares obtidas mediante raspagem mecânica de células CHO/CXCR4 em tampão de lise [Hepes 20mM, pH 7,4, NaCl 150mM] seguido de centrifugação (10.000 g, 15 min). A ligação de [¹²⁵I]SDF- 1 (atividade específica: 1500 Ci/mmol) foi realizada com o uso da tecnologia de SPA (ensaio de cintilação por proximidade - GE Healthcare). Resumidamente, as membranas celulares (30 µg/poço) foram incubadas em tampão de ligação [Hepes 20 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, BSA 1%] junto com o composto a ser avaliado (SDF-1 ou mAb), radioligante (1 nM) e finalmente, microesferas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/poço). O equilíbrio da ligação foi atingido após 1 hora a 25°C. Após centrifugação [1000 g durante 10 minutos], as contagens radioativas foram medidas em um contador de cintilação (TopCount, Perkin Elmer). A ligação inespecífica (NS) foi estimada na presença de 10 µM de SDF-1 não-marcado.

Os Mabs anti-CXCR4 (100 nM) competiram de forma eficiente pela ligação de [¹²⁵I]SDF-1 com a seguinte ordem de classificação de eficácia de competição (% de inibição

de [¹²⁵I]SDF-1): m515H7 (62 ± 10%), C515H7 (55 ± 4%), m414H5 (30 ± 5%) e c414H5 (21 ± 10 %) (figura 17).

Exemplo 20: Modulação da ligação de [³⁵S]GTP γ S nas membranas celulares expressando o receptor CXCR4 selvagem pelos Mabs murinos anti-CXCR4 m414H5 e m515H7 e Mabs quiméricos c414H5 e c515H7

Este ensaio funcional permite monitorar a ativação da proteína G através do receptor CXCR4 humano selvagem e sua modulação pelos Mabs murinos anti-CXCR4 m414H5, m515H7 e Mabs quiméricos c414H5, c515H7.

As células NIH-3T3 expressando de maneira estável e constitutiva o receptor CXCR4 selvagem foram obtidas conforme descrito no exemplo acima para células CHO-K1. As células HeLa (carcinoma de colo de útero humano) foram propagadas em meio de cultura completo [EMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 2 μ M de bicarbonato de sódio]. A ligação de [³⁵S]GTP γ S foi feita sobre membranas celulares obtidas mediante raspagem mecânica de em tampão de lise [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] e centrifugação adicional (10000 g, 15 min). A incorporação e detecção de [³⁵S]GTP γ S (atividade específica: 1000 Ci/mmol) foi feita com o uso da tecnologia de SPA (ensaio de cintilação por proximidade - GE Healthcare). Resumidamente, as membranas celulares (10 μ g/poço) foram incubadas em tampão de ligação [Hepes 20 mM, GDP 3 μ M, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,4] junto com o composto a ser avaliado (SDF-1 e Mab

de interesse), [³⁵S]GTP γ S (0,4 nM) e finalmente, microesferas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/poço). A reação de ligação foi realizada durante 1 hora a 25°C. Após centrifugação [1000 g durante 10 minutos], as contagens radioativas foram medidas em um contador de cintilação (TopCount, Perkin Elmer). As IC50 foram calculadas para cada Mab.

Sob estas condições experimentais, a IC50 dos Mabs m414H5, c414H5, m515H7 e C515H7, como determinado nas células NIH3T3/CXCR4 foi de 1,6 nM, 1,1 nM, 1,9 nM e 1,5 nM, respectivamente (figura 18). A IC50 dos Mabs m414H5, c414H5, m515H7 e c515H7 determinada com o uso de células HeLa nas mesmas condições experimentais foram 0,5 nM, 0,3 nM, 0,2 nM e 0,6 nM, respectivamente (figura 19).

Exemplo 21: Associação de CXCR4 com diferentes parceiros de interação: homo e heterodimerização, recrutamento de β -arrestina através de uma abordagem de transferência de energia por ressonância de bioluminescência (BRET) e efeito dos Mabs murinos m414H5, m515H7 e Mabs quiméricos c414H5 e c515H7 sobre estes dímeros

Este ensaio funcional permite avaliar as alterações conformacionais induzidas mediante a ligação de SDF-1 e/ou Mabs murinos m414H5, m515H7 e Mabs quiméricos c414H5, e c515H7 ao receptor CXCR4 com relação à formação de homodímero de CXCR4 e heterodímero de CXCR2/CXCR4 assim como o recrutamento da proteína de sinalização de β -arrestina-2.

Vetores de expressão para cada um dos parceiros de interação investigados foram construídos como proteínas de fusão com o corante correspondente (luciferase de *Renilla reniformis*, Rluc e proteína amarela fluorescente, YFP) pela aplicação de técnicas de biologia molecular convencionais. Dois dias antes da realização dos experimentos de BRET, as células HEK293 foram transitoriamente transfetadas com vetores de expressão codificando os parceiros de BRET correspondentes: [CXCR4/Rluc + CXCR4 /YFP] para estudar homo dimerização de CXCR4, [CXCR4- Rluc + CXCR2-YFP] para estudar a heterodimerização de CXCR4 e CXCR2 e [CXCR4-Rluc + β-arrestina-2-YFP] para estudar o recrutamento mediado por CXCR4 de β-arrestina-2. No dia seguinte, as células foram distribuídas em placas brancas de 96 MW pré-revestidas de polilisina em meio de cultura completo [DMEM suplementado com 10 % de SFB]. As células foram primeiro cultivadas a 37°C com 5 % de CO₂ de modo a permitir a adesão das células à placa. As células foram então privadas de alimento com 200 μL de DMEM/poço de um dia para o outro. Imediatamente antes do experimento de BRET, o DMEM foi removido e as células foram lavadas rapidamente com PBS. As células foram então incubadas em PBS na presença ou ausência de anticorpo, 15 min a 37°C antes da adição de coelenterazina H 5 μM com ou sem SDF-1 100 nM em um volume final de 50 μL. Após incubação por 5 minutos a 37°C e incubação adicional à temperatura ambiente durante 20 minutos apenas para homo e heterodímeros, a captura de emissão de luz a 485 nm e 530 nm foi iniciada com o uso do leitor multimarcador Mithras

LB940 (Berthold) (1 seg./comprimento de onda/poço repetida 15 vezes à temperatura ambiente).

O cálculo da razão de BRET foi feito conforme anteriormente descrito (Angers et al., 2000): [(emissão 530 nm) - (emissão 485 nm) X Cf]/(emissão 485 nm), onde Cf = (emissão 530 nm)/(emissão 485 nm) para células que expressam a proteína de fusão Rluc sozinha sob as mesmas condições experimentais. A simplificação desta equação mostra que a razão de BRET corresponde à razão de 530/485 nm obtida quando os dois parceiros de BRET estão presentes, corrigida pela razão de 530/485 nm obtida sob as mesmas condições experimentais, quando apenas o parceiro fundido a Rluc está presente no ensaio. Com propósito de legibilidade, os resultados são expressos em unidades de milliBRET (mBU); mBU corresponde à razão de BRET multiplicada por 1000.

O SDF-1 (100 nM) aumentou em cerca de 10% o sinal de BRET resultante da proximidade espacial das proteínas adaptadoras e aceitoras fundidas ao receptor CXCR4, indicando provavelmente a formação de homodímeros de CXCR4/CXCR4 ou alterações conformacionais de dímeros pré-existentes (figura 20A). De forma interessante, o SDF-1 (100 nM) reduziu em cerca de 17 % o sinal de BRET resultante da proximidade espacial das proteínas adaptadoras e aceitoras fundidas a CXCR2 e CXCR4, também indicando provavelmente a formação de heterodímeros de CXCR2/CXCR4 ou alterações conformacionais de dímeros pré-

existentes (figura 20B). Neste último caso, a conformação ativada por SDF-1 de CXCR4/CXCR2 parece menos favorável para a transferência de energia de BRET. Em ambos os casos, os Mabs m414H5, c414H5 e m515H7, c515H7 foram capazes de modular as alterações conformativas induzidas por SDF-1 para homodímeros de CXCR4 (75 % de inibição do aumento de BRET induzido por SDF-1 para c414H5 e 96% de inibição do aumento de BRET induzido por SDF-1 para c515H7, figura 20A) assim como para a formação de heterodímero de CXCR2/CXCR4 (77% de inibição da redução de BRET induzida por SDF-1 para c414H5 e 98% de inibição da redução de BRET induzida por SDF-1 para C515H7, figura 20B). Os Mabs m414H5, c414H5, m515H7 e c515H7 também foram capazes de modular a proximidade espacial de CXCR4/CXCR4 e CXCR2/CXCR4, respectivamente, indicando uma influência destes Mabs sobre a conformação de homodímeros de CXCR4/CXCR4 e heterodímeros de CXCR2/CXCR4 (figuras 20A e 20B).

A ativação de CXCR4 por SDF-1 (100 nM) gerou um forte recrutamento da molécula de sinalização intracelular β -arrestina, conforme mostrado pela intensificação de 400% no sinal de BRET (figura 20C). Este recrutamento foi parcialmente inibido pelos Mabs c414H5 e C515H7 (inibição de cerca de 63% para c414H5 e 93% para c515H7, figura 20C) mostrando o efeito dos Mabs sobre a sinalização.

Exemplo 22: Mobilização mediada pelo receptor CXCR4 dos estoques intracelulares de cálcio

Este ensaio funcional foi projetado para monitorar

a sinalização do receptor CXCR4 através da estimulação da via da fosfolipase C, induzindo a liberação de cálcio a partir dos estoques intracelulares do retículo endoplásmico.

As células CHO-K1 expressando de maneira estável e constitutiva o receptor CXCR4 selvagem foram obtidas conforme descrito no exemplo acima. As células U937 (linfoma humano) foram propagadas em meio de cultura completo, respectivamente [DMEM suplementado com 10% de SFB] e [RPMI 1640 suplementado com 10% SFB, 20 mM HEPES, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato de sódio, 1% de L-glutamina, 4,5 g/L de glicose]. Todos os tipos celulares foram plaqueados em placas de 96MW pretas a uma densidade de 100.000 células/poço em meio de cultura adequado. As células foram privadas de alimento de um dia para o outro antes de conduzir os experimentos. As células são carregadas com corante de cálcio fluorescente (Fluo-4 No Wash, Invitrogen US) em tampão de carregamento [HBSS 1x, HEPES 20 mM, ácido de probenicide 25 mM] durante 30 min. a 37°C seguido de 30 min. a 25°C. A estimulação por SDF-1 foi feita por injeção direta em cada poço. Para os experimentos de antagonismo, 10 µl de solução de Mab são adicionadas diretamente no tampão de carregamento pelo menos 10 min. antes do SDF-1. As medições cinéticas da fluorescência são realizadas em um leitor de microplacas por fluorescência multimodo Mithras LB940 (Berthold) com o uso dos seguintes ajustes: excitação a 485 nm, emissão a 535 nm, energia de excitação a 10000 unidades arbitrárias. A fluorescência em

cada poço é registrada durante 0,1 segundo por segundo e durante um período de tempo de 20 segundos antes da injeção de SDF-1 (sinal basal). A seguir, 20 μ l de SDF-1 são injetados e o registro dos dados ocorreu durante um período de tempo de 2 min. Cada condição experimental é realizada em duplicata. Os valores para cada poço são primeiro corrigidos pela subtração da fluorescência basal e da fluorescência emitida por um poço de controle sem células. Os dados relativos são expressos como uma percentagem da estimulação máxima obtida por SDF-1 (100 nM).

O SDF-1 (100 nM) induziu uma liberação rápida e forte de cálcio intracelular em CHO/CXCR4 recombinante, enquanto nenhum sinal de fluorescência foi detectado em células CHO-K1 naïve. A intensidade máxima atingiu > 140% sobre a fluorescência basal e foi observada cerca de 40 segundos após a estimulação por SDF-1; curvas cinéticas similares foram observadas com células U-937 (figuras 21A, 21B). O anticorpo quimérico c515H7 (133 nM) gerou uma inibição forte e quase completa do sinal de cálcio induzido por SDF-1 (100 nM) em todas as três linhagens celulares investigadas.

Exemplo 23: Efeito dos Mabs anti-CXCR4 murinos m414H5, m515H7 e Mabs quiméricos c414H5, c515H7 sobre a migração de células U937 induzida por SDF-1

Para avaliar o efeito inibidor dos anticorpos monoclonais anti-CXCR4 m414H5, m515H7, c414H5 e c515H7

sobre o processo de migração, 100000 células U-937 em meio RPMI 1640 suplementado com 2% de SFB, foram plaqueadas na câmara superior de câmaras de migração (placas de 24 poços com tamanho dos poros de 8 µm) na presença ou na ausência de SDF- 1 na parte inferior dos poços e com ou sem os Mabs c414H5, m414H5, c515H7 e m515H7 na câmara superior. Neste ensaio, IgG2a e IgG2b murinas foram introduzidas como controles de isotipo. Duas horas após o plaqueamento, as células em migração foram contadas. Os resultados apresentados nas figuras 22A (para c414H5 versus m414H5) e 22B (para c515H7 versus m515H7) demonstraram que, conforme esperado, o SDF-1 foi capaz de induzir um aumento significativo da migração das células U-937. Nenhum efeito foi observado quando as células foram incubadas com o controle isotípico de IgG2 . Em contrapartida, para as células incubadas com os Mabs c414H5, m414H5, c515H7 e m515H7 uma redução significativa e reproduzível na migração de células U937 induzida por SDF-1 foi observada: 50% com os Mabs c414H5 e m414H5 e mais de 80% com os Mabs c515H7 e m515H7.

Exemplo 24: Atividade dos Mabs anti-CXCR4 quiméricos c414H5 e c515H7 em modelo de sobrevivência de ratinhos de U937

Células U937 da ATCC foram cultivadas em meio RPMI 1640, 10% de SFB, 1% de L-glutamina. As células foram repicadas dois dias antes da enxertia para que elas estivessem na fase exponencial do crescimento. Dez milhões de células U937 foram injetadas intraperitonealmente a

ratinhos Nod/Scid fêmeas. Dois dias após a implantação, os ratinhos foram tratados subcutaneamente com uma dose de carregamento de 2 mg de Mab c414H5 ou c515H7/ratino e, então, duas vezes por semana com 1 mg de anticorpo/ratino. Os ratinhos de controle receberam injeções de PBS, uma vez que foi mostrado em estudos anteriores que nenhuma diferença foi observada na sobrevivência entre ratinhos injetados com PBS e ratinhos administrados com um controle isotípico de IgG ratinho. A sobrevivência dos ratinhos foi monitorada todos os dias.

Os resultados descritos na figura 23 mostraram que os ratinhos tratados com os Mabs c414H5 e c515H7 tiveram um aumento dramático e significativo na longevidade com T/C% de cerca de 210 e 180 para c414H5 e c515H7, respectivamente.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> NOVOS ANTICORPOS ANTI-CXCR4 E O USO DOS MESMOS PARA O TRATAMENTO DE CANCRO

<130> D26935

<150> EP 08305631.7

<151> 2008-10-01

<150> US 61/136,772

<151> 2008-10-01

<150> US 61/173,743

<151> 2009-04-29

<160> 71

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 1

Gln Ser Leu Tyr Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 2
<211> 3
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 2

Trp Ala Ser
1

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 3

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr
1 5

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 4

Thr Asp Tyr Tyr
1

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 5

Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr
1 5 10

<210> 6
<211> 7
<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 6

Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 8

Ala Arg Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 10

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 11

Thr Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5

<210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 12

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 13

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Phe Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14
<211> 118
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 14

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Thr Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 15
<211> 36
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 15
cagagtctgt acaacagtag aaccggaaag aactac 36

<210> 16
<211> 9
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 16
tgggcatcc 9

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 17
aagcaatctt ataatcttcg gacg 24

<210> 18
<211> 12
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 18
actgattact ac 12

<210> 19
<211> 30

<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 19
attagaaaaca aagctaatgg ttacacaaca 30

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 20
gatatcccg 9ggttgctta c 21

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 21
gggttcacct tcactgatta ctac 24

<210> 22
<211> 27
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 22
gcaagagata tccccgggtt tgcttac 27

<210> 23
<211> 51
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 23
aaatccagtc agagtctgta caacagtaga acccgaaaga actacttggc t 51

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 24
tgggcatcca ctagggaatc t 21

<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 25
actgattact acatgagc 18

<210> 26
<211> 57
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 26
tttattagaa acaaagctaa tggcacaca acagagtaca gtgcacatgtt gaagggt 57

<210> 27
<211> 336
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 27
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
atgagctgca aatccagtc gagtctgtac aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggt 120
tggtaaccagg agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcaccagtg tgcaggctga ggacctggca gtttttact gcaagcaatc ttataatctt 300
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 28
<211> 354
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 28
gagggtgaaggc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtacagc ctgggggttc tctgagactc 60
tcctgtacaa cttctgggtt caccttact gattactaca tgagctgggt ccgccagtct 120
ccaggaaagg cacttgagtg gttgactttt attagaaaca aagctaattgg ttacacaaca 180
gagttacagtg catctgtgaa gggtcgggttc accatctcca gagataattc ccaaagcatc 240
ctctatcttc aaatgaacac cctgagagct gaggacagtg ccacttatta ctgtgcaaga 300
gatatccccgg ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 29
<211> 352
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 29

Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
1 5 10 15

Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu
20 25 30

Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
35 40 45

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
50 55 60

Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
65 70 75 80

Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val
85 90 95

Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val
100 105 110

His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala
115 120 125

Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser
130 135 140

Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val
145 150 155 160

Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn
165 170 175

Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn
180 185 190

Asp Leu Trp Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu
195 200 205

Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser
210 215 220

Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr
225 230 235 240

Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr
245 250 255

Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln
260 265 270

Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
275 280 285

Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe
290 295 300

Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val

305	310	315	320
Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly			
325	330	335	
His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser			
340	345	350	
<210> 30			
<211> 356			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 30			
Met Ser Ile Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr			
1	5	10	15
Thr Glu Glu Met Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys			
20	25	30	
Phe Arg Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile			
35	40	45	
Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile			
50	55	60	
Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr			
65	70	75	80
Arg Leu His Leu Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro			
85	90	95	
Phe Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu			
100	105	110	
Cys Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val			
115	120	125	
Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His			
130	135	140	
Ala Thr Asn Ser Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val			
145	150	155	160
Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe			
165	170	175	
Ile Phe Ala Asn Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg			
180	185	190	
Phe Tyr Pro Asn Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile			
195	200	205	

Met Val Gly Leu Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys
210 215 220

Ile Ile Ile Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys
225 230 235 240

Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp
245 250 255

Leu Pro Tyr Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu
260 265 270

Ile Ile Lys Gln Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile
275 280 285

Ser Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile
290 295 300

Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala
305 310 315 320

Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly
325 330 335

Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser
340 345 350

Phe His Ser Ser
355

<210> 31
<211> 360
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 31

Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys
1 5 10 15

Gly Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe
20 25 30

Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys
35 40 45

Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu
50 55 60

Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg
65 70 75 80

Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu
85 90 95

Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
100 105 110

Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val
115 120 125

Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg
130 135 140

Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr
145 150 155 160

Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu
165 170 175

Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val
180 185 190

Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg
195 200 205

Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu
210 215 220

Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys
225 230 235 240

Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val
245 250 255

Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu
260 265 270

Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg
275 280 285

Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile
290 295 300

Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys
305 310 315 320

Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser
325 330 335

Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser
340 345 350

Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu
355 360

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 32
gaaactctgc attctcgctt cctg 24

<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 33
aggactcggtt tgtacccgtt ga 22

<210> 34
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 34
tgcaagattgg ctacccaact gttgca 26

<210> 35
<211> 22
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 35
ctccttcatc ctcctggaaa tc 22

<210> 36
<211> 22
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 36
ccaaggaaag catagaggat gg 22

<210> 37
<211> 22
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 37
gtggtcatta tctatgcctt gg 22

<210> 38
<211> 22
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 38
cgacccttgct gtataagatg ac 22

<210> 39
<211> 25
<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 39
tattcctgct gagcctgctg ggaaa 25

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 40

Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 41

Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr
1 5

<210> 42
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42

Asp Asn Tyr
1

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 43

Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Tyr
1 5

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 45

Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 46

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 47

Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 48

Asp Asn Tyr Met Ser
1 5

<210> 49
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 49

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Arg Gly

<210> 50

PE2342233

- 143 -

<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 50

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 51
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 51

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

PE2342233

- 144 -

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52
<211> 36
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 52
cagagtctgt tcaacagtcg aacccgaaag aactac 36

<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 53
atgcaatctt ttaatcttcg gacg 24

<210> 54
<211> 9
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 54
gataactac 9

<210> 55
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 55
gatgtcggtt ccaactactt tgactac 27

<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 56
gggttcacct tcactgataa ctac 24

<210> 57
<211> 33
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 57
gcaagagatg tcggttccaa ctacttgac tac 33

<210> 58
<211> 51
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 58
aaatccagtc agagtctgtt caacagtcga acccgaaaga actacttggc t 51

<210> 59
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 59
tgggcattcg ctagggattc t 21

<210> 60
<211> 15
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 60
gataactaca tgagt 15

<210> 61
<211> 57
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 61
tttattagaa acaaagctaa tggcacaca acagactaca gtgcacatctgt gagggg 57

<210> 62
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 62
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtaact 60
atgagctgca aatccagtca gagtctgttc aacagtcga cccgaaagaa ctacttggt 120
tggtaaccaggc agaagccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccgctagg 180
gattctgggg tccctgctcg cttcacaggc agtggatctg agacatattt cactctcacc 240
atcagccgtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcatgcaatc tttaatctt 300
cgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 63
<211> 360
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 63
gagggtgaacc tgggtggagtc tggaggaggc ttggcacagc ctgggggttc tctgagactc 60

tcctgtgcaa cttctgggtt caccttcact gataactaca ttagttgggt ccgccagcct 120
ccagggaaagg cacttgagtg gttgggctt attagaaaca aagctaattg ttacacaaca 180
gactacagtg catctgtgag gggtcgggtc accatctcaa gagataattc ccaaagcatc 240
ctctatcttc aaatgaacgc cctgagagcc gaagacagtg ccacttatta ctgtgcaaga 300
gatgtcggtt ccaactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

<210> 64
<211> 239
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 64

Met Glu Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Tyr Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Phe
100 105 110

Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 65

<211> 467

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 65

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

Phe Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Ala Leu
50 55 60

Glu Trp Leu Thr Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu
65 70 75 80

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95

Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 66
<211> 239
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 66

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg
65 70 75 80

Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 67
<211> 469
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 67

Met Lys Met Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly

1	5	10	15
Ile Gln Cys Glu Val Asn Leu Val	Glu Ser Gly Gly Gly	Leu Val Gln	
20	25	30	
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe			
35	40	45	
Thr Asp Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu			
50	55	60	
Glu Trp Leu Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp			
65	70	75	80
Tyr Ser Ala Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser			
85	90	95	
Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser			
100	105	110	
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr			
115	120	125	
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly			
130	135	140	
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly			
145	150	155	160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val			
165	170	175	
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
180	185	190	
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val			
195	200	205	
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val			
210	215	220	
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys			
225	230	235	240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu			
245	250	255	
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
260	265	270	
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
275	280	285	
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
290	295	300	

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 68
<211> 720
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 68
atggagtcac aggccaggt tcttatattg ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60
gacatttgta tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtaact 120
atgagctgca aatccagtca gagtctgtac aacagttagaa cccgaaagaa ctactggct 180
tggtaccaggc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcaccagtg tgcaggctga ggacctggca gtttttact gcaagcaatc ttataatctt 360
cggaacctcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta cggtggccgc tcccagcgtg 420
ttcatcttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 480

ctgaacaact tctaccccaag ggaggccaag gtgcagtggaa aggtggacaa cgccctgcag 540
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 600
agcagcaccc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 660
gtgacccacc accaagagct tcaacagggg cgagtgctga 720
<210> 69
<211> 1404
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 69
atgaagctgt ggctgaactg ggtgttcctg gtgaccctgc tgaacggctt ccagtgcgaa 60
gtgaaactgg tggagtctgg cggcgactg gtgcagccag gcggcagcct gagactgagc 120
tgcaccacct ccggcttcac cttcaccgac tactacatga gctgggtgcg ccagagcccc 180
ggcaaggccc tggaaatggct gacccatc cggaaacaagg ccaacggcta caccaccgag 240
tacagcgcca gcgtgaaggg ccggttcacc atcagccggg acaacagcca gagcatcctg 300
tacctgcaga tgaacaccct gcgggcccgg gactccgca cctactactg cgccagagac 360
atccccggct tcgcctactg gggccagggc accctggta ccgtgtccgc cgccagcacc 420
aagggcccaa gcgtgttccc gctagccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc 480
gccctgggct gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgac ctggAACAGC 540
ggagccctga cctccggcgt gcacacccctc cccgcccgtgc tgccagagcag cggcctgtac 600
agcctgagca gcgtggtgac cgtgcccagc agcagcctgg gcacccagac ctacatctgt 660
aacgtgaacc acaagccag caacaccaag gtggacaaga gagttggagcc caagagctgt 720
gacaagaccc acacccctgccc cccctgccc gccccccggc tgctggcgg acccagcgtg 780
ttcctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 840
tgtgtgggtgg tggacgtgac ccacgaggac ccagaggtga agttcaactg gtacgtggac 900
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtacaa cagcacctac 960
agggtgtgtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020
tgtaaggtgt ccaacaaggc cctgccagcc ccaatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1080
ggccagccaa gagagccca ggtgtacacc ctgccacccca gcagggagga gatgaccaag 1140
aaccaggtgt ccctgacactg tctggtgaaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1260
gacggcagct tcttcctgtt cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcaggc 1320
aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1380
ctgagcctgt ccccaggcaa gtga 1404

<210> 70
<211> 720
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 70
atggagtcac agactctggt cttcatatcc atactgctct gtttatatgg tacctgtgg 60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120
at gagctgca aatccagtca gagtctgttc aacagtcgaa cccgaaagaa ctacttggt 180
tggtaaccagc agaagccagg gcagtctcct aaactgctga tctactggc atccgctagg 240
gattctgggg tccctgctcg cttcacagggc agtggatctg agacatattt cactctcacc 300
atcagccgtg tgcaaggctga agacctggca gtttattact gcatgcaatc ttttaatctt 360
cgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta cggggccgc tcccgctgt 420
ttcatcttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca cggccagcgt ggtgtgtctg 480
ctgaacaact tctacccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cggccctgcag 540
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 600
agcagcaccc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 660
tgtgacccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtga 720

<210> 71
<211> 1410
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 71
atgaagatgt ggctgaactg ggtgttcctg gtgaccctgc tgaacggcat ccagtgcgaa 60
gtgaacctgg tggagtctgg cggcggactg gtgcagcctg gggcagcct gagactgagc 120
tgcgccacct cccgcttcac cttcaccgac aactacatga gctgggtgcg ccagccccct 180
ggcaaggccc tggaaatggct gggcttcata cggaaacaagg ccaacggcta caccaccgac 240
tacagcgcca gcgtgcgggg cagattcacc atcagccggg acaacagcca gagcatcctg 300
tacctgcaga tgaacgcccgc tggggccgag gacagcgcca cctactactg tgcccgggac 360

gtgggcagca actacttcga ctactggggc cagggcacca cactgaccgt gtccagcgcc 420
agcaccaagg gcccctccgt gttcccgcta gccccagca gcaagagcac cagcggcgcc 480
acagccgccc tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg agcccggtgac cgtgtcctgg 540
aacagcggag ccctgacctc cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 600
ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gcctgggcac ccagacctac 660
atctgtAACG tgaaccacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagagagt ggagccaag 720
agctgtgaca agacccacac ctgccccccc tgcccagccc ccgagctgct gggcggaccc 780
agcgtgttcc tggccccccc caagcccaag gacaccctga tcatcagcag aaccccgag 840
gtgacctgtg tggtggtgga cgtgtccac gaggacccag aggtgaagtt caactggtag 900
gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag accaagccca gagaggagca gtacaacagc 960
acctacaggg tggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
tacaagtgtta aggtgtccaa caaggccctg ccagcccaa tcgaaaagac catcagcaag 1080
gccaaaggcc agccaagaga gccccaggtg tacaccctgc cacccagcag ggaggagatg 1140
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtgaagggtct tctacccaag cgacatcgcc 1200
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccgag aacaactaca agaccacccc cccagtgtg 1260
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag cagatggcag 1320
cagggcaacg tgttcagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 1380
aagagcctga gcctgtcccc aggcaagtga 1410

Lisboa, 25 de setembro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a seleção de um anticorpo anti-CXCR4, ou um de seus fragmentos funcionais, em que o referido fragmento funcional é selecionado entre os fragmentos Fv, Fab, (Fab')2, scFv, scFv-Fc e diacorpos, capaz de inibir a ativação de CXCR4, **caracterizado por compreender** as seguintes etapas:

i) triagem dos anticorpos gerados e selecionar os anticorpos capazes de ligar especificamente a CXCR4 e também modular a ativação de CXCR4;

ii) testar os anticorpos selecionados na etapa i) e selecionar os anticorpos capazes de induzir alteração conformacional dos homodímeros de CXCR4, e então

iii) testar os anticorpos selecionados na etapa ii) e selecionar os anticorpos capazes de induzir alteração conformacional dos heterodímeros de CXCR4/CXCR2.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa ii) consiste em avaliar os anticorpos por análise com BRET em células que expressam CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP e selecionar anticorpos capazes de inibir pelo menos 40% do sinal do BRET.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, em

que a etapa iii) consiste em avaliar os anticorpos por análise com BRET em células que expressam CXCR4-RLuc/CXCR2-YFP e selecionar anticorpos capazes de inibir pelo menos 40% do sinal do BRET.

4. Anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, em que o referido fragmento funcional é selecionado entre os fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, scFv, scFv-Fc e diacorpos, capaz de inibir a ativação de CXCR4, **caracterizado por** o referido anticorpo ser selecionado no grupo constituído por:

a) um anticorpo compreendendo:

- uma cadeia leve que comprehende, de acordo com IMGT, a CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 1, a CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 2 e a CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 3; e
- uma cadeia pesada que comprehende, de acordo com IMGT, a CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 7, a CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 5 e a CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 8;

b) um anticorpo compreendendo:

- uma cadeia leve que comprehende, de acordo com Kabat, a CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 9, a CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 10 e a CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 3; e

- uma cadeia pesada que comprehende, de acordo com Kabat, a CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 11, a CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 12 e a CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 6;

c) um anticorpo comprehendendo:

- uma cadeia leve que comprehende, de acordo com IMGT, a CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 40, a CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 2 e a CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 41; e
- uma cadeia pesada que comprehende, de acordo com IMGT, a CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 44, a CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 5 e a CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 45;

d) um anticorpo comprehendendo:

- uma cadeia leve que comprehende, de acordo com Kabat, a CDR-L1 da sequência SEQ ID No. 46, a CDR-L2 da sequência SEQ ID No. 47 e a CDR-L3 da sequência SEQ ID No. 41;
- uma cadeia pesada que comprehende, de acordo com Kabat, a CDR-H1 da sequência SEQ ID No. 48, a CDR-H2 da sequência SEQ ID No. 49 e a CDR-H3 da sequência SEQ ID No. 43.

5. Anticorpo, ou fragmento funcional do mesmo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por o**

referido anticorpo ser selecionado no grupo constituído por:

- a) um anticorpo que comprehende uma sequência de cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 13, e que comprehende uma sequência de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 14; e
- b) um anticorpo que comprehende uma sequência de cadeia leve que comprehende a aminoácidos SEQ ID No. 50, e que comprehende uma sequência de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 51.

6. Anticorpo secretado por um hibridoma murino selecionado a partir do hibridoma depositado no CNCM, Instituto Pasteur, Paris, em 22 de outubro de 2007, sob o número I-3860 ou depositado no CNCM, Instituto Pasteur, Paris, em 25 de junho de 2008, sob o número I-4019.

7. Anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** consistir num anticorpo quimérico.

8. Anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** o referido anticorpo ser selecionado no grupo constituído por:

- a) um anticorpo quimérico que compreende uma sequência de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 64, e que compreende uma sequência de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 65; e
- b) um anticorpo quimérico que compreende uma sequência de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 66, e que compreende uma sequência de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 67.

9. Ácido nucleico isolado **caracterizado por** o referido ácido nucleico ser um ácido nucleico, DNA ou RNA, que codifica um anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8;

10. Vetor, que compreende um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 9.

11. Célula hospedeira, que compreende um vetor de acordo com a reivindicação 10.

12. Animal transgénico, com exceção de seres humanos, que compreende uma célula transformada por um vetor de acordo com a reivindicação 10.

13. Método para produzir um anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, em que o referido fragmento

funcional é selecionado entre os fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, scFv, scFv-Fc e diacorpos, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 8, **caracterizado por** o dito método compreender as seguintes etapas:

- cultura em um meio e nas condições de cultura adequadas para uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 11; e
- recuperação do dito anticorpo, ou um fragmentos funcional do mesmo, assim produzido a partir do meio de cultura ou a partir das ditas células cultivadas.

14. Anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 8, para uso como um fármaco.

15. Composição, que compreende como um ingrediente ativo um composto que consiste em um anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 8 e 14.

16. Composição, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada por** compreender, adicionalmente, como um produto combinado para uso de uma forma simultânea, separada ou prolongada, um anticorpo antitumoral diferente de um anticorpo dirigido contra CXCR4.

17. Composição, de acordo com as reivindicações 15 ou 16, **caracterizada por** compreender, adicionalmente,

como um produto combinado ou conjugado, para uso em uma forma simultânea, separada ou prolongada, um agente citotóxico/citostático, uma toxina celular e/ou um radioisótopo.

18. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, para uso como um fármaco.

19. Anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 8 e 16, e/ou composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, como um fármaco para modular a atividade de CXCR4 em uma célula.

20. Anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 8 e 16, e/ou composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, para a prevenção ou tratamento de cancro.

21. Anticorpo, ou um fragmento funcional do mesmo, e/ou composição de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado por** o dito cancro ser um cancro selecionado do grupo que consiste em cancro de próstata, osteossarcoma, cancro de pulmão, cancro de mama, cancro endometrial, mieloma múltiplo, cancro de ovário, cancro pancreático e cancro de cólon.

22. Hibridoma murino selecionado a partir do hibridoma depositado no CNCM, Instituto Pasteur, Paris, em 22 de outubro de 2007, sob o número I-3860 ou depositado no CNCM, Instituto Pasteur, Paris, em 25 de junho de 2008, sob o número I-4019.

Lisboa, 25 de setembro de 2014

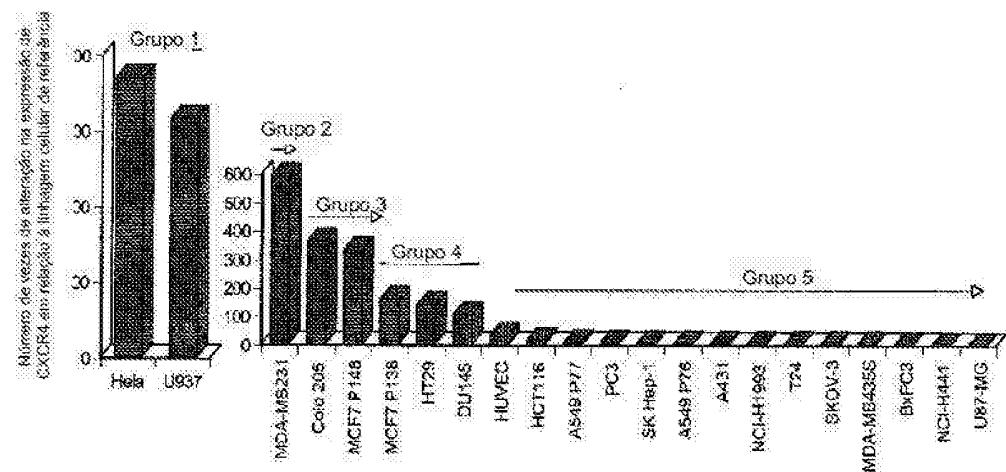


FIG. 1A

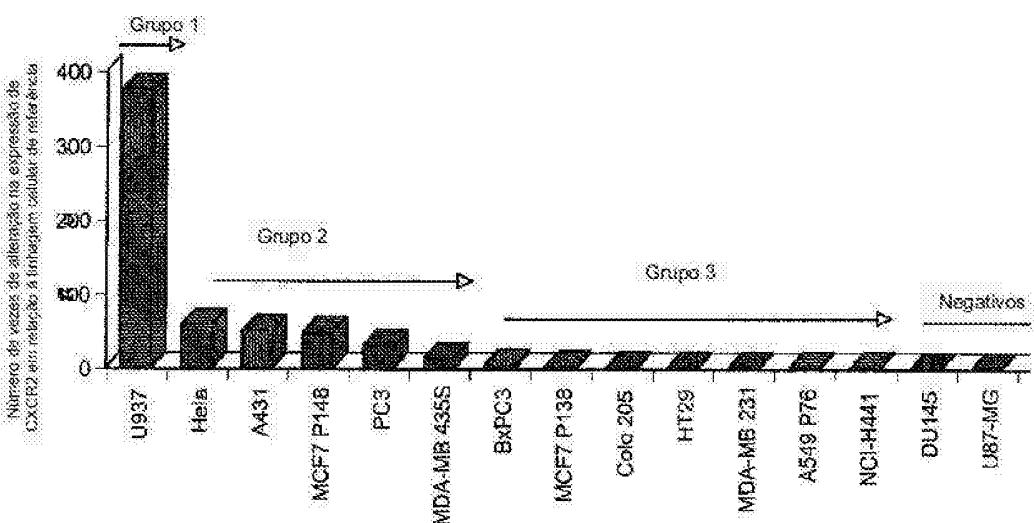


FIG. 1B

PE2342233

2/20

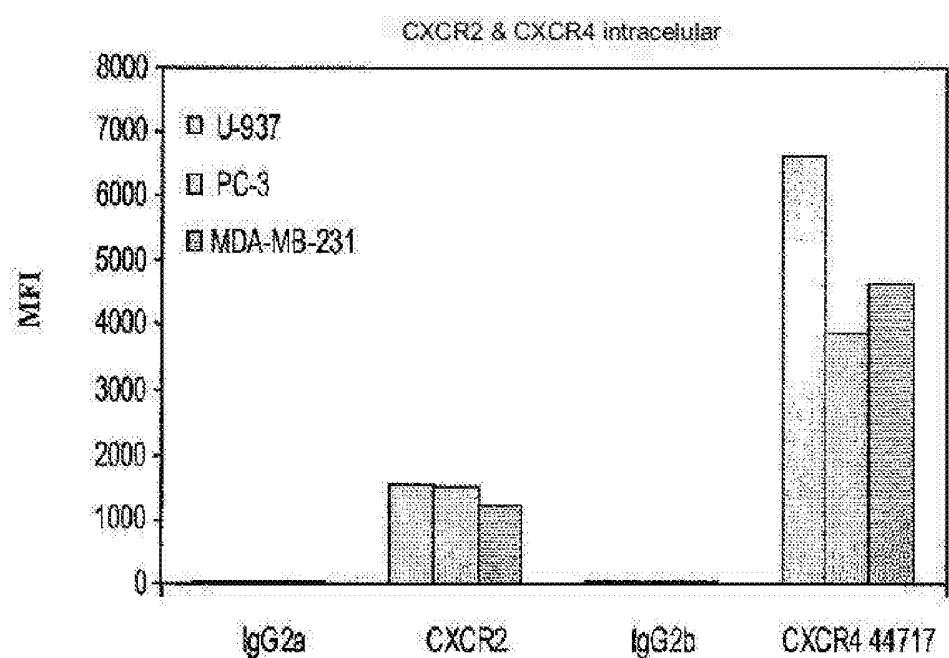


FIG. 2

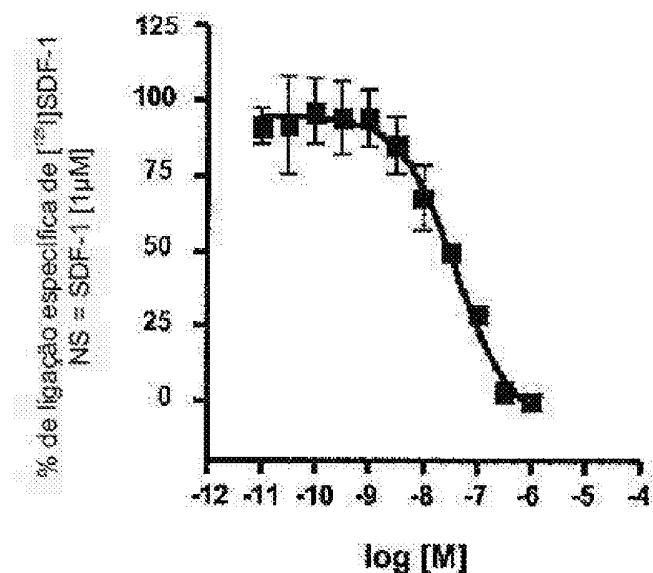


FIG. 3A

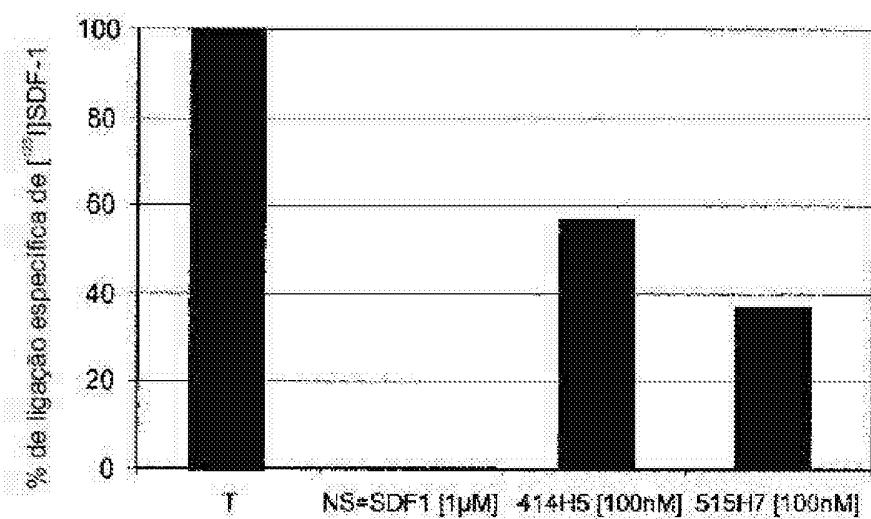


FIG. 3B

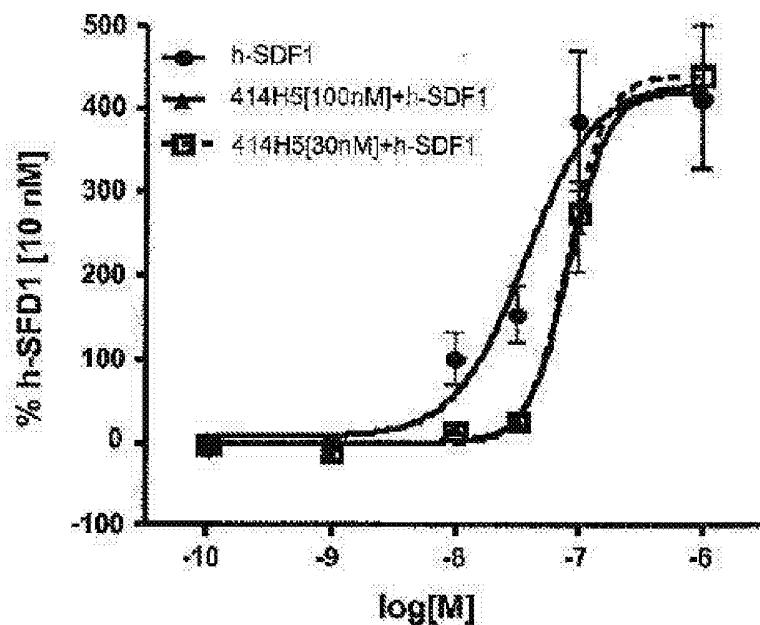


FIG. 4A

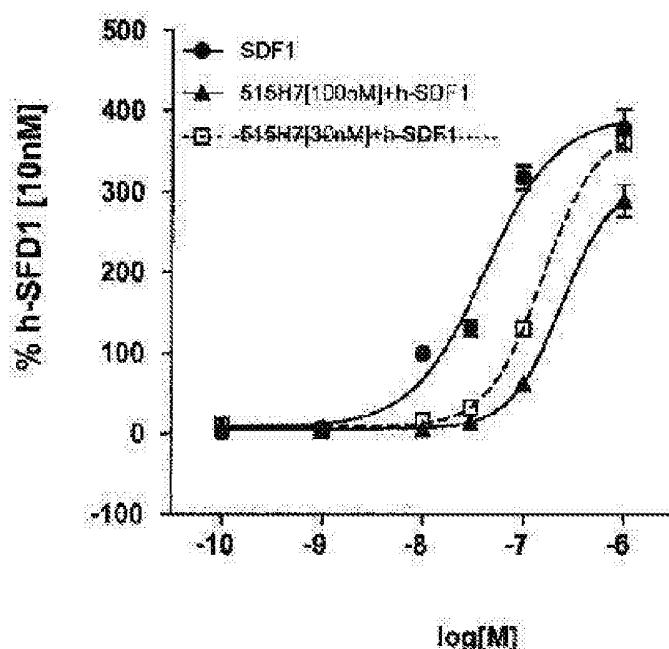


FIG. 4B

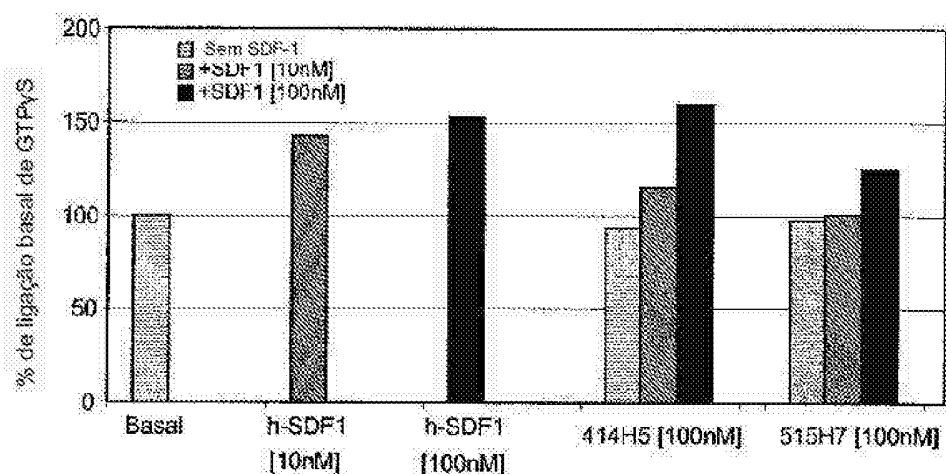


FIG. 5

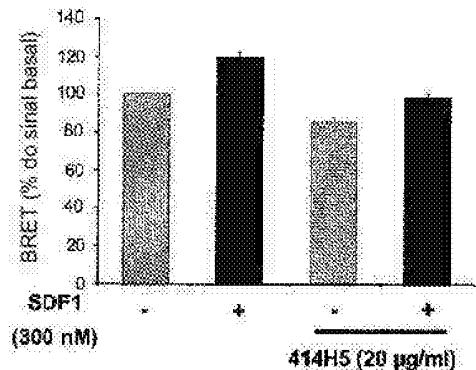


FIG. 6A

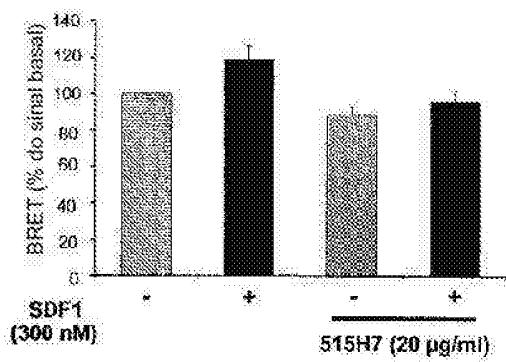


FIG. 6B

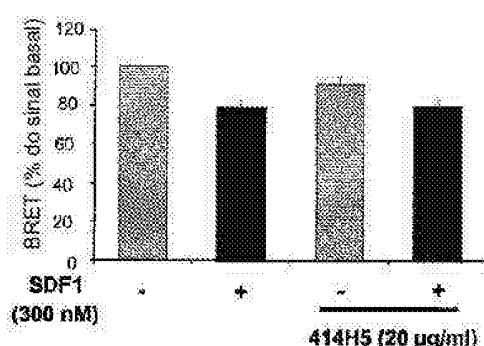


FIG. 6C

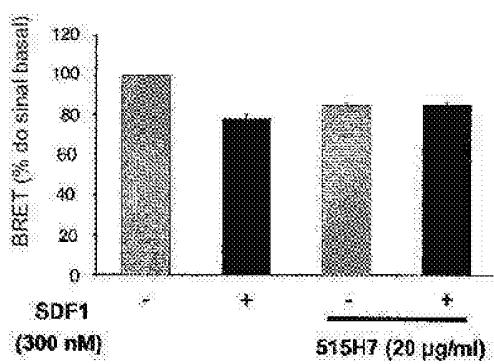


FIG. 6D

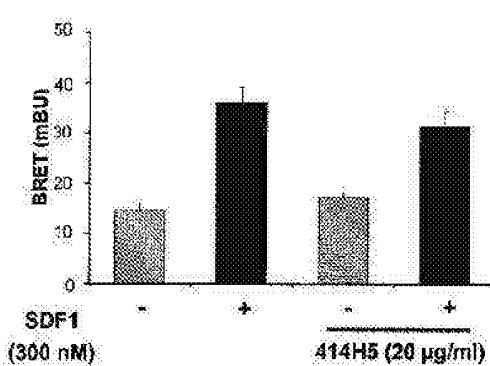


FIG. 6E

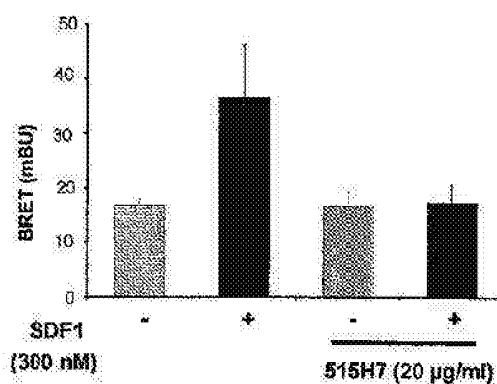


FIG. 6F

PE2342233

7/20

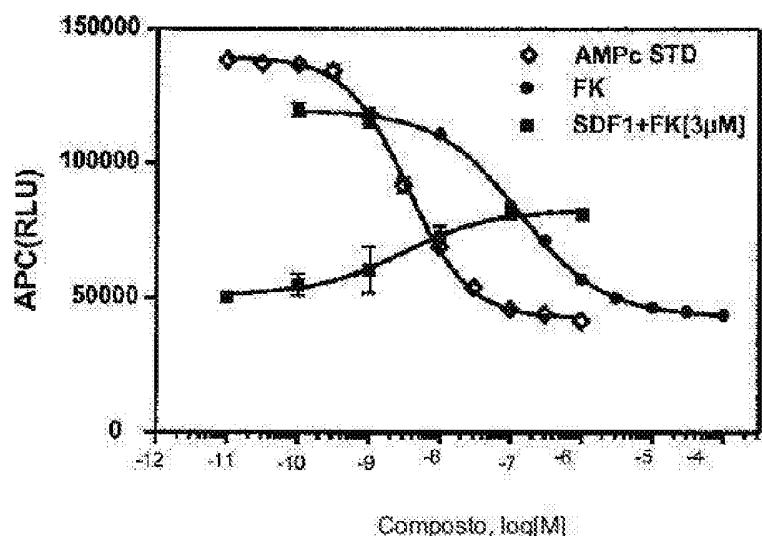


FIG. 7A

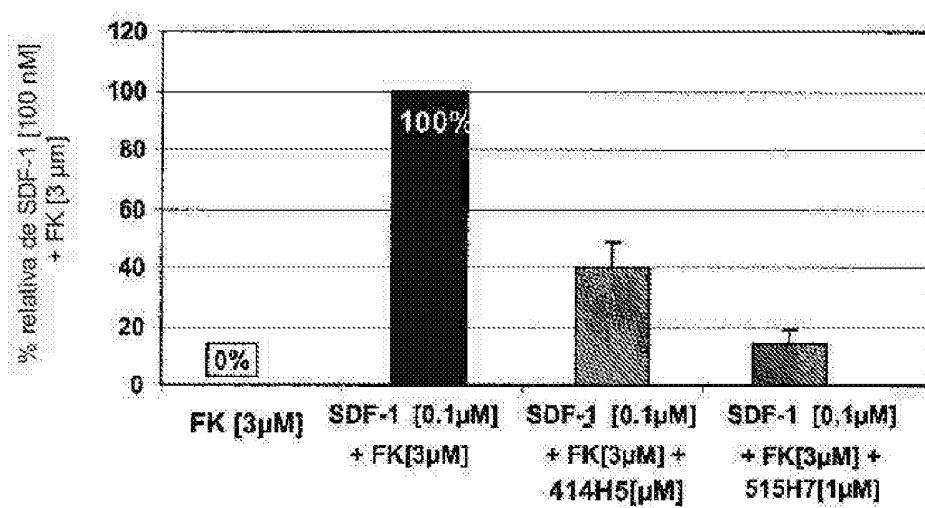


FIG. 7B

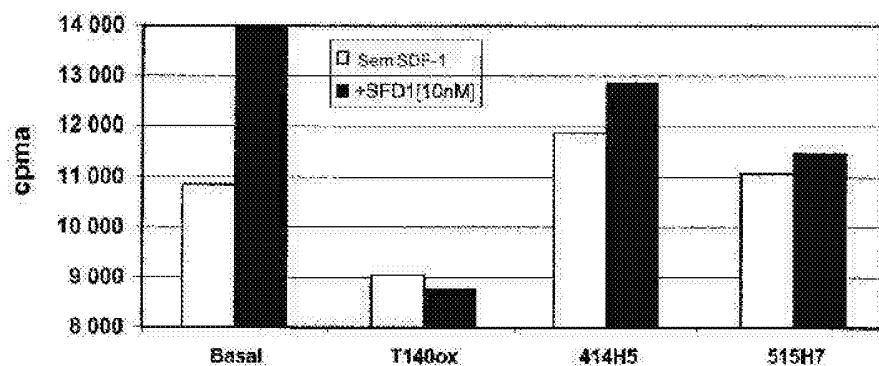


FIG. 8

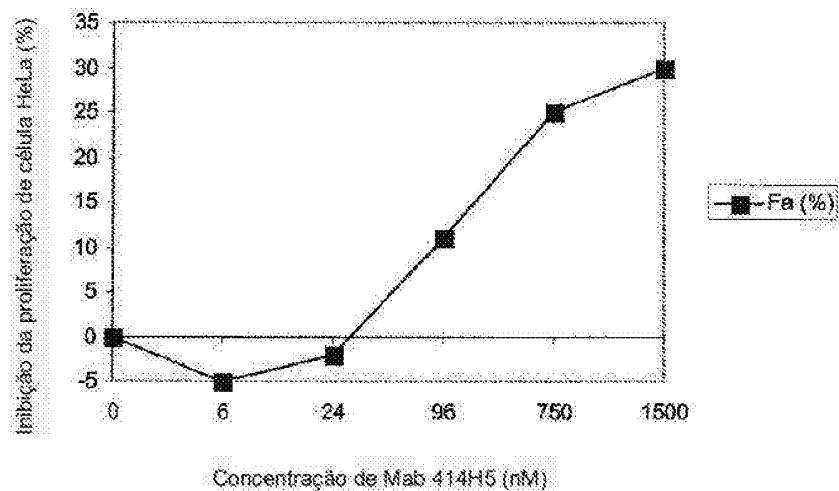


FIG. 9

PE2342233

9/20

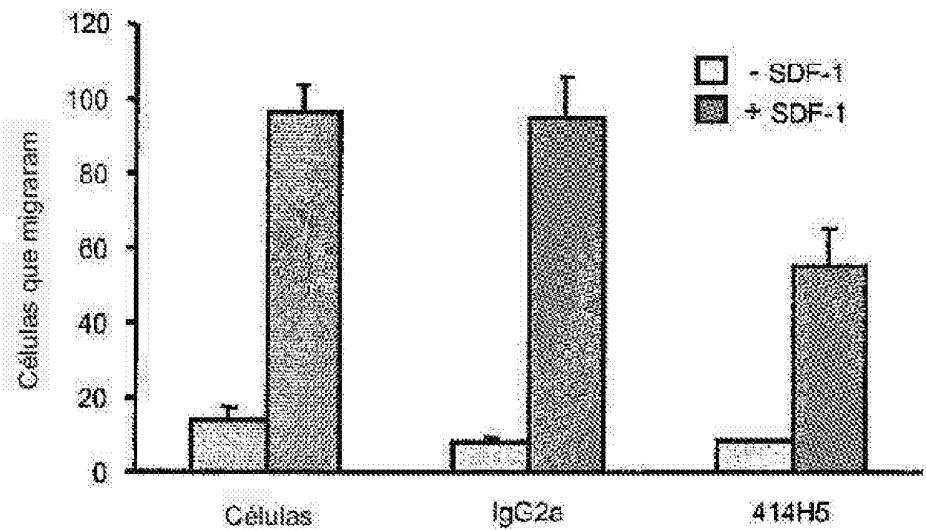


FIG. 10A

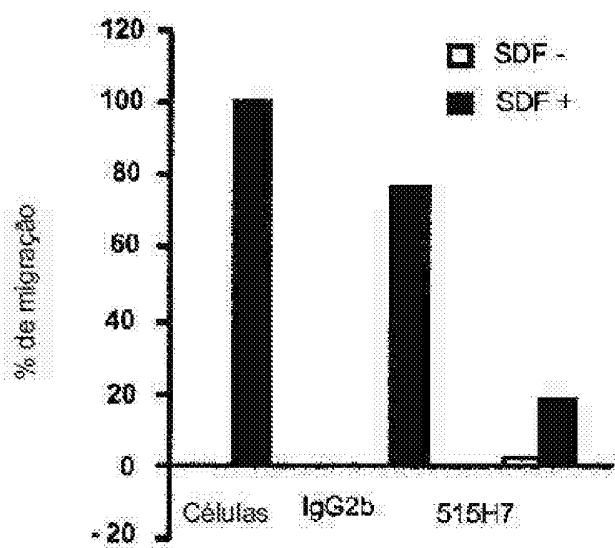
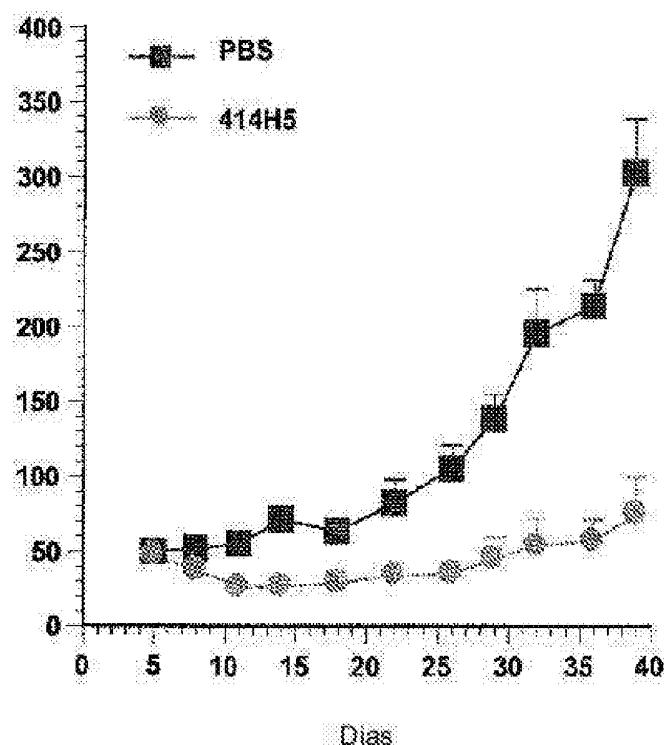


FIG. 10B

PE2342233

10/20

A



B

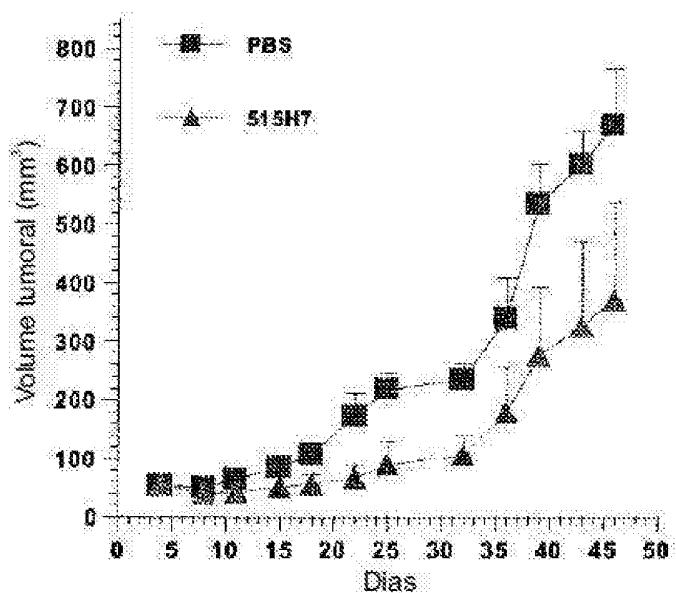


FIG. 11

PE2342233

11/20

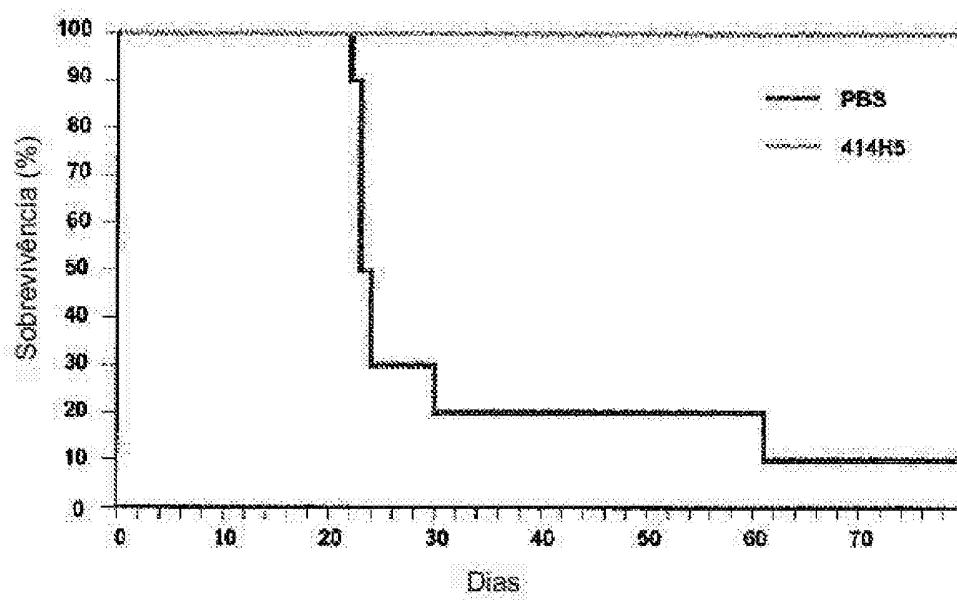


FIG. 12

PE2342233

12/20

Efeito do anticorpo 515H7 (20 μ g/mL) sobre a liberação de cálcio de células CHO CXCR4 induzida por SDF-1 100 nM

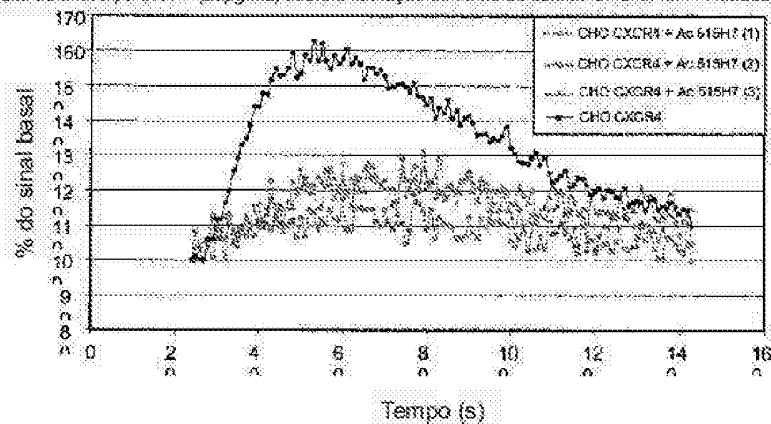


FIG. 13A

Efeito do anticorpo 515H7 (20 μ g/mL) sobre a liberação de cálcio de células MDA-MB 231 induzida por SDF-1 100 nM

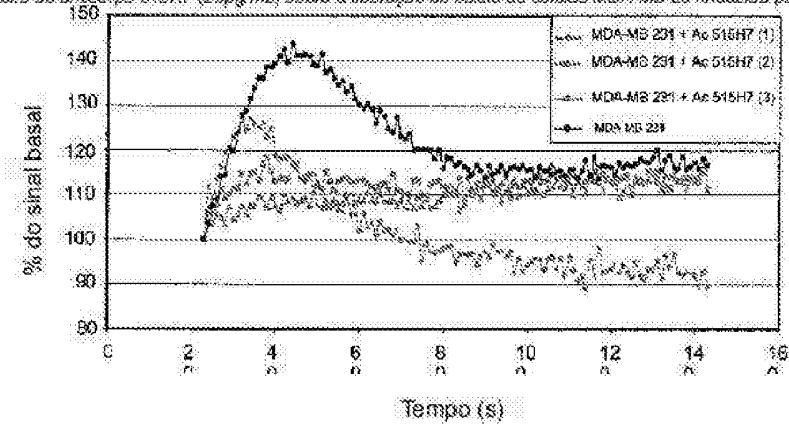


FIG. 13B

Efeito do anticorpo 515H7 (20 μ g/mL) sobre a liberação de cálcio de células U937 induzida por SDF-1 100 nM

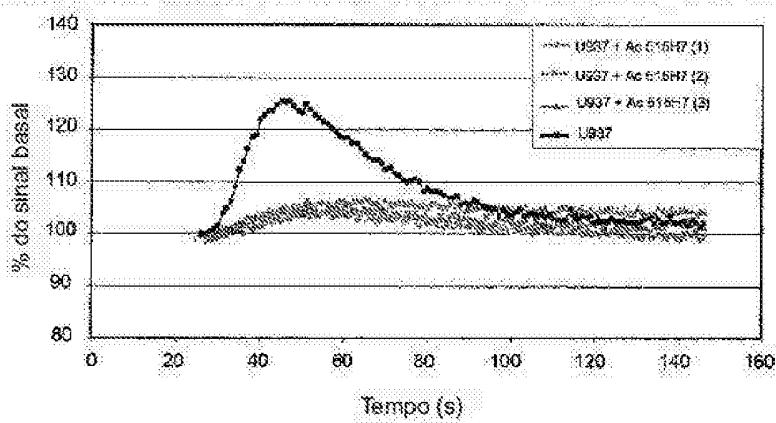


FIG. 13C

PE2342233

13/20

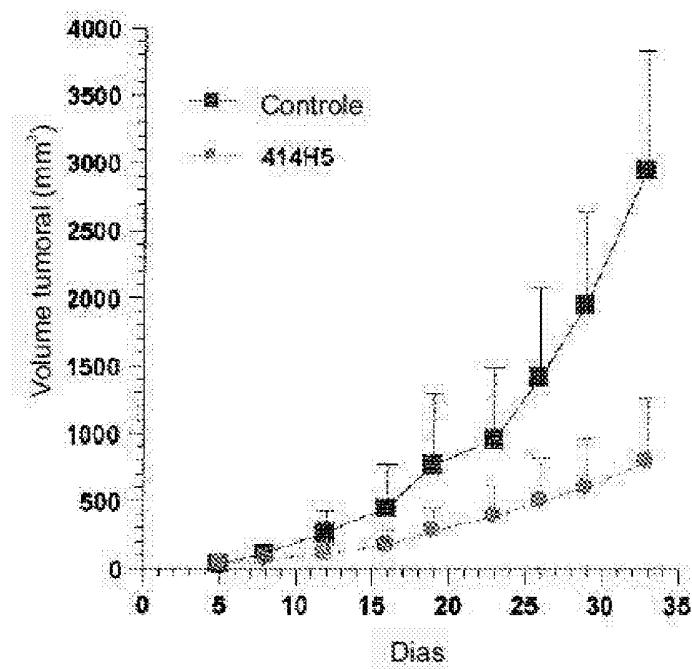


FIG. 14

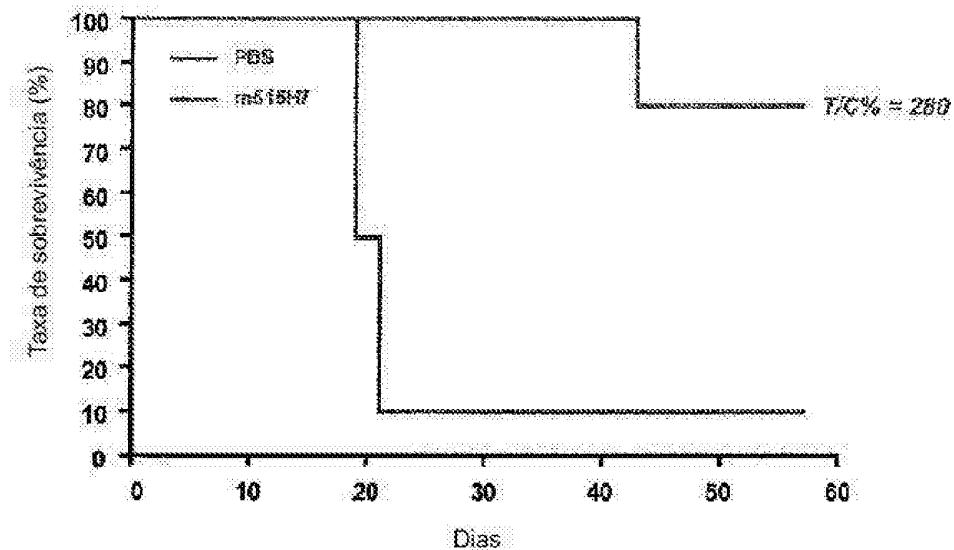


FIG. 15

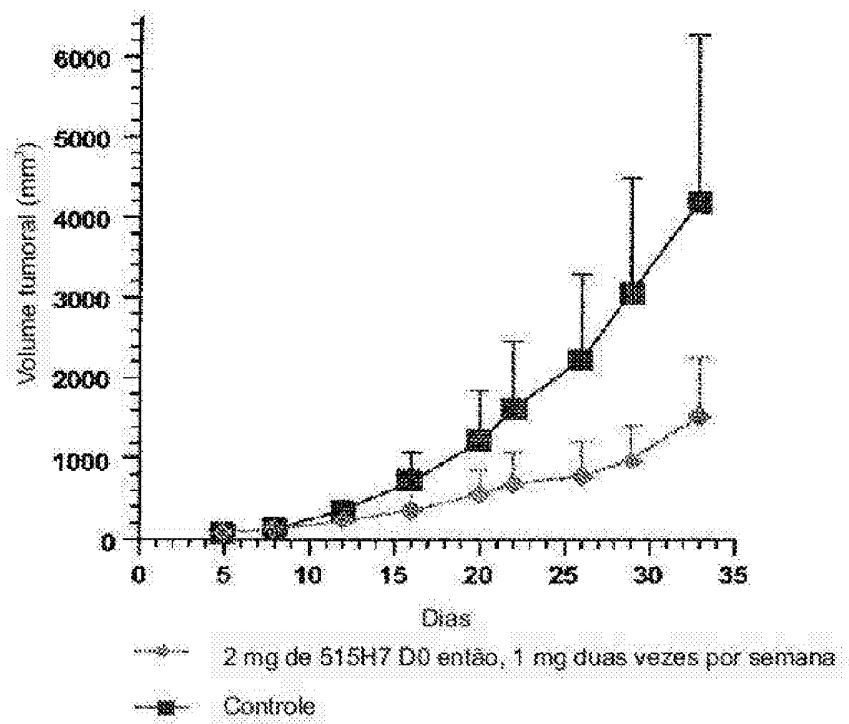


FIG. 16

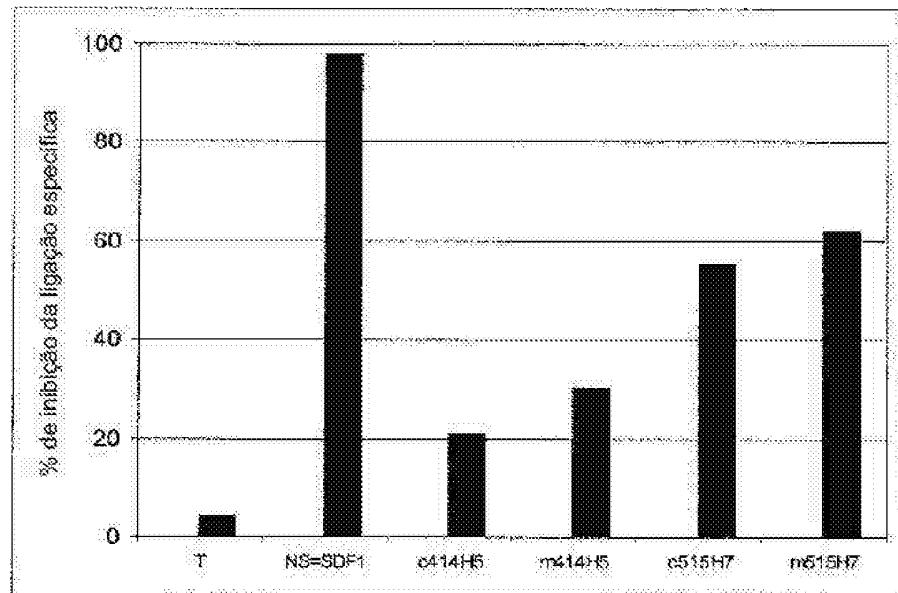


FIG. 17

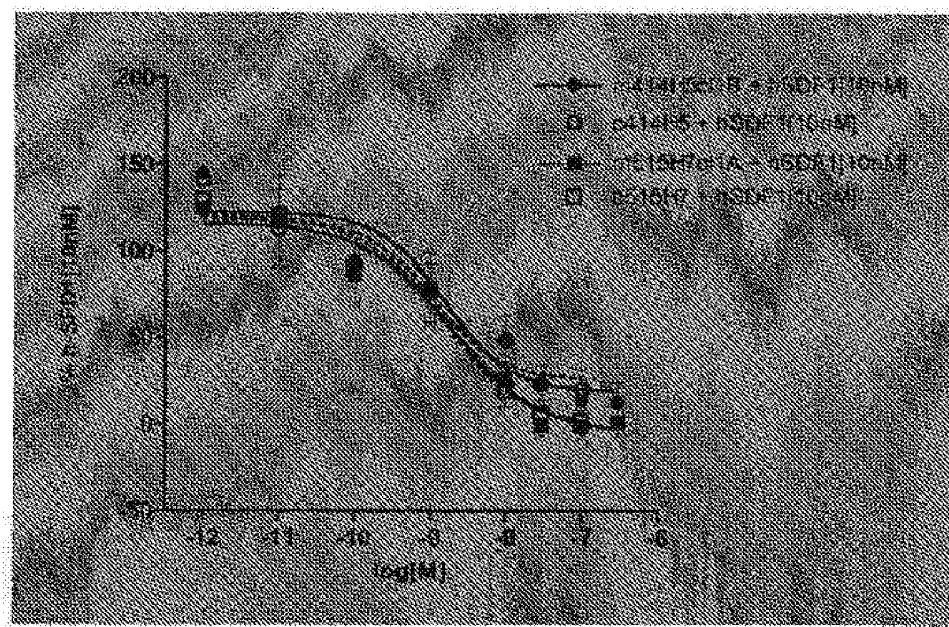


FIG. 18

PE2342233

16/20

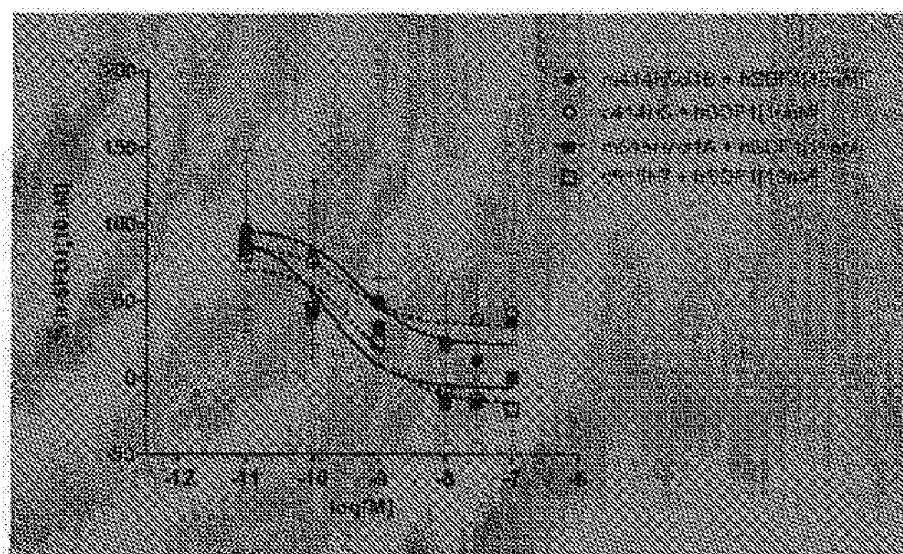


FIG. 19

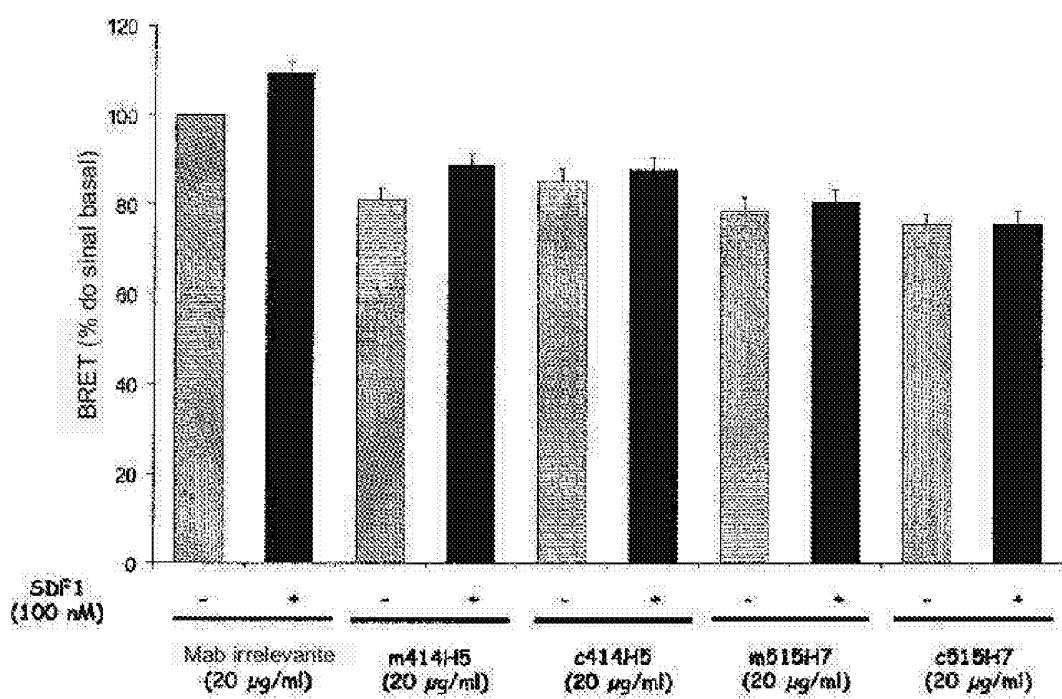


FIG. 20A

PE2342233

17/20

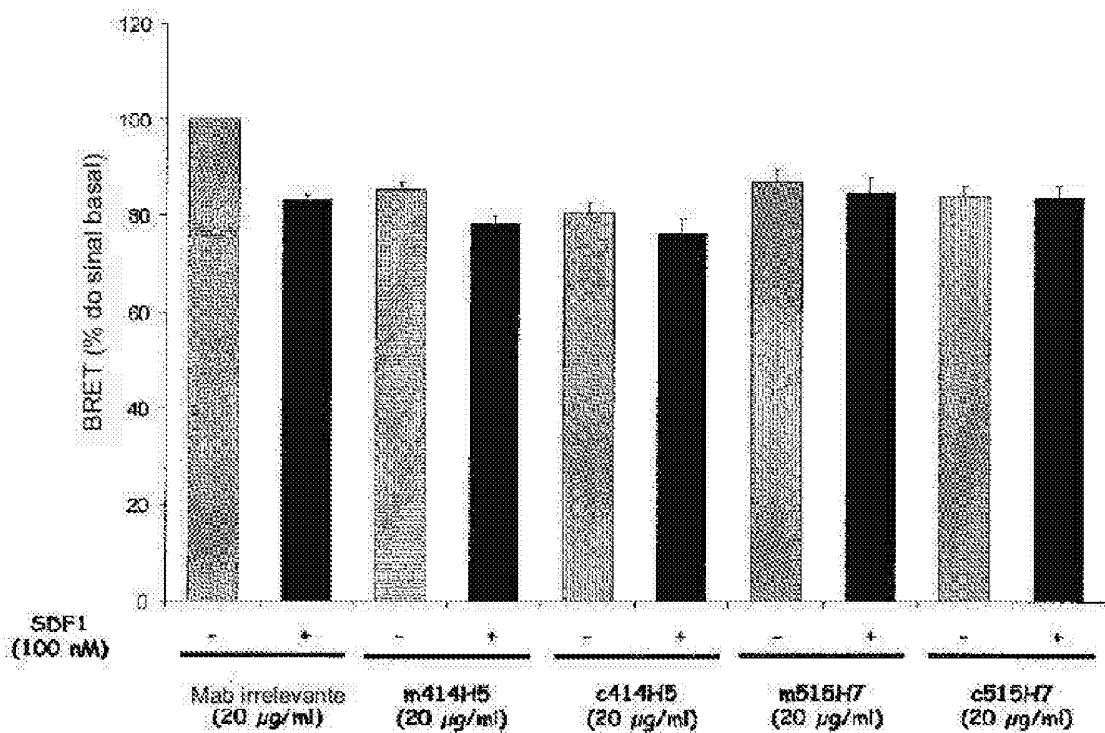


FIG. 20B

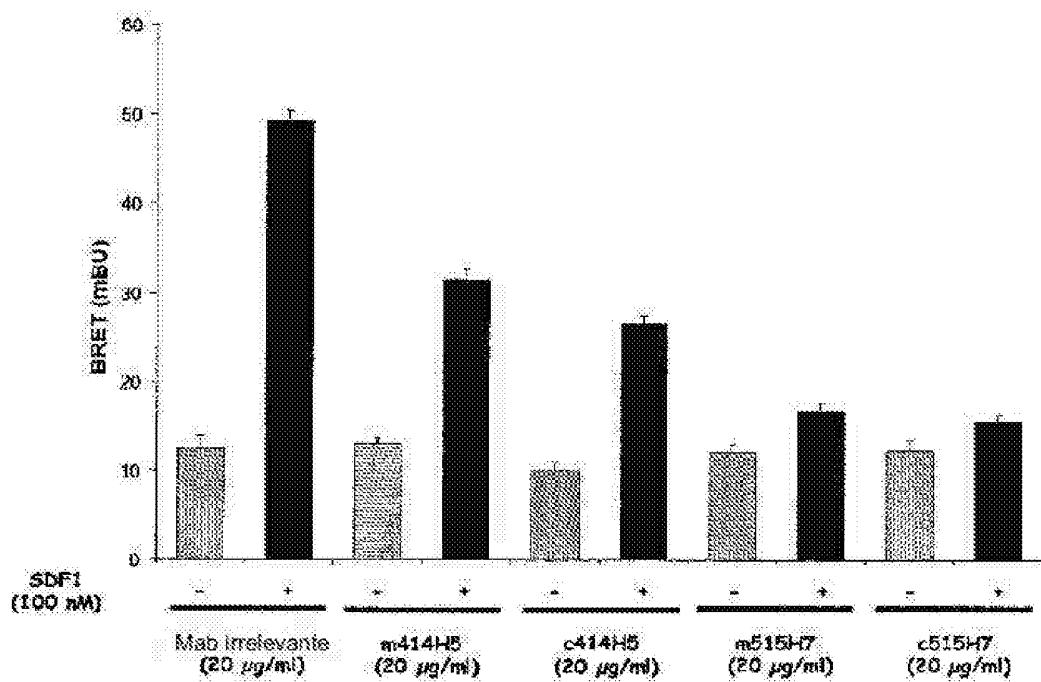


FIG. 20C

PE2342233

18/20

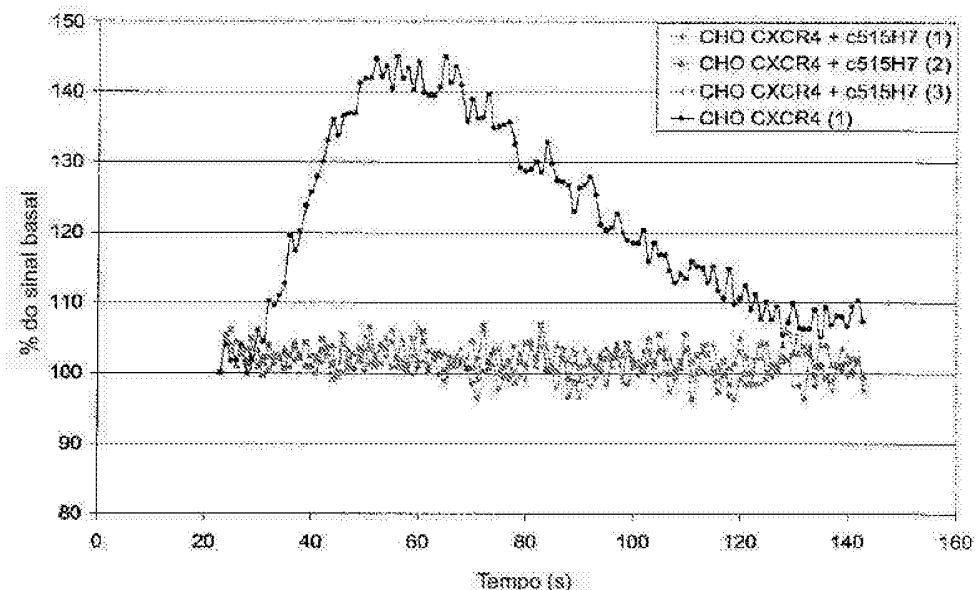


FIG. 21A

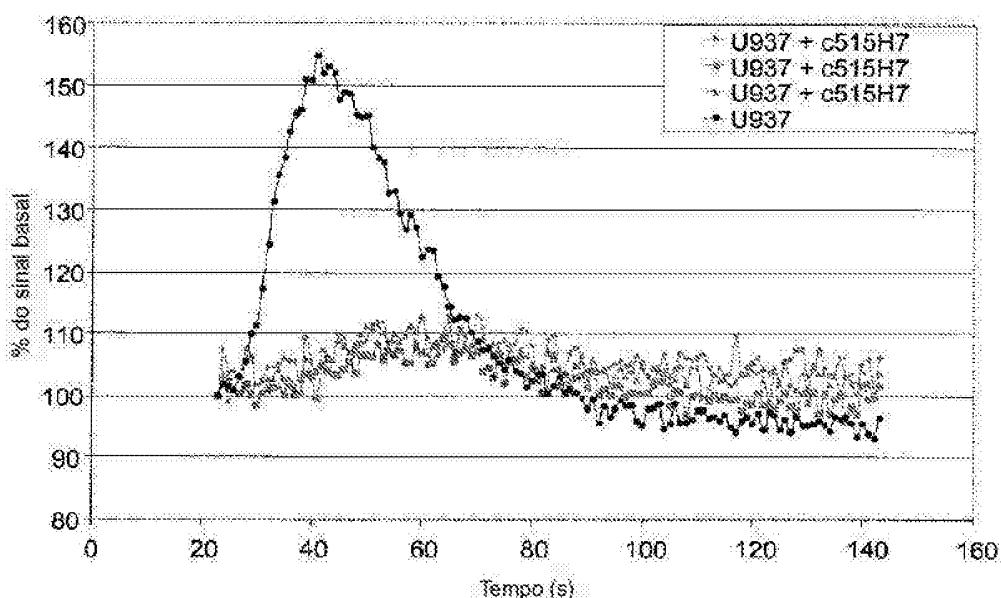


FIG. 21B

PE2342233

19/20

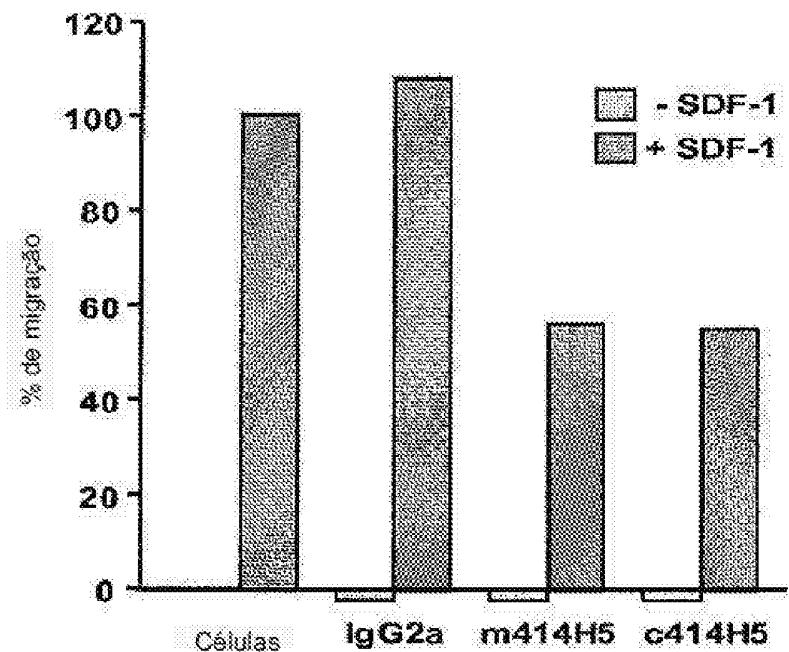


FIG. 22A

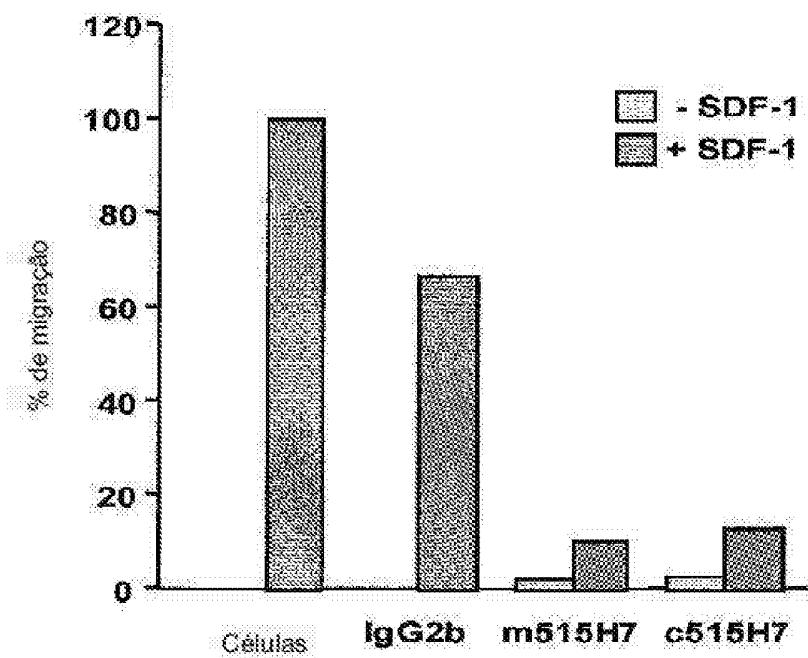


FIG. 22B

PE2342233

20/20

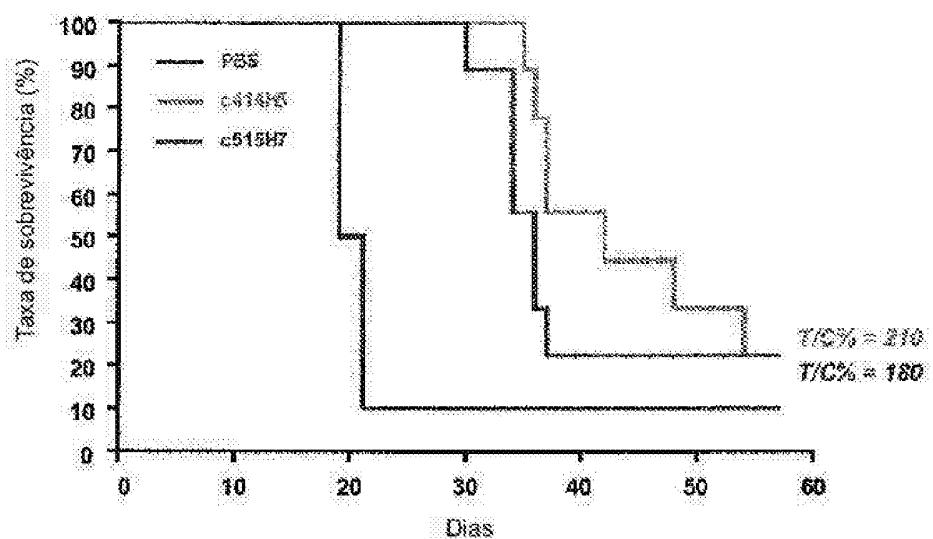


FIG. 23

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz técnica do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 2004059285 A2
- WO 04059285 A
- EP 0451261 A
- EP 0682040 A
- EP 0939127 A
- EP 0566647 A
- US 5530101 A
- US 6180370 B
- US 5585089 A
- US 5693761 A
- US 5639641 A
- US 6054297 A
- US 5886152 A
- US 5877293 A
- US 4831175 A
- US 4424200 A, Crookford
- US 4479930 A, Hnatowich
- EP 08305631 A
- US 61136772 B
- US 61173743 B

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- CARNEC et al. *J Virol*, 2005, vol. 79 (3), 1930-1933
- REEVES et al. *J Gen Virol*, 1998, vol. 78, 1793-1798
- OTTAIANO et al. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, vol. 54 (8), 781-791
- BARIBAUD et al. *J. Virol.*, 2001, vol. 75 (19), 8957-8967
- KOHLER ; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497
- ANGERS et al. *PNAS*, 2000, vol. 97, 3684-89 [0043]
- KABAT et al. Sequences of proteins of immunological interest. U.S. Department of Health and Human Services, 1991
- LEFRANC M.-P. *Immunology Today*, 1997, vol. 18, 509
- LEFRANC M.-P. *The Immunologist*, 1999, vol. 7, 132-136
- LEFRANC, M.-P. ; POMMIÉ, C. ; RUIZ, M. ; GIUDICELLI, V. ; FOULQUIER, E. ; TRUONG, L. ; THOUVENIN-CONTET, V. ; LEFRANC. *Dev Comp Immunol*, 2003, vol. 27, 55-77
- RUIZ, M. ; LEFRANC, M.-P. *Immunogenetics*, 2002, vol. 53, 857-883
- KAAS, Q. ; LEFRANC, M.-P. *Current Bioinformatics*, 2007, vol. 2, 21-30
- KAAS, Q. ; RUIZ, M. ; LEFRANC, M.-P. T cell receptor and MHC structural data. *Nucl Acids Res*, 2004, vol. 32, D208-D210
- SMITH ; WATERMAN. *Ad App Math*, 1981, vol. 2, 482
- NEDDLEMAN ; WUNSCH. *J. Mol Biol*, 1970, vol. 48, 443
- PEARSON ; LIPMAN. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, vol. 85, 2444
- TATUSOVA et al. *Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences*. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, vol. 174, 247-250
- SKERRA A. *J. Mol. Recogn.*, 2000, vol. 13, 167-187
- SKERRA A. *J. Biotechnol*, 2001, vol. 74 (4), 257-75
- KCHL et al. *PNAS*, 2003, vol. 100 (4), 1700-1705
- BES et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, vol. 343 (1), 334-344
- NICIAISE et al. *Protein Science*, 2004, vol. 13 (7), 1882-1891
- BES et al. *FEBS letters*, 2001, vol. 508, 67-74
- VERHOEYEN et al. *BioEssays*, 1988, vol. 8, 74
- JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525
- VERHOEYEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327
- SINGER et al. *J. Immun*, 1992, vol. 150, 2844-2857
- MOUNTAIN et al. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1992, vol. 10, 1-142
- BEBBINGTON et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 169-175
- SAMBROOK et al. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001
- STEWARD et al. Solid phase peptides synthesis. Pierce Chem Company, 1984
- HOLLINGER ; BORLEN. *Cancer and metastasis*, rev., 1999, vol. 18, 411-419
- GLENNIE MJ et al. *J. Immunol*, 1987, vol. 139, 2367-2375
- REPP R. et al. *J. Hemat*, 1995, 377-382

- STAERZ U.D. ; BEVAN M.J. *PNAS*, 1986, vol. 83, 1453-1457
- SURESH M.R. et al. *Method Enzymol.*, 1986, vol. 121, 210-228
- MERCHAND et al. *Nature Biotech.*, 1998, vol. 16, 677-681
- PARK et al. *Mol. Immunol.*, 2000, vol. 37 (18), 1123-30
- Therapeutic chemistry. Antitumor drugs and perspectives in the treatment of cancer. French Association of Therapeutic Chemistry Teachers, 2003, vol. 6
- HUNTER W.M. ; GREENWOOD F.C. *Nature*, 1962, vol. 194, 495