



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

(11) BR 112014010383-6 B1



(22) Data do Depósito: 05/11/2012

(45) Data de Concessão: 01/02/2022

(54) Título: ANTICORPO HUMANIZADO, OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO, IMUNOCONJUGADO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/28.

(30) Prioridade Unionista: 03/11/2011 EP 11306416.6.

(73) Titular(es): PIERRE FABRE MEDICAMENT.

(72) Inventor(es): CHARLOTTE BEAU-LARVOR; LILIANE GOETSCH; NICOLAS BOUTE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2012071833 de 05/11/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/064685 de 10/05/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/04/2014

(57) Resumo: PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO E USO DO MESMO COMO PRODUTO DIRECIONADO A ALVO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER. A presente invenção refere-se a uma proteína de ligação a antígeno, em particular, um anticorpo monoclonal, capaz de se ligar especificamente à proteína Axl, bem como as sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos que codificam a dita proteína. Sob um aspecto, a invenção refere-se a uma proteína de ligação a antígeno, ou fragmentos de ligação a antígeno, capaz de se ligar especificamente a Axl e, mediante indução de internalização de Axl, ser internalizada na célula. A invenção também compreende o uso da dita proteína de ligação a antígeno, como um produto de direcionamento em conjugação com outros compostos anticâncer, tais como toxinas, radioelementos ou fármacos, bem como a utilização dos mesmos para o tratamento de certos cânceres

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"ANTICORPO HUMANIZADO, OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO
AO ANTÍGENO DO MESMO, IMUNOCONJUGADO E COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA".**

[001] A presente invenção refere-se a uma nova proteína de ligação ao antígeno, em particular, um anticorpo monoclonal, capaz de se ligar especificamente à proteína Axl, assim como se refere às sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos que codificam a proteína. Sob um aspecto, a invenção refere-se a uma nova proteína de ligação ao antígeno, ou fragmentos que se ligam a antígenos, capaz de se ligar especificamente a Axl e, por meio de indução de internalização de Axl, ser internalizada na célula. A invenção também compreende a utilização dessa proteína de ligação ao antígeno como um produto direcionado a alvo em conjugação com outros compostos anticâncer, tais como toxinas, radioelementos ou fármacos, e sua utilização para o tratamento de certos cânceres.

[002] "Axl" (também referida como "Ufo", "Ark" ou "Tyro7") foi clonada de pacientes com leucemia mieloide crônica como um oncogene que desencadeia a transformação quando superexpressa por rato NIH3T3. Ela pertence a uma família de receptores tirosina quinases (RTQs) chamada família TAM (Tyro3, Axl, Mer), que inclui Tyro3 (Rse, Sky, Dtk, Etk, Brt, Tif), Axl e Mer (Eyk, Nyk, Tyro-12) [Lemke G. *Nat. Rev. Immunol.* (2008).8, 327-336].

[003] A proteína humana Axl é uma proteína de 894 aminoácidos cuja sequência está representada na listagem de sequências como SEQ ID NO: 29. Os aminoácidos 1-25 que correspondem ao peptídeo de sinal, a proteína humana Axl, sem o peptídeo de sinal, estão representados na listagem de sequências como SEQ ID NO: 30.

[004] Gas6, inicialmente isolado na forma de gene específico de parada de crescimento, é o ligante comum para os membros da

família TAM [Varnum B.C. e colaboradores, *Nature* (1995).373, 623-626]. Gas6 exibe a afinidade mais elevada para Axl, seguido de Tyro3 e finalmente de Mer [Nagata K. e colaboradores, *J. Biol. Chem.* (1996). 271, 30022-30027]. Gas6 consiste em um domínio rico em γ -carboxiglutamato (Gla) que media a ligação com membranas de fosfolipídios, quatro domínios similares a fator de crescimento epidérmico, e dois domínios similares a laminina G (LG) [Manfioletti G., Brancolini, C, Avanzi, G. & Schneider, C. *Mol. Cell Biol.* (1993).13, 4976-4985]. Como muitos outros RTQs, ligação de ligantes resulta em dimerização de receptores e auto-fosforilação de resíduos de tirosina (resíduos de tirosina 779, 821 e 866 para o receptor Axl) que servem como locais de ancoragem para uma variedade de moléculas sinalizadoras intracelulares [Linger, R.M., *Adv. Cancer Res.* (2008).100, 35-83]. Além disso, o receptor Axl pode ser ativado por um processo independente de ligante. Essa ativação pode ocorrer quando o receptor Axl é superexpresso.

[005] Tem-se demonstrado que a sinalização Gas6/Axl regula vários processos celulares que incluem proliferação, adesão, migração e sobrevivência celular em uma grande variedade de células *in vitro* [Hafizi, S. & Dahlback, B. *FEBS J.* (2006).273, 5231-5244]. Além disso, os receptores TAM estão envolvidos no controle de imunidade inata; eles inibem as respostas inflamatórias a agentes patogênicos em células dendríticas (CDs) e macrófagos. Eles também conduzem a fagocitose de células apoptóticas por meio dessas células imunes e são necessários para a maturação e atividade de morte de células assassinas naturais (ANs) [Lemke, G. *Nat. Rev. Immunol.* (2008).8, 327-336].

[006] Fracamente expresso em células normais, ele é observado predominantemente em fibroblastos, células progenitoras mieloides, macrófagos, tecidos neurais, músculo cardíaco e esquelético, em que

ele sustenta principalmente sobrevivência celular. O sistema Gas6/Axl desempenha um papel importante em biologia vascular por meio de regulação da homeostase de células de músculo liso vascular [Korshunov, V.A., Mohan, A.M., Georger, M.A. e Berk, B.C., *Circ. Res.* (2006).98, 1446-1452; Korshunov, V.A., Daul, M., Massett, M.P. & Berk, B.C., *Hypertension* (2007).50, 1057-1062].

[007] Em células tumorais, Axl desempenha um papel importante na regulação da invasão celular e migração. Superexpressão de Axl está associada não apenas a mau prognóstico, mas também a aumento da capacidade de invasão de vários cânceres humanos como relatado para câncer de mama, cólon, carcinoma de esôfago, hepatocelular, gástrico, glioma, pulmão, melanoma, osteossarcoma, ovário, próstata, rabdomiossarcoma, renal, tireoide e do endométrio uterino [Linger, R.M., *Adv. Cancer Res.* (2008).100, 35-83, e Verma A., *Mol. Cancer Ther.* (2011).10, 1763-1773, para revisões]. No câncer de mama, Axl parece ser um forte efetador da transição epitelial-mesenquimal (TEM); o programa TEM contribui ativamente para a migração e disseminação de células cancerosas no organismo [Thiery, J.P., *Curr. Opin. Cell Biol.* (2003).15, 740-746].

[008] Tem sido também demonstrado que Axl regula angiogênese. Com efeito, silenciamento de Axl em células endoteliais prejudicou a formação e migração do tubo [Holland, S.J. e colaboradores. *Cancer Res.* (2005).65, 9294-9303], bem como vias de sinalização angiogênica específica perturbada [Li, Y. e colaboradores. *Oncogene* (2009).28, 3442-3455].

[009] Mais recentemente, vários estudos sobre uma gama de modelos celulares descreveram o envolvimento de uma superexpressão de Axl em fenômenos de resistência a fármacos. A tabela 1 seguinte resume esses estudos.

Tabela 1

Referência	Tipo de câncer	Agente terapêutico	Modelo celular
Macleod e colaboradores, 2005	Câncer de ovário	Cisplatina	PE01/PE01CDD P
Mahadevan e colaboradores, 2007	GIST	Imatinib inibidor de c-kit/PDGFR	GIST882 >GIST-R
Lay e colaboradores, 2007	NSCLC	Doxorubicina	Clones CL1 Clones CL1-5F4
Hong e colaboradores, 2008	AML	Doxorubicina/ Cisplatina	U937
Liu e colaboradores, 2009	Câncer de Mama	Lapatinib (Inibidor de HER1 e HER2)	HER2 (+) BT474 (J4)
Keating e colaboradores, 2010	Astrocitoma	Temozolomida Carboplatina Vincristina	G12 A172
Ye e colaboradores, 2010	NSCLC	Eriotinib	HCC827

[0010] Referências completas citadas na tabela 1 são as seguintes:

- MacLeod, K. e colaboradores. *Cancer Res.* (2005).65, 6789-6800
- Mahadevan, D. e colaboradores. *Oncogene* (2007),26, 3909-3919
- Lay, J.D. e colaboradores. *Cancer Res.* (2007).67, 3878-3887
- Hong, C.C. e colaboradores. *Cancer Lett.* (2008).268, 314-324
- Liu, L. e colaboradores. *Cancer Res.* (2009).69, 6871-6878
- Keating, A.K. e colaboradores. *Mol. Cancer Ther.* (2010).9, 1298-1307
- Ye, X. e colaboradores. *Oncogene* (2010).29, 5254-5264

[0011] Nesse contexto, Axl RTQ é considerada como um alvo de interesse em oncologia. Vários grupos já desenvolveram estratégias antitumorais visando o eixo gas6/Axl, utilizando anticorpos monoclonais nus ou pequenas moléculas direcionadas a alvo [Verma, A. *Mol. Cancer Ther.* (2011).10, 1763-1773].

[0012] Em uma primeira modalidade de realização, a invenção refere-se a uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento dessa proteína o qual se liga a antígeno, que: i) se liga especificamente à proteína humana Axl, e ii) é internalizada após sua ligação à proteína

humana Axl.

[0013] De modo mais geral, a invenção refere-se ao uso da proteína Axl para a seleção de uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, capaz de ser internalizada após sua ligação ao alvo Axl. Mais particularmente, o alvo é o domínio extracelular de Axl.

[0014] Neste aspecto particular, a presente invenção é, assim, dirigida a um método *in vitro* para o rastreio de um composto, ou um fragmento de ligação desse composto, capaz de transportar ou internalizar uma molécula de interesse em células de mamíferos, essa molécula de interesse ligando-se de forma covalente ao composto, em que o método compreende as seguintes etapas:

selecionar um composto que é capaz de se ligar especificamente à proteína Axl, ou ao domínio extracelular (DEC) da mesma, ou a um epítipo dela;

opcionalmente, ligar-se covalentemente à molécula de interesse, ou a uma molécula de controle, no composto selecionado na etapa a) para formar um complexo;

contatar o composto selecionado na etapa a), ou o complexo obtido na etapa b), com uma célula de mamífero, de preferência células viáveis, que expressa em sua superfície a proteína Axl, ou um fragmento funcional dessas proteína;

determinar se o composto, ou a molécula de interesse ou o complexo, foi transportado ou internalizado intracelularmente na célula de mamífero; e

selecionar o composto como um composto capaz de transportar-se ou internalizar-se em uma molécula de interesse em uma célula viável de mamífero.

[0015] Numa modalidade de realização preferida, o composto capaz de transportar ou internalizar uma molécula de interesse em uma

célula viável de mamífero é uma proteína (também aqui designado polipeptídeo ou peptídeo) ou um composto semelhante a proteína que compreende uma estrutura peptídica, particularmente uma sequência de aminoácido, de pelo menos 5, 10, 15 ou mais resíduos de aminoácidos; o(s) resíduo(s) de aminoácidos pode(m) ser glicosilado(s).

[0016] Quando o composto capaz de transportar ou internalizar uma molécula de interesse em uma célula viável de mamífero é uma proteína ou um composto semelhante a proteína, o composto é também aqui chamado de "proteína de ligação ao antígeno"; a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, pode:

- i) ligar-se especificamente à proteína Axl, de preferência à proteína humana Axl, e
- ii) ser internalizada em uma célula de mamífero após sua ligação à proteína Axl, quando a proteína Axl é expressa na superfície da célula de mamífero.

[0017] Em uma modalidade de realização preferida, a célula viável de mamífero é uma célula humana, preferencialmente uma célula que expressa naturalmente o receptor da proteína Axl.

[0018] Em uma modalidade de realização particular, as células viáveis de mamíferos na etapa c) são células de mamífero que expressam proteína(s) recombinante(s) Axl em sua superfície.

[0019] Numa modalidade de realização também preferida, a molécula de interesse é uma molécula citotóxica (também aqui designada agente citotóxico ou citostático).

[0020] Numa modalidade de realização também preferida, a referida molécula de interesse liga-se de forma covalente ao composto capaz de se ligar à proteína Axl usando um ligante, mais preferencialmente um ligante peptídico, mais preferencialmente um ligante peptídico clivável, mais preferencialmente um ligante que pode ser clivado por compostos intracelulares naturais contidos na célula de

mamífero, particularmente no citosol da célula de mamífero.

[0021] Em uma modalidade de realização também preferida, o composto capaz de se ligar à proteína Axl é um anticorpo, ou um fragmento de ligação funcional desse anticorpo, que é especificamente dirigida contra a proteína Axl ou contra um epítopo desta localizado no domínio DEC Axl.

[0022] A etapa de seleção e) pode ser realizada por qualquer método conhecido pelo perito no estado da técnica para a avaliação do transporte ou internalização intracelular. Ensaio ou teste capazes de demonstrar ou avaliar a presença, ausência ou a atividade do composto capaz de se ligar especificamente à proteína Axl, ou do complexo formado pelo composto e da molécula de interesse, ou da molécula de interesse que se liga covalentemente ao composto, são bem conhecidos pelo perito no estado da técnica (ver alguns exemplos de tal teste ou ensaio descritos a seguir, sem limitar esses testes aos exemplos de testes seguintes).

[0023] Mais particularmente, esses testes ou ensaios podem ser realizados por SCAF, imunofluorescência, citometria de fluxo, *Western blot*, avaliações de citotoxicidade/citostáticas etc.

[0024] Neste aspecto, a presente invenção é também dirigida a um método *in vitro* para a preparação de um agente citotóxico ou citostático complexo capaz de transportar um composto citotóxico para uma célula de mamífero, de preferência uma célula viável, compreendendo o método a etapa de:

- Ligar de forma covalente um agente citotóxico a um composto que é:

- i) capaz de se ligar especificamente à proteína Axl, preferencialmente a proteína humana Axl, e

- ii) internalizar-se em células de mamíferos após sua ligação à proteína Axl, quando a proteína Axl é expressa na superfície da célula de mamífero.

[0025] Preferencialmente, o composto é uma proteína semelhante a proteína, mais preferencialmente um anticorpo que é especificamente dirigido contra a proteína Axl, ou contra um epítipo dessa proteína localizado no domínio DEC Axl, ou um fragmento de ligação funcional do anticorpo.

[0026] Na modalidade de realização preferida, o agente citotóxico liga-se de forma ao anticorpo anti-Axl ou a um fragmento funcional desse anticorpo, utilizando um ligante, mais preferencialmente um ligante peptídico, mais preferencialmente um ligante peptídico clivável, mais preferencialmente um ligante que pode ser clivado, como exemplo não limitativo, por compostos intracelulares naturais.

[0027] Como os outros membros da família TAM, o domínio extracelular de Axl (DEC) tem uma organização fechada àqueles de moléculas de adesão celular. DEC Axl caracteriza-se por uma combinação de dois domínios semelhantes a imunoglobulina, seguidos de dois domínios adjacentes semelhantes a fibronectina do tipo III [O'Bryan, J.P. e colaboradores. *Mol. Cell Biol.* (1991).11, 5016-5031]. Os dois domínios semelhantes a imunoglobulina com término N são suficientes para a ligação com o ligante Gas6 [Sasaki, T. e colaboradores. *EMBO J.* (2006).25, 80-87].

[0028] O DEC da proteína humana Axl é um fragmento de 451 aminoácidos, que corresponde aos aminoácidos 1-451 da sequência de SEQ ID NO:29, cuja sequência é representada na listagem de sequências como SEQ ID NO: 31. Com os aminoácidos 1-25 correspondendo ao peptídeo de sinalização, o DEC da proteína humana Axl sem o peptídeo de sinal corresponde aos aminoácidos 26-451 da sequência SEQ ID NO:29, representada pela sequência SEQ ID NO: 32.

[0029] Até o momento foram identificados diferentes modos de internalização. Eles orientam a tornar-se internalizadas as proteínas ou o complexo proteico na célula. Após endocitose, a maioria das proteínas

ou lipídeos de membrana retorna à superfície da célula (reciclagem), mas alguns componentes da membrana são transportados a endossomas tardios ou ao Golgi [Maxfield, F.R. & McGraw, T.E. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2004).5, 121-132].

[0030] Em uma modalidade de realização preferida, a invenção refere-se a uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, que: i) se liga especificamente à proteína humana Axl, e ii) é internalizado após sua ligação à proteína humana Axl, a proteína de ligação ao antígeno compreendendo pelo menos uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1 a 14, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NOs: 1 a 14.

[0031] Numa modalidade de realização mais preferida, a invenção refere-se a uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, que

se liga especificamente à proteína humana Axl, preferencialmente possuindo a sequência SEQ ID NO: 29 ou 30 ou sequência variante natural desta, e

é internalizada após sua ligação à proteína humana Axl, a proteína de ligação ao antígeno compreendendo pelo menos uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1 a 14.

[0032] Uma "proteína de ligação" ou "proteína de ligação ao antígeno" é uma cadeia peptídica com uma afinidade específica ou geral com outra proteína ou molécula (geralmente referida como antígeno). Proteínas são postas em contato e formam um complexo quando ligação é possível. A proteína de ligação ao antígeno da invenção pode ser de preferência, sem limitação, um anticorpo, um fragmento ou derivado de um anticorpo, uma proteína ou um peptídeo.

[0033] Por "fragmento de ligação ao antígeno" de uma proteína de ligação ao antígeno, de acordo com a invenção, pretende-se indicar qualquer peptídeo, polipeptídeo ou proteína que mantém a capacidade de se ligar especificamente ao alvo (também geralmente referida como antígeno) da proteína de ligação ao antígeno e compreende uma sequência de aminoácidos de pelo menos 5 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 15 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 25 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 40 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 50 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 60 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 70 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 80 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 90 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 100 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 125 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 150 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 175 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 200 resíduos de aminoácidos ou pelo menos 250 resíduos de aminoácidos contíguos da sequência de aminoácidos da proteína de ligação ao antígeno.

[0034] Em uma modalidade de realização preferida em que a proteína de ligação ao antígeno é um anticorpo, tais "fragmentos de ligação ao antígeno" são selecionados no grupo que consiste de Fv, scFv (sc para cadeia simples), Fab, F(ab')₂, Fab', fragmentos ou diacorpos scFv-Fc, ou qualquer fragmento cujo tempo de meia-vida teria sido aumentado por meio de modificação química, tal como a adição de poli(alquilen)glicol, tal como poli(etileno)glicol ("PEGilação") (fragmentos peguilados chamados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG ou Fab'-PEG) ("PEG" de Poli(Etileno)Glicol), ou por incorporação em um lipossoma, os fragmentos tendo pelo menos uma das RDCs característicos do anticorpo de acordo com a

invenção. Preferencialmente, os "fragmentos de ligação ao antígeno" serão constituídos ou compreenderão uma sequência parcial da cadeia variável pesada ou leve do anticorpo da qual são derivados, a sequência parcial sendo suficiente para manter a mesma especificidade de ligação do anticorpo do qual ele é descendente e uma afinidade suficiente, de preferência pelo menos igual a 1/100, de um modo mais preferido de pelo menos 1/10, da afinidade do anticorpo do qual ele é descendente, em relação ao alvo. Tal fragmento funcional conterá no mínimo 5 aminoácidos, preferencialmente 10, 15, 25, 50 e 100 aminoácidos, consecutivos da sequência do anticorpo do qual ele é descendente.

[0035] O termo "epítopo" é uma região de um antígeno que se ligada por uma proteína de ligação ao antígeno, incluindo anticorpos. Epítomos podem ser definidos como estruturais ou funcionais. Epítomos funcionais são geralmente um subconjunto dos epítomos estruturais e têm os resíduos que contribuem diretamente para a afinidade da interação. Os epítomos podem também ser conformacionais, ou seja, compostos de aminoácidos não lineares. Em certas modalidades de realização, os epítomos podem incluir determinantes que são agrupamentos de moléculas de superfície quimicamente ativa tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, grupos fosforila ou grupos sulfonila, e, em certas modalidades de realização, podem apresentar características estruturais tridimensionais específicas e/ou características específicas de carga.

[0036] No presente pedido, o epítopo está localizado no domínio extracelular da proteína humana Axl.

[0037] De acordo com uma modalidade de realização preferida da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, liga-se especificamente a um epítopo localizado no domínio extracelular da proteína humana Axl,

preferencialmente tendo a sequência SEQ ID NO: 31 ou 32 ou sequência variante natural desta.

[0038] Por "ligando-se especificamente", "que se liga especificamente" ou similar, pretende-se que a proteína de ligação ao antígeno, ou fragmento desta de ligação ao antígeno, forme um complexo com um antígeno que é relativamente estável em condições fisiológicas. A ligação específica pode ser caracterizada por uma constante de dissociação de equilíbrio de pelo menos cerca de 1×10^{-6} M ou menos. Métodos para determinar se duas moléculas se ligam especificamente são bem conhecidos no estado da técnica e incluem, por exemplo, diálise de equilíbrio, ressonância de plasmons de superfície e afins. Para que não restem dúvidas, isso não significa que o fragmento de ligação ao antígeno não possa ligar-se ou interferir, sob um nível baixo, em outro antígeno. No entanto, como uma modalidade de realização preferida, o fragmento de ligação ao antígeno liga-se apenas ao referido antígeno.

[0039] Nesse sentido, "CE₅₀" refere-se a concentração 50% eficaz. Mais precisamente, o termo concentração máxima eficaz média (CE₅₀) corresponde à concentração de um fármaco, anticorpo ou agente tóxico que induz uma resposta a meio caminho entre a referência e o máximo após um tempo de exposição especificado. O termo é comumente utilizado como uma medida da potência do fármaco. A CE₅₀ de uma curva dose-resposta graduada, por conseguinte, representa a concentração de um composto em que são observados 50% de seu efeito máximo. A CE₅₀ de uma curva dose-resposta quântica representa a concentração de um composto em que 50% da população exibe uma resposta, após duração de exposição especificada. As medidas de concentração normalmente seguem uma curva sigmoideal, aumentando rapidamente com uma alteração relativamente pequena na concentração. Isso pode ser determinado matematicamente por derivação da linha de melhor ajuste.

[0040] Como uma modalidade de realização preferida, o valor CE_{50} determinado na presente invenção caracterizou a potência de ligação do anticorpo em DEC Axl exposto em células tumorais humanas. O parâmetro CE_{50} é determinado utilizando análise SCAF. O parâmetro CE_{50} reflete a concentração de anticorpos para a qual são obtidos 50% da ligação máxima na Axl humana expressa em células de tumores humanos. Cada valor CE_{50} foi calculado como o ponto médio da curva de resposta a dose utilizando um programa de ajuste de curva de regressão de quatro parâmetros (*Prism Software*). Esse parâmetro foi selecionado como sendo representativo de condições fisiológicas/patológicas.

[0041] Em uma modalidade de realização da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, liga-se a seu epítipo com uma CE_{50} de pelo menos 10^{-9} M, de preferência entre 10^{-9} e 10^{-12} M.

[0042] Outra modalidade de realização da invenção é um processo ou método para a seleção de uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, capaz de ser intracelularmente a internalizável em uma célula de mamífero, de preferência numa célula humana, preferencialmente uma célula viável, compreendendo as etapas de:

- i) selecionar proteína de ligação ao antígeno que se liga especificamente a Axl, de preferência ao seu domínio DEC ou um epítipo seu; e

- ii) selecionar a proteína de ligação ao antígeno da etapa anterior i) que é internalizada em uma célula de mamífero após sua ligação em uma proteína Axl expressa na superfície da célula de mamífero.

[0043] Em uma modalidade de realização particular, a célula de mamífero expressa naturalmente o receptor da proteína Axl em sua superfície ou são células de mamíferos que expressam proteína

recombinante Axl em sua superfície, de preferência células humanas.

[0044] Esse método ou processo pode compreender as etapas de i) selecionar proteína de ligação ao antígeno que se liga especificamente a Axl com um CE_{50} de pelo menos 10^{-9} M e ii) selecionar proteína de ligação ao antígeno da etapa anterior, as quais são internalizadas após sua ligação a Axl. A etapa de seleção ii) pode ser realizada por qualquer método conhecido por um perito no estado da técnica para a avaliação da internalização. Mais particularmente, testes podem ser realizados por SCAF, imunofluorescência, citometria de fluxo, *Western blot*, avaliações de citotoxicidade etc.

[0045] Outra característica da proteína de ligação ao antígeno de acordo com a invenção é que ela não tem qualquer atividade significativa na proliferação de células tumorais. Mais particularmente, tal como ilustrado nos exemplos a seguir, a proteína de ligação ao antígeno de acordo com a invenção não tem qualquer atividade significativa *in vitro* sobre o modelo de proliferação SN12C.

[0046] Em oncologia, existem múltiplos mecanismos pelos quais mAbs podem exercer eficácia terapêutica, mas muitas vezes a sua atividade não é suficiente para produzir um benefício duradouro. Assim, várias estratégias têm sido empregadas para melhorar sua atividade, particularmente combinando-os com fármacos como agentes quimioterápicos. Como uma alternativa eficiente a protocolos de combinação, imunotoxinas tornam-se uma nova opção terapêutica para tratar câncer [Beck, A. e colaboradores. *Discov. Med.* (2010).10, 329-339; Alley, S.C. e colaboradores. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2009).330, 932-938]. Conjugados anticorpo-fármaco (CAFs) representam uma abordagem em que a capacidade de aproveitar a especificidade de mAbs e direcionar o transporte de um agente citotóxico para o tumor pode elevar significativamente tanto a atividade de mAbs quanto a atividade de fármacos. Idealmente, o mAb se ligará especificamente a

um antígeno com expressão substancial sobre células tumorais, mas com expressão limitada sobre células normais.

[0047] A presente invenção centralizou-se em uma proteína de ligação específica anti-Axl, e mais particularmente em um anticorpo anti-Axl específico, apresentando uma elevada capacidade de serem internalizados após ligação de Axl. Tal proteína de ligação ao antígeno é de interesse como um dos componentes do conjugado imunofármaco, de modo que direciona o agente citotóxico ligado às células cancerosas específicas. Uma vez internalizado, o agente citotóxico provoca a morte de células cancerígenas.

[0048] Pensa-se que chaves importantes para o sucesso com terapia imunoconjugada são a especificidade do antígeno a alvo e a internalização dos complexos de proteína de ligação ao antígeno nas células cancerosas. Obviamente antígenos não internalizáveis são menos eficazes do que antígenos internalizáveis em transportes de agentes citotóxicos. Processos de internalização são variáveis através de antígenos e dependem de vários parâmetros que podem ser influenciadas por proteínas de ligação. RTQs de superfície celular constituem uma família de antígenos de interesse para investigar tal abordagem.

[0049] Na biomolécula, o citotóxico leva à atividade citotóxica e a proteína de ligação ao antígeno utilizada provoca sua especificidade contra células cancerosas, bem como um vetor para inserção dentro das células para direcionar corretamente o agente citotóxico.

[0050] Assim, para melhorar a molécula imunoconjugada, a proteína de ligação a veículo deve apresentar uma elevada capacidade de internalizar nas células cancerosas específicas. A eficiência com que as proteínas de ligação mediam internalização difere significativamente dependendo do epítipo-alvo. Seleção de proteínas de ligação anti-Axl de internalização potentes exige vários dados experimentais que estudam não apenas inativação de Axl, mas que também sigam

proteínas de ligação anti-Axl que se constituem dentro das células.

[0051] Em uma modalidade de realização preferida, a internalização da proteína de ligação ao antígeno de acordo com a invenção pode ser avaliada preferencialmente por imunofluorescência (como exemplificado a seguir no presente pedido de patente) ou qualquer método ou processo conhecido pelo perito no estado da técnica específico para o mecanismo de internalização.

[0052] Numa outra modalidade de realização preferida, como a proteína de ligação a complexo Axl-antígeno, de acordo com a invenção, é internalizada após a ligação da proteína de ligação da invenção ao DEC de Axl, uma redução na quantidade de Axl na superfície das células é induzida. Essa redução pode ser quantificada por qualquer método conhecido por um perito no estado da técnica (*Western blot*, SCAF, imunofluorescência etc.).

[0053] Em uma modalidade de realização da invenção, essa redução, que reflete assim a internalização, pode ser de preferência medida por SCAF e expressa como a diferença ou delta ou a Intensidade Média de Fluorescência (IMF) medida em células não tratadas com o IMF medido com células tratadas com a proteína de ligação ao antígeno de acordo com a invenção.

[0054] Como exemplo não limitativo da presente invenção, esse delta é determinado com base em IFMs obtidos com células não tratadas e células tratadas com a proteína de ligação ao antígeno da presente invenção, como descrito no exemplo 9, utilizando i) células SN12C de tumor renal humano após um período de incubação de 24 horas com a proteína de ligação ao antígeno da invenção e ii) um anticorpo secundário marcado com Alexa488. Esse parâmetro é definido como calculado com a seguinte fórmula:

$$\Delta(\text{IMF}_{24\text{h}} \text{ de células não tratadas} - \text{IMF}_{24\text{h}} \text{ de células tratadas com proteína de ligação ao antígeno})$$

[0055] Essa diferença entre as IMFs reflete a inativação de Axl na medida em que IFMs são proporcionais a Axl expressa na superfície celular.

[0056] Em um aspecto mais preferido e vantajoso, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, da invenção consiste de um anticorpo monoclonal, preferencialmente um mAb isolado, produzindo um $\Delta(\text{IMF}_{24\text{h}}$ de células não tratadas - $\text{IMF}_{24\text{h}}$ de células tratadas) de pelo menos 200, preferencialmente de pelo menos 300.

[0057] A proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, de acordo com a invenção, induz uma redução de IMF de pelo menos 200.

[0058] Em mais detalhes, o delta acima mencionado pode ser medido de acordo com o processo seguinte, que deve ser considerado como um exemplo ilustrativo e não limitativo:

tratar e incubar células tumorais de interesse com a proteína de ligação ao antígeno da presente invenção;

tratar as células tratadas da etapa a) e, em paralelo, células não tratadas com a proteína de ligação ao antígeno da presente invenção;

medir a IMF (representativa da quantidade de Axl presente na superfície) das células tratadas e das não tratadas com um anticorpo secundário marcado capaz de se ligar à proteína de ligação ao antígeno, e

calcular o delta como a subtração da IMF obtida com as células tratadas da IMF obtida com as células não tratadas.

[0059] Os termos "anticorpo", "anticorpos" ou "imunoglobulina" são utilizados de modo intercambiável no sentido mais amplo e incluem anticorpos monoclonais, de preferência mAb isolado (por exemplo, anticorpos monoclonais de comprimento total ou intactos), anticorpos policlonais, anticorpos multivalentes ou anticorpos multiespecíficos (por

exemplo, anticorpos biespecíficos desde que eles exibam a atividade biológica desejada).

[0060] Mais particularmente, essa molécula é constituída de uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada compreende uma região variável de cadeias pesadas (ou domínio) (aqui abreviada como RVCP ou VP) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada compreende três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como RVCL ou VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve compreende um domínio CL. As regiões VP e VL podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, designadas regiões determinantes de complementaridade (RDC), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (REs). Cada VP e VL é composto de três RDCs e quatro REs, dispostos de término amino a término carboxila na seguinte ordem: RE1, RDC1, RE2, RDC2, RE3, RDC3, RE4. As regiões variáveis das cadeias leves e pesadas contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina a tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efetadoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico.

[0061] Anticorpos no sentido da invenção também incluem certos fragmentos de anticorpos. Os referidos fragmentos de anticorpos exibem a especificidade e afinidade de ligação desejada, independentemente da origem ou tipo de imunoglobulina (ou seja, IgG, IgE, IgM, IgA etc), isto é, eles são capazes de se ligar especificamente à proteína Axl com uma afinidade comparável à dos anticorpos de comprimento total da invenção.

[0062] Em geral, para a preparação de anticorpos monoclonais ou seus fragmentos funcionais, especialmente de origem murina, é possível referir-se a técnicas que são descritas em particular no manual "*Antibodies*" (Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, pp 726, 1988) ou à técnica de preparação de hibridomas descrita por Kohler e Milstein (*Nature*, 256:495-497, 1975).

[0063] O termo "anticorpo monoclonal" ou "mAb", como aqui utilizado, refere-se a uma molécula de anticorpo que é dirigida contra um antígeno específico e que pode ser produzido por um único clone de células B ou hibridoma. Anticorpos monoclonais podem também ser recombinantes, isto é, produzidos por meio de engenharia de proteínas. Além disso, em contraste com preparações de anticorpos policlonais que incluem tipicamente vários anticorpos dirigidos contra vários determinantes ou epítopos, cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único epítipo do antígeno. A invenção refere-se a anticorpos isolados ou obtidos por purificação a partir de fontes naturais ou obtidas por recombinação genética ou síntese química.

[0064] Uma modalidade de realização preferida da invenção é uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, compreendendo ou consistindo de um anticorpo, o anticorpo compreendendo as três RDCs de cadeias leves que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NOs: 1, 2 e 3; e os três RDCs de cadeias pesadas que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NOs: 4, 5 e 6.

[0065] Em uma modalidade de realização mais preferida da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação

ao antígeno da mesma, é constituída por um anticorpo, esse anticorpo compreendendo os três RDCs de cadeias leves que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 1, 2 e 3; e os três RDCs de cadeias pesadas que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 4, 5 e 6.

[0066] Em um aspecto preferido, por regiões RDC ou RDCs pretende-se indicar as regiões hipervariáveis das cadeias pesadas e leves das imunoglobulinas, como definidas por IMGT. Sem qualquer menção contraditória, os RDCs serão definidos no presente relatório descritivo de acordo com o sistema de numeração IMGT.

[0067] A numeração única IMGT foi definida para comparar os domínios variáveis de qualquer que seja o receptor de antígeno, o tipo de cadeia ou as espécies [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 IMGT, os aminoácidos conservados têm sempre a mesma posição, por exemplo, cisteína 23 (1^a CYS), triptofano 41 (TRP CONSERVADO), aminoácido 89 hidrofóbico, cisteína 104 (2^a CYS), fenilalanina ou triptofano 118 (J-PHE ou J-TRP). A numeração única IMGT fornece uma delimitação padronizado das regiões de estrutura (RE1-IMGT: posições 1 a 26, RE2-IMGT: 39-55, RE3-IMGT: 66-104 e RE4-IMGT: 118-128) e das regiões determinantes de complementaridade: RDC1-IMGT: 27 a 38, RDC2-IMGT: 56 a 65 anos e RDC3-IMGT: 105 a 117. Como lacunas representam posições desocupadas, os comprimentos RDC-IMGT (mostrados entre colchetes e separados por pontos, por exemplo [8.8.13]) tornam-se informações cruciais. A numeração única IMGT é usada em representações gráficas em 2D, designadas como IMGT Colares de Pérolas (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 3D em IMGT/Estrutura 3D-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. e Lefranc, M.-P., receptor de células T e dados estruturais MHC. *Nucl. Acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

[0068] Deve-se entender que, sem especificação contraditória no presente relatório descritivo, regiões determinantes de complementaridade ou RDCs significam as regiões hipervariáveis das cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas, como definidas de acordo com o sistema de numeração IMGT.

[0069] No entanto, RDCs podem também ser definidos de acordo com o sistema de numeração de Kabat (Kabat e colaboradores, *Sequences of proteins of immunological interest*, 5ª ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991 e edições posteriores). Existem três RDCs de cadeias pesadas e três RDCs de cadeias leves. Aqui, os termos "RDC" e "RDCs" são usados para indicar, de acordo com o caso, uma ou mais, ou mesmo a totalidade, das regiões que contêm a maioria dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela afinidade de ligação do anticorpo pelo antígeno ou epítopo que ele reconhece.

[0070] De acordo com o sistema de numeração de Kabat, a presente invenção refere-se a uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, que consiste de um anticorpo, o anticorpo compreende os três RDCs de cadeias leves, como definidos de acordo com o sistema de numeração de Kabat, que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 9, 10 e 11, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NOs: 9, 10 e 11; e os três RDCs de cadeias pesadas, como definidos de acordo com o sistema de numeração de Kabat, que compreende as sequências SEQ ID NOs:12, 13 e 14, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NOs:12, 13 e 14.

[0071] No sentido da presente invenção, a "percentagem de identidade" entre duas sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos significa a percentagem de nucleotídeos idênticos ou resíduos de aminoácidos entre as duas sequências a serem comparadas, obtidas após alinhamento ótimo, sendo esta percentagem puramente estatística e as diferenças entre as duas sequências sendo distribuídas ao acaso ao longo de seu comprimento. A comparação de duas sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos é tradicionalmente realizada por comparação das sequências após tê-las alinhado otimamente, essa comparação sendo capaz de ser realizada por segmento ou usando uma "janela de alinhamento". Alinhamento ótimo das sequências para que comparação possa ser efetuado, além de comparação manual, por meio do algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (1981) [*Ad. App. Math.* 2:482], por meio do algoritmo de homologia local de Needleman e Wunsch (1970) [*J. Mol. Biol.* 48:443], por meio do método de busca de similaridade de Pearson e Lipman (1988) [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444] ou por meio de programas de computador que usam esses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no *Wisconsin Genetics Software Package*, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou pelo software de comparação BLAST NR ou BLAST P).

[0072] A percentagem de identidade entre duas sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos é determinada por comparação das duas sequências otimamente alinhadas, em que as sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos de comparação podem ter adições ou supressões, em comparação com as sequências de referência para alinhamento ótimo entre as duas sequências. A percentagem de identidade é calculada determinando o número de posições nas quais o nucleotídeo ou resíduo de aminoácido 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.

[0073] Por exemplo, o programa BLAST, "sequências Blast 2" (Tatusova e colaboradores, "sequências Blast 2 - uma nova ferramenta para comparação de sequências de proteínas e nucleotídeos", *FEMS Microbiol.*, 1999, *Lett.* 174:247-250), disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, pode ser usado com os parâmetros padrões (particularmente no caso dos parâmetros "penalização para lacuna aberta": 5, e "penalização para lacuna de extensão": 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.

[0074] Para a sequência de aminoácidos que apresenta pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com uma sequência de aminoácidos de referência, exemplos preferidos incluem os aminoácidos que contêm a sequência de referência, certas modificações, particularmente uma supressão, 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 preferidas substituições em que os aminoácidos substituídos são substituídos por aminoácidos "equivalentes". Aqui, a expressão "ácidos aminoácidos equivalentes" é empregada para indicar quaisquer ácidos susceptíveis de ser substituídos por um dos aminoácidos estruturais, sem, no entanto, modificar as atividades biológicas dos anticorpos correspondentes e dos exemplos específicos definidos abaixo.

[0075] Aminoácidos equivalentes podem ser determinados quer em sua homologia estrutural com os aminoácidos pelos quais são substituídos ou nos resultados de testes comparativos de atividade

biológica entre as várias proteínas de ligação de antígeno que possam ser geradas.

[0076] Como exemplo não limitativo, a tabela 2 resume as possíveis substituições que possam ser realizadas sem resultar em uma modificação significativa da atividade biológica da proteína de ligação ao antígeno modificada correspondente; substituições inversas são naturalmente possível sob as mesmas condições.

Tabela 2

Resíduo original	Substituição(ões)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	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)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

[0077] Uma modalidade de realização da invenção refere-se a uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, que compreende um domínio variável de cadeias leves de sequência SEQ ID NO: 7, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NO: 7; e os três RDCs de cadeias pesadas que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, ou qualquer

sequência que exiba pelo menos 80%, de preferência 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NOs: 4, 5 e 6.

[0078] De acordo com uma modalidade de realização preferida da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, compreende um domínio variável de cadeias leves de sequência SEQ ID NO: 7, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO:7; e os três RDCs de cadeias pesadas que compreendem as sequências de SEQ ID NOs: 4, 5 e 6.

[0079] De acordo com outra modalidade de realização preferida da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, compreende um domínio variável de cadeias leves de sequência SEQ ID NO: 7, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO:7.

[0080] Outra modalidade de realização da invenção refere-se a uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, que compreende os três RDCs de cadeias leves que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NOs: 1, 2 e 3; e um domínio variável de cadeias pesadas de sequência SEQ ID NO: 8, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NO: 8.

[0081] De acordo com uma modalidade de realização preferida da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, compreende as três RDCs de cadeias leves que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 1, 2 e 3; e um domínio variável de cadeias pesadas de sequência SEQ ID NO: 8, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO:8.

[0082] De acordo com outra modalidade de realização preferida da

invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, compreende um domínio variável de cadeias pesadas de sequência SEQ ID NO: 8, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO:8.

[0083] Outra modalidade de realização da invenção refere-se a uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, que compreende um domínio variável de cadeias leves de sequência SEQ ID NO: 7, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, de preferência 85%>, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NO: 7; e um domínio variável de cadeias pesadas de sequência SEQ ID NO: 8, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, de preferência 85%>, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NO: 8.

[0084] De acordo com uma modalidade de realização preferida da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, compreende um domínio variável de cadeias leves da sequência SEQ ID NO: 7, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO: 7, e um domínio variável de cadeias pesadas de sequência SEQ ID NO: 8, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO: 8.

[0085] Para maior clareza, a tabela 3a abaixo resume as várias sequências de aminoácidos correspondentes à proteína de ligação ao antígeno da invenção (com Mu. = murino).

Tabela 3a

	Numeração de RDCs	Cadeia pesada	Cadeia leve	SEQ ID NO.	
1613F12	IMGT		CDR-L1	1	
			CDR-L2	2	
			CDR-L3	3	
		CDR-H1		4	
		CDR-H2		5	
		CDR-H3		6	
	Kabat			CDR-L1	9
				CDR-L2	10
				CDR-L3	11
		CDR-H1			12
		CDR-H2			13
		CDR-H3			14
			Domínio variável Mu.		7
		Domínio variável Mu.			8

[0086] Um aspecto específico da presente invenção refere-se a um anticorpo murino, ou seus compostos derivados ou fragmentos de ligação ao antígeno, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende também regiões constantes de cadeias leves e de cadeias pesadas derivadas de um anticorpo de uma espécie heteróloga com o rato, particularmente o homem.

[0087] Outro aspecto específico da presente invenção refere-se a um anticorpo quimérico, ou seus compostos derivados ou fragmentos de ligação ao antígeno, caracterizado pelo fato de que o anticorpo de ligação compreende também regiões constantes de cadeias leves e cadeias pesadas derivadas de um anticorpo de uma espécie heteróloga ao rato, particularmente humano.

[0088] Ainda outro aspecto específico da presente invenção refere-se a um anticorpo humanizado, ou seus compostos derivados ou fragmentos de ligação ao antígeno, caracterizado pelo fato de que as regiões constantes das cadeias leves e das cadeias pesadas derivadas de anticorpo humano são, respectivamente, a região lambda ou capa e a região gama-1, gama-2 ou gama-4.

[0089] Outro aspecto da invenção é uma proteína de ligação ao antígeno que consiste do anticorpo monoclonal 1613F12 derivado do hibridoma I-4505 depositado no CNCM, Instituto Pasteur, França, em 28 de julho de 2011, ou um fragmento deste de ligação ao antígeno.

[0090] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a um hibridoma murino capaz de secretar uma proteína de ligação ao antígeno de acordo com a invenção, particularmente o hibridoma de origem murina depositado com a coleta francesa de culturas de microorganismos (CNCM, Instituto Pasteur, Paris, França) em Julho 28 de 2011, sob o número I-4505. Esse hibridoma foi obtido pela fusão de esplenócitos/linfócitos de ratos imunizados Balb/C e células da linhagem de células Sp 2/O-Ag 14 de mieloma.

[0091] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a um hibridoma murino capaz de secretar um anticorpo que compreende os três RDCs de cadeias leves que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 1, 2 e 3; e os três RDCs de cadeias pesadas que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, sendo hibridoma depositado na CNCM, Instituto Pasteur, Paris, França, em 28 de julho de 2011, sob o número I-4505. Esse hibridoma foi obtida pela fusão de esplenócitos/linfócitos de camundongos imunizados Balb/C e células da linhagem de células Sp 2/O-Ag 14 de mieloma.

[0092] Um objeto da invenção é o hibridoma murino I-4505 depositado no CNCM, Instituto Pasteur, França, em 28 de julho de 2011.

[0093] A proteína de ligação ao antígeno da invenção compreende também anticorpos quiméricos ou humanizados.

[0094] Um anticorpo quimérico é um anticorpo 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 à espécie dada.

[0095] Os anticorpos, ou fragmentos quiméricos do mesmo, podem ser preparados usando as técnicas de genética recombinante. Por exemplo, o anticorpo quimérico pode ser produzido por clonagem de DNA recombinante contendo um promotor e uma sequência que codificam a região variável de um anticorpo monoclonal não humano da invenção, particularmente, murino, e uma sequência que codifica o anticorpo humano da região constante. Um anticorpo quimérico de acordo com a invenção codificada por um gene recombinante como este pode ser, por exemplo, uma quimera rato-humano, sendo a especificidade desse anticorpo determinada pela região variável derivada do DNA murino e seu isotipo, determinado pela região constante derivada de DNA humano. Consulte Verhoeyn e

colaboradores (*BioEssays*, 8:74, 1988) para métodos de preparação de anticorpos quiméricos.

[0096] Em outro aspecto, a invenção descreve uma proteína de ligação que consiste de um anticorpo quimérico.

[0097] Numa modalidade de realização particular preferida, o anticorpo quimérico, ou um fragmento deste de ligação ao antígeno, da presente invenção compreende uma sequência de domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 7, bem como uma sequência de domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

[0098] Em outro aspecto, a invenção descreve uma proteína de ligação que consiste de um anticorpo humanizado.

[0099] "Anticorpos humanizados" significa um anticorpo que contém as regiões RDCs derivadas de um anticorpo de origem não humana, sendo as outras partes da molécula do anticorpo derivadas de um (ou vários) anticorpos humanos. Além disso, alguns dos resíduos de segmento de esqueleto (chamados RE) podem ser modificados para preservar a afinidade de ligação (Jones e colaboradores, *Nature*, 321:522-525, 1986; Verhoeyen e colaboradores, *Science*, 239:1534-1536, 1988; Riechmann e colaboradores, *Nature*, 332:323-327, 1988).

[00100] Os anticorpos humanizados da invenção, ou fragmentos dos mesmos, podem ser preparados por técnicas conhecidas por um perito no estado da técnica (tais como, por exemplo, aquelas descritas nos documentos Singer e colaboradores, *J. Immun.*, 150:2844-2857, 1992; Monte e colaboradores, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10: 1-142, 1992; e Bebbington e colaboradores, *Bio/Technology*, 10:169-175, 1992). Tais anticorpos humanizados são preferidos para sua utilização em métodos que envolvem diagnósticos *in vitro* ou tratamento preventivo e/ou terapêutico *in vivo*. Outras técnicas de humanização, também conhecidas por um perito no estado da técnica, tal como, por exemplo,

a técnica de "enxerto de RDCs", descrita por PDL nas patentes EP 0 451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 ou EUA 5.530.101, EUA 6.180.370, EUA 5.585.089 e EUA 5.693.761. As patentes EUA 5.639.641 ou 6.054.297, 5.886.152 e 5.877.293 podem também ser citadas.

[00101] Além disso, a invenção também se refere a anticorpos humanizados resultantes dos anticorpos murinos descritos acima.

[00102] De um modo preferido, regiões constantes da cadeia leve e da cadeia pesada derivadas de um anticorpo humano são, respectivamente, a região lambda ou capa e a região gama-1, gama-2 ou gama-4.

[00103] Em uma modalidade de realização preferida, a invenção refere-se a uma proteína de ligação ao antígeno que consiste de um anticorpo humanizado, ou um fragmento deste que se liga a antígeno, que compreende um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência SEQ ID NO:36, ou qualquer sequência que apresente pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NO: 36; e os três RDCs de cadeias pesadas que compreendem as sequências de SEQ ID NO: 4, 5 e 6.

[00104] Outra modalidade de realização da invenção refere-se a uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, que compreende um domínio variável de cadeias leves de sequência selecionada no grupo que consiste em SEQ ID NOs: 37 a 47, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NO: 37 a 47; e os três RDCs de cadeias pesadas que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 4, 5 e 6.

[00105] Por "qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NO: 36 ou 37 a 47", pretende-se designar as sequências que exibem os

três RDCs de cadeias leves SEQ ID NOs: 1, 2 e 3 e que, além disso, exibem pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com a sequência completa SEQ ID NO: 36 ou 37 a 47 externa às sequências que correspondem aos RDCs (isto é, SEQ ID NO: 1, 2 e 3).

[00106] Para maior clareza, a tabela 3b abaixo resume as várias sequências de aminoácidos correspondentes à cadeia leve (VL) da proteína humanizada de ligação ao antígeno da invenção (com Hz. = humanizada).

Tabela 3b

	Versão	SEQ ID NO.
Hz1613F12 VL	consenso	36
	VL1	37
	VL1 I2V	38
	VL1 M4I	39
	VL2.1	40
	VL2.1 V49T	41
	VL2.1 P50N	42
	VL2.2	43
	VL2.2 V49T	44
	VL2.2 P50N	45
	VL2.3	46
	VL3	47

[00107] Em uma modalidade de realização da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, compreende um domínio variável de cadeias leves selecionado do grupo que consiste de:

um domínio variável de cadeias leves de sequência SEQ ID NO: 7 ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO:7;

um domínio variável de cadeias leves de sequência SEQ ID NO: 36 ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO: 36; e

um domínio variável de cadeias leves de sequência SEQ ID NO: 37 a 47, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO: 37 a 47.

[00108] Numa modalidade de realização preferida, a invenção refere-se a uma proteína de ligação ao antígeno a qual consiste de um anticorpo humanizado, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, que compreende um domínio variável de cadeias pesadas que compreende a sequência SEQ ID NO: 48, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NO: 48; e os três RDCs de cadeia leve que compreendem as sequências SEQ ID NOs: 1, 2 e 3.

[00109] Outra modalidade de realização da invenção refere-se a uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, a qual compreende um domínio variável de cadeias pesadas de sequência selecionada no grupo que consiste de SEQ ID NOs: 49 a 68, ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NOs: 49 a 68; e os três RDCs de cadeias leves que compreendem as sequências de SEQ ID NOs: 1, 2 e 3.

[00110] Por "qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NOs: 48 e 49 a 68", pretende-se designar as sequências que exibem os três RDCs de cadeias pesadas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, e, além disso, que exibem pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com a sequência completa SEQ ID NOs: 48 e 49 a 68 externa às sequências correspondentes aos RDCs (isto é, SEQ ID NOs: 4, 5 e 6).

[00111] Para mais clareza, a tabela 3c abaixo resume as várias sequências de aminoácidos correspondentes à cadeia pesada (VP) de proteína humanizada de ligação ao antígeno da invenção (com Hz. = humanizado)

Tabela 3c

	Versão	SEQ ID NO.
Hz1613F12 VH	consenso	48
	VH1	49
	VH1 M39I	50
	VH1 W55R N66K	51
	VH1 I84S	52
	VH1 S85N	53
	VH1 I84N S85N	54
	VH2.1	55
	VH2.1 Q3H	56
	VH2.1 W55R	57
	VH2.1 N66K	58
	VH2.1 W55R N66K	59
	VH2.1 R80S	60
	VH2.1 N66K R80S	61
	VH2.2	62
	VH2.2 M89L	63
	VH2.3	64
	VH2.3 W55R	65
	VH2.3 Q3H W55R	66
	VH2.4	67
VH3	68	

[00112] Em uma modalidade de realização da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, compreende um domínio variável de cadeias pesadas selecionado do grupo que consiste de:

um domínio variável de cadeias pesadas de sequência SEQ ID NO: 8 ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO:8;

um domínio variável de cadeias pesadas de sequência SEQ ID NO: 48 ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO: 48; e

um domínio variável de cadeias pesadas de sequência de SEQ ID NOs: 49 a 68 ou qualquer sequência que exiba pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NOs: 49 a 68.

[00113] Em uma modalidade de realização da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, compreende um domínio variável de cadeias leves de sequência SEQ ID NO: 36, ou a qualquer sequência que exiba pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NO: 36; e um domínio variável de cadeias pesadas de sequência SEQ ID NO: 48, ou qualquer sequência que exibe pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NO: 48.

[00114] Em outra modalidade de realização da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, compreende um domínio variável de cadeias leves de sequência selecionada no grupo que consiste de SEQ ID NOs: 37 a 47, ou qualquer sequência que exibe pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NOs: 37 a 47; e um domínio variável de cadeias pesadas de sequência selecionada no grupo que consiste de SEQ ID NOs: 49 a 68, ou qualquer sequência que exibe pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com SEQ ID NOs: 49 a 68.

[00115] Em uma modalidade de realização da invenção, a proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, compreende:

um domínio variável de cadeias leves de sequência SEQ ID NOs: 7, 36 ou 37 a 47, ou qualquer sequência que exibe pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NOs: 7, 36 ou 37 a 47; e

um domínio variável de cadeias pesadas de sequência SEQ ID NOs: 8, 48 ou 49 a 68 ou qualquer sequência que exibe pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NOs: 8, 48 ou 49 a 68.

[00116] Um novo aspecto da presente invenção refere-se a um

ácido nucleico isolado caracterizado pelo fato de que é selecionado dentre os seguintes ácidos nucleicos (incluindo qualquer código genético degenerado):

um ácido nucleico que codifica uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, de acordo com a invenção;

um ácido nucleico que compreende:

- uma sequência de ácido nucleico selecionado do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 15 a 28 e 69 a 99, ou

- uma sequência de ácido nucleico que compreende as seis sequências de ácidos nucleicos SEQ ID NOs: 15 a 20, ou

- uma sequência de ácido nucleico que compreende as duas sequências de ácidos nucleicos SEQ ID NOs: 21, 22 ou as duas sequências de ácidos nucleicos selecionadas de uma parte de SEQ ID NOs: 69 a 79 e a outra parte de SEQ ID NOs: 80 A 99;

um ácido nucleico complementar de um ácido nucleico, como definido em a) ou b); e

um ácido nucleico, preferencialmente tendo pelo menos 18 nucleotídeos, capaz de hibridizar-se sob condições altamente rigorosas com uma sequência de ácido nucleico, como definido na alínea a) ou b), ou com uma sequência com pelo menos 80%, preferencialmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade após alinhamento ótimo, com uma sequência de ácido nucleico, tal como definido na alínea a) ou b).

[00117] A tabela 4a abaixo resume as várias sequências de nucleotídeos relativamente à proteína de ligação da invenção (com Mu. = murino).

Tabela 4a

	Numeração de RDCs	Cadeia pesada	Cadeia leve	SEQ ID NO.	
1613F12	IMGT		CDR-L1	15	
			CDR-L2	16	
			CDR-L3	17	
		CDR-H1		18	
		CDR-H2		19	
		CDR-H3		20	
	Kabat			CDR-L1	23
				CDR-L2	24
				CDR-L3	25
		CDR-H1			26
		CDR-H2			27
		CDR-H3			28
			Domínio variável Mu.		21
		Domínio variável Mu.			22

[00118] Para maior clareza, a tabela 4b abaixo resume as várias sequências de nucleotídeos correspondentes à cadeia leve (VL) da proteína humanizada de ligação ao antígeno da invenção (com Hz. = humanizado)

Tabela 4b

	Versão	SEQ ID NO.
Hz1613F12 VL	VL1	69
	VL1 I2V	70
	VL1 M4I	71
	VL2.1	72
	VL2.1 V49T	73
	VL2.1 P50N	74
	VL2.2	75
	VL2.2 V49T	76
	VL2.2 P50N	77
	VL2.3	78
	VL3	79

[00119] Para maior clareza, a tabela 4c abaixo resume as várias sequências de nucleotídeos correspondentes à cadeia pesada (VP) da proteína humanizado de ligação ao antígeno da invenção (com Hz. = humanizado)

Tabela 4c

	Versão	SEQ ID NO.
Hz1613F12 VH	VH1	80
	VH1 M39I	81
	VH1 W55R N66K	82
	VH1 I84S	83
	VH1 S85N	84
	VH1 I84N S85N	85
	VH2.1	86
	VH2.1 Q3H	87
	VH2.1 W55R	88
	VH2.1 N66K	89
	VH2.1 W55R N66K	90
	VH2.1 R80S	91
	VH2.1 N66K R80S	92
	VH2.2	93
	VH2.2 M89L	94
	VH2.3	95
	VH2.3 W55R	96
	VH2.3 Q3H W55R	97
	VH2.4	98
	VH3	99

[00120] Os termos "ácido nucleico", "sequência nucleica", "sequência de ácido nucleico", "polinucleotídeo", "oligonucleotídeo", "sequência de polinucleotídeo" e "sequência de nucleotídeo", usados de forma intercambiável na presente descrição, significam uma sequência exata de nucleotídeos, modificados ou não, definindo 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 DNAs.

[00121] As sequências da presente invenção foram isoladas e/ou purificadas, isto é, foram amostradas direta ou indiretamente, por exemplo, por uma cópia, tendo sido seu ambiente pelo menos parcialmente modificado. Ácidos nucleicos isolados obtidos por genética

recombinante, por meio, por exemplo, de células hospedeiras, ou obtidos por síntese química, também devem ser mencionados aqui.

[00122] "Sequências nucleicas que apresentam uma percentagem de identidade de pelo menos 80%, preferencialmente de 85%, 90%, 95% e 98%, após alinhamento ótimo com uma sequência preferida" significa sequências nucleicas que exibem, em relação à sequência nucleica de referência, certas modificações tais como, em particular, uma supressão, um truncamento, um prolongamento, uma fusão quimérica e/ou uma substituição, particularmente pontual. De preferência, estas são sequências que codificam as mesmas sequências de aminoácidos da sequência de referência, esta sendo relacionada com a degeneração do código genético, ou sequências de complementaridade que são susceptíveis de hibridizar-se especificamente com as sequências de referência, preferencialmente sob condições altamente rigorosas, particularmente aquelas definidas abaixo.

[00123] A hibridização sob condições altamente rigorosas significa que condições relacionadas com temperatura e força iônica são selecionadas de tal maneira que permitem que a hibridação seja mantida entre dois fragmentos de DNA de complementaridade. Numa base puramente ilustrativa, as condições altamente rigorosas da etapa de hibridação com a finalidade de definir os fragmentos de polinucleotídeos acima descritos são, vantajosamente, como se seguem.

[00124] Hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA é realizada em duas etapas: (1) pré-hibridização a 42°C durante três horas em tampão de fosfato (20 mM, pH 7,5) contendo 5X SSC (1X SSC corresponde a uma solução de NaCl 0,15 M + citrato de sódio 0,015 M), formamida a 50%, dodecilsulfato de sódio (SDS) a 7%, 10X solução de Denhardt, sulfato de dextrano a 5% e DNA de esperma de salmão a 1%; (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), seguida de duas lavagens de 20 minutos a 20°C em 2X SSC + SDS a 2%, uma lavagem de 20 minutos a 20°C em 0,1X SSC + SDS a 0,1%. A última lavagem é realizada em 0,1X SSC + SDS a 0,1% durante 30 minutos a 60°C para uma sonda > 100 nucleotídeos de comprimento. As condições de hibridação altamente rigorosas acima descritas para um polinucleotídeo de tamanho definido podem ser adaptadas por um perito no estado da técnica para oligonucleotídeos mais longos ou mais curtos, de acordo com os procedimentos descritos *in Sambrook e colaboradores (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3ª edição, 2001)*.

[00125] A invenção também se refere a um vetor que compreende um ácido nucleico tal como descrito na invenção.

[00126] A invenção visa, particularmente, a clonagem e/ou vetores de expressão que contêm tal sequência de nucleotídeos.

[00127] Os vetores da invenção contêm de preferência elementos que permitem a expressão e/ou a secreção de sequências de nucleotídeos em uma determinada célula hospedeira. O vetor deve assim conter um promotor, sinais de início e terminação de tradução, bem como regiões adequadas de regulação de transcrição. O vetor deve ser capaz de se manter de forma estável na célula hospedeira e pode, opcionalmente, ter sinais específicos que especificam secreção da proteína traduzida. Esses vários elementos são selecionados e otimizados por um perito na técnica de acordo com a célula hospedeira utilizada. Com essa finalidade, as sequências de nucleotídeos podem ser inseridas em vetores de autorreplicação no hospedeiro escolhido ou ser vetores integrativos do hospedeiro escolhido.

[00128] Esses vetores são preparados por métodos normalmente utilizados por um perito no estado da técnica e os clones resultantes

podem ser introduzidos em um hospedeiro apropriado por métodos convencionais, tais como lipofecção, eletroporação, choque térmico ou métodos químicos.

[00129] Os vetores são, por exemplo, vetores de plasmídeo ou de origem viral. Eles são usados para transformar células hospedeiras de modo a clonar ou expressar as sequências de nucleotídeos da invenção.

[00130] A invenção também compreende células hospedeiras isoladas transformadas por vetor ou que compreendem um vetor, como descrito na presente invenção.

[00131] A célula hospedeira pode ser selecionada entre sistemas procarióticos ou eucarióticos, tais como células bacterianas, por exemplo, mas também células de levedura ou células animais, particularmente células de mamíferos (com exceção de ser humano). Células de insetos ou de plantas podem também ser usadas.

[00132] A invenção também se refere a animais, diferentes do ser humano, que têm uma célula transformada de acordo com a invenção.

[00133] Outro aspecto da invenção refere-se a um método para a produção de uma proteína de ligação ao antígeno de acordo com a invenção, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, caracterizado pelo fato de que o método compreende as seguintes etapas:

a cultura em um meio com as condições de cultura adequadas para uma célula hospedeira de acordo com a invenção; e

a recuperação da proteína de ligação ao antígeno, ou um de seus fragmentos de ligação ao antígeno, assim produzida a partir do meio de cultura ou das células cultivadas.

[00134] As células transformadas de acordo com a invenção são de uso em métodos para a preparação de proteínas recombinantes de ligação ao antígeno de acordo com a invenção. Métodos para a

preparação de proteínas de ligação ao antígeno de acordo com a invenção sob forma recombinante, caracterizados pelo fato de que usam um vetor e/ou uma célula transformada por um vetor de acordo com a invenção, também são incluídos na presente invenção. De preferência, uma célula transformada por um vetor de acordo com a invenção é cultivada sob condições que permitem a expressão da proteína de ligação ao antígeno acima referida e recuperada da proteína recombinante.

[00135] Como já mencionado, a célula hospedeira pode ser selecionada entre sistemas procariotas ou eucariotas. Em particular, é possível identificar as sequências de nucleotídeos da invenção que facilitam secreção de um sistema procariota ou eucariota como este. Um vetor de acordo com a invenção que transporta tal sequência pode, assim, ser utilizado vantajosamente para a produção de proteínas recombinantes a serem secretadas. De fato, a purificação dessas proteínas recombinantes de interesse será facilitada pelo fato de que elas estão presentes no sobrenadante da cultura celular em vez de no interior de células hospedeiras.

[00136] A proteína de ligação ao antígeno da invenção também pode ser preparada por síntese química. Um método de preparação como este é também um objetivo da invenção. Um perito no estado da técnica conhece métodos para síntese química, tais como técnicas de fase sólida (ver particularmente Steward e colaboradores, 1984, *Solid phase peptides synthesis*, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2ª ed., pp. 71-95) ou técnicas de fase sólida parcial, por condensação de fragmentos ou por síntese em solução convencional. Os polipeptídeos obtidos por síntese química e capazes de conter aminoácidos não naturais correspondentes são também incluídos na invenção.

[00137] A proteína de ligação ao antígeno, ou os fragmentos desta de ligação ao antígeno, que possam ser obtidos pelo método da

invenção, são também incluídos na presente invenção.

[00138] De acordo com um aspecto particular, a invenção diz respeito a uma proteína de ligação ao antígeno, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma, como descrito acima para uso como um produto de direcionamento a alvo para transporte de um agente citotóxico em um sítio-alvo do hospedeiro, o sítio-alvo do hospedeiro consistindo de um epítipo localizado no domínio extracelular da proteína Axl, de preferência, o domínio extracelular da proteína humana Axl, mais preferencialmente, o domínio extracelular da proteína humana Axl com a sequência SEQ ID NO: 31 ou 32, ou sua sequência variante natural.

[00139] Em uma modalidade de realização preferida, o sítio-alvo do hospedeiro é um local-alvo de uma célula de mamífero, mais preferencialmente de uma célula humana, mais preferencialmente células que, naturalmente ou por meio de recombinação genética, expressam a proteína Axl.

[00140] A invenção refere-se a um imunoc conjugado que compreende a proteína de ligação ao antígeno como descrita no presente relatório descritivo, conjugada com um agente citotóxico.

[00141] No sentido da presente invenção, a expressão "imunoc conjugado" ou "imuno-conjugado" refere-se geralmente a um composto que compreende pelo menos um produto de direcionamento a alvo fisicamente ligado a um ou mais agentes terapêuticos, criando, assim, um composto altamente dirigido a alvo.

[00142] Em uma modalidade de realização preferida, tais agentes terapêuticos consistem de agentes citotóxicos.

[00143] Por "agente citotóxico" ou "citotóxico", entende-se um agente que, quando administrado a um indivíduo, trata ou previne o desenvolvimento de proliferação celular, de preferência o desenvolvimento de câncer no corpo do indivíduo, mediante inibição ou prevenção de uma função celular e/ou levando a morte celular.

[00144] Muitos agentes citotóxicos têm sido isolados ou sintetizados e tornados possíveis de inibir a proliferação de células, ou destruir ou reduzir, se não de forma definitiva, pelo menos significativamente, as células tumorais. No entanto, a atividade tóxica desses agentes não se limita a células tumorais, e as células não tumorais são também afetadas e podem ser destruídas. Mais particularmente, efeitos secundários são observados em células que se renovam rapidamente, tais como células hematopoiéticas ou células do epitélio, em especial das membranas mucosas. A título de ilustração, as células do trato gastrointestinal são amplamente afetadas pelo uso de tais agentes citotóxicos.

[00145] Um dos objetivos da presente invenção é também ser capaz de fornecer um agente citotóxico que faça com que seja possível limitar os efeitos secundários sobre células normais, ao mesmo tempo que conserva uma elevada citotoxicidade em células de tumor.

[00146] Mais particularmente, o agente citotóxico pode de preferência consistir de, sem limitação, uma droga (ou seja, "conjugado anticorpo-fármaco"), uma toxina (por exemplo, "imunotoxina" ou "conjugado anticorpo-toxina"), um radioisótopo (isto é, "radioimunoconjugado" ou "conjugado anticorpo-radioisótopo") etc.

[00147] Em uma primeira modalidade de realização preferida da invenção, o imunoconjugado é constituído de uma proteína de ligação ligada a pelo menos um fármaco ou um medicamento. Tal imunoconjugado é referido como um conjugado anticorpo-fármaco (ou "CAF"), quando a proteína de ligação é um anticorpo, ou um fragmento deste de ligação ao antígeno.

[00148] Em uma primeira modalidade de realização, tais fármacos podem ser descritos em relação a seu modo de ação. Como exemplo não limitativo, podem-se mencionar agentes de alquilação, tais como mostarda nitrogenada, alquilsulfonatos, nitrosourea, oxazoforinas,

aziridinas ou iminaetilenos, antimetabólitos, antibióticos antitumorais, inibidores da mitose, inibidores da função da cromatina, agentes antiangiogênese, antiestrogênios, antiandrogênios, agentes quelantes, estimulante da absorção de ferro, inibidores da ciclo-oxigenase, inibidores da fosfodiesterase, inibidores de DNA, inibidores da síntese de DNA, estimulantes da apoptose, inibidores de timidilato, inibidores de células T, agonistas de interferon, inibidores da ribonucleosídeo trifosfato reductase, inibidores da aromatase, antagonistas de receptores de estrogênio, inibidores da tirosina quinase, inibidores do ciclo celular, taxano, inibidores de tubulina, inibidores de angiogênese, estimulantes de macrófagos, antagonistas dos receptores da neuroquinina, agonistas dos receptores de canabinoide, agonistas de receptores da dopamina, agonistas do fator de estimulação de granulócitos, agonistas dos receptores de eritropoietina, agonistas dos receptores de somatostatina, agonistas de LHRH, sensibilizadores de cálcio, antagonistas dos receptores de VEGF, antagonistas dos receptores de interleucina, inibidores de osteoclastos, estimulantes da formação de radicais, antagonistas dos receptores de endotelina, alcaloide da vinca, anti-hormônio ou imunomoduladores ou qualquer outro novo medicamento que preenche os critérios de atividade de um agente citotóxico ou uma toxina.

[00149] Esses fármacos são, por exemplo, citados no VIDAL 2010, na página dedicada aos compostos ligados à cancerologia e hematologia na coluna "Citotóxicos"; esses compostos citotóxicos citados com referência a esse documento são aqui citados como agentes citotóxicos preferidos.

[00150] Mais particularmente, sem limitação, os seguintes fármacos são particularmente preferidos de acordo com a invenção: mecloretamina, clorambucol, melfaleno, chloridrato, pipobromeno, prednimustina, fosfato dissódico, estramustina, ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida,

sulfosfamida, ifosfamida, tiotepa, trietilenamina, altetramina, carmustina, estreptozocina, fotemustina, lomustina, bussulfano, treossulfano, improssulfano, dacarbazina, cis-platina, oxaliplatina, lobaplatina, heptaplatina, hidrato de miriplatina, carboplatina, metotrexato, pemetrexed, 5-fluoruracila, floxuridina, 5-fluordesoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, citosina arabinosídeo, 6-mercaptopurina (6-MP), nelarabina, 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gencitabina, cladribina, desoxicoformicina, tegafur, pentostatina, doxorubicina, daunorubicina, idarrubicina, valrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina, procarbazona, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, topotecano, irinotecano, etoposido, valrubicina, cloridrato de amrubicina, pirarubicina, acetato de eliptínio, zorubicina, epirubicina, idarubicina e teniposido, razoxina, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023, halofuginona, COL-3, neovastat, talidomida, CDC 501, DMXAA, L-651582, esqualamina, endostatina, SU5416, SU6668, interferon-alfa, EMD121974, interleucina-12, IM862, angiostatina, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, iodoxifeno, anastrozol, letrozol, exemestano, flutamida, nilutamida, esprironolactona, acetato de ciproterona, finasterida, cimitidina, bortezomida, Velcade, bicalutamida, ciproterona, flutamida, fulvestrano, exemestano, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib, sunitinib, retinoide, rexinoide, metoxsaleno, metilaminolevulinato, aldesleucina, OCT-43, denileucina diflitox, interleucina-2, tasonermina, lentinano, sizofilano, roquinimex, pidotimod, pegademase, timopentina, poli I:C, procodazol, Tic BCG, *Corynebacterium parvum*, NOV-002, ucrânia, levamisol, 1311-chTNT, H-101, celmoleucina, interferon alfa2a, interferon alfa2b, interferon gama1a, interleucina-2, mobenacina, Rexina-G, teceleucina, aclarrubicina, actinomicina, arglabina, asparaginase, carzinofilina, cromomicina, daunomicina, leucovorina, masoprocol, neocarzinostatina,

peplomicina, sarkomicina, solamargina, trabectedina, estreptozocina, testosterona, cunecatequinas, sinecatequinas, alitretinoína, cloridrato de belotecano, calusterona, dromostanolona, acetato de eliptínio, etinilestradiol, etopossido, fluoximesterona, formestano, fosfetrol, acetato de goserelina, hexilaminolevulinato, histrelina, hidroxiprogesterona, ixabepilona, leuprolida, acetato de medorxiprogesterona, acetato de megesterol, metilprednisolona, metiltestosterona, miltefosina, mitobronitol, fenilpropionato de nadrolona, acetato de noretisterona, prednisolona, prednisona, temsirrolimo, testolactona, triamconolona, triptorrelina, acetato de vapreotida, zinostatina estimalâmero, amsacrina, trióxido de arsênico, cloridrato de bisantreno, clorambucila, clortrianiseno, cis-diaminodicloroplatina, ciclofosfamida, dietilestilbestrol, hexametilmelamina, hidroxiiureia, lenalidomida, lonidamina, mecloretanamina, mitotano, nedaplatina, cloridrato de nimustina, pamidronato, pipobromano, porfímero sódico, ranimustina, razoxano, semustina, sobuzoxano, mesilato, trietilenomelamina, ácido zoledrônico, mesilato de camostat, HCl de fadrozol, nafoxidina, aminoglutetimida, carmofur , clofarabina, citosina arabinosídeo, decitabina, doxifluridina, enocitabina, fosfato de fludarabne, fluoruracila, ftorafur, uracilmostarda, abarelix, bexaroteno, raltitexed, tamibaroteno, temozolomida, vorinostat, megastrol, clodronato dissódico, levamisol, ferumoxitol, ferro isomaltossida, celecoxib, Ibudilast, bendamustina, altretamina, mitolactol, temsirrolimo, pralatrexato, TS-1, decitabina, bicalutamida, futamida, letrozol, clodronato dissódico, degarelix, citrato de toremifeno, dicloridrato de histamina, DW-166HC, nitracrina, decitabina, cloridrato de irinotecano, amsacrina, romidepsina, tretinoína , cabazitaxel, vandetanib, lenalidomida, ácido ibandrônico, miltefosina, vitespeno, mifamurtida, nadroparina, granisetron, ondansetron, tropisetron, alizaprida, ramossetron, mesilato de dolasetron, fosaprepitant dimeglumina, nabilona, aprepitant, dronabinol, TY-10721, hidrogenomaleato de lissurida, epiceram, defibrotida, etexilato

de dabigatran, filgrastima, pegfilgrastima, reditux, epoetina, molgramostima, oprelvecina, sipuleucel-T, M-Vax, acetil-L-carnitina, cloridrato de donepezila, ácido 5-aminolevulínico, aminolevulinato de metila, acetato de cetorelix, icodextrina, leuprorrelina, metbilfenidato, octreotida, amlexanox, plerixafor, menatetrenona, anetol ditioneona, doxercalciferol, cloridrato cinacalcet, alefacept, romiplostima, timoglobulina, timalfasina, ubenimex, imiquimod, everolimo, sirolimo, H-101, lassofoxifeno, trilostano, incadronato, gangliosídeos, pegaptanib octassódico, vertoporfina, ácido minodrônico, ácido zoledrônico, nitrato de gálio, alendronato sódico, etidronato dissódico, pamidronato dissódico, dutasterida, estibogluconato de sódio, armodafinila, dexrazoxano, amifostina, WF-10, temoporfina, darbepoetina alfa, ancestima, sargramostima, palifermina, R-744, nepidermina, oprelvecina, denileucina diftotox, crisantaspasse, busserelina, deslorrelina, lanreotida, octreotida, pilocarpina, bosentano, caliqueamicina, maitansinoides e ciclónico.

[00151] Para mais detalhes, o perito no estado da técnica pode consultar o manual editado pela "*Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique*" e intitulado "*Traité de chimie thérapeutique*, vol. 6, *Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers*, edição TEC & DOC, 2003".

[00152] Em uma segunda modalidade de realização preferida da invenção, o imunocombinado é constituído de uma proteína de ligação ligada a pelo menos um radioisótopo. Tal imunocombinado é referido como um combinado de anticorpo-radioisótopo (ou "CAR"), quando a proteína de ligação é um anticorpo, ou um fragmento de ligação ao antígeno da mesma.

[00153] Para a destruição seletiva do tumor, o anticorpo pode compreender um átomo altamente radioativo. Uma variedade de isótopos radioativos está disponível para a produção de CAR, tais como, sem limitação, At²¹¹, C¹³, N¹⁵, O¹⁷, F¹⁹, I¹²³, I¹³¹, I¹²⁵, In¹¹¹, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶,

Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, tc^{99m}, Bi²¹², P³², Pb²¹², isótopos radioativos de Lu, gadolínio, manganês ou ferro.

[00154] Quaisquer métodos ou processos conhecidos pelo perito no estado da técnica podem ser utilizados para incorporar tais radioisótopos no CAR (ver, por exemplo, "*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*", Chatal, *CRC Press*, 1989). Como exemplo não limitativo, tc^{99m} ou I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ e In¹¹¹ podem ser ligados por meio de um resíduo de cisteína. Y⁹⁰ pode ser ligado por meio de um resíduo de lisina. I¹²³ pode ser ligado usando o método *IDOGEN* (Fraker e colaboradores (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57).

[00155] Vários exemplos podem ser citados para ilustrar o conhecimento do perito no estado da técnica no campo de CAR, como *Zevalin*[®], que é um composto CAR de um anticorpo monoclonal anti-CD20 e radioisótopo In¹¹¹ ou Y⁹⁰ ligados por um ligante-quelante de tioureia (Wiseman e colaboradores (2000), *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman e colaboradores (2002), *Blood* 99 (12):4336-42; Witzig e colaboradores (2002), *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig e colaboradores (2002), *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69); ou *Mylotarg*[®], que é composto de um anticorpo anti-CD33 ligado a caliqueamicina (EUA 4.970.198, 5.079.233, 5.585.089, 5.606.040, 5.693.762, 5.739.116, 5.767.285, 5.773.001). Mais recentemente, também pode ser mencionado o CAF referido como *Adcetris* (correspondente ao brentuximab vedotina) que foi recentemente aceito pela FDA no tratamento de linfoma de Hodgkin (*Nature*, vol. 476, pp. 380-381, 25 de agosto de 2011).

[00156] Em uma terceira modalidade de realização preferida da invenção, o imunoconjugado é constituído de uma proteína de ligação ligada a pelo menos uma toxina. Tal imunoconjugado é referido como um conjugado anticorpo-toxina (ou "ATV"), quando a proteína de ligação é um anticorpo, ou um fragmento deste de ligação ao antígeno.

[00157] Toxinas são venenos eficazes e específicos produzidos por organismos vivos. Elas consistem geralmente em uma cadeia de aminoácidos que pode variar em peso molecular entre um par de centenas (peptídeos) e cem mil (proteínas). Elas podem também ser compostos orgânicos de baixo peso molecular. As toxinas são produzidas por numerosos organismos, por exemplo, bactérias, fungos, algas e plantas. Muitas delas são extremamente venenosas, com uma toxicidade que é várias ordens de magnitude maior do que os agentes nervosos.

[00158] As toxinas utilizadas em ATC podem incluir, sem limitação, todos os tipos de toxinas que podem exercer os seus efeitos citotóxicos por mecanismos que incluem ligação de tubulina, ligação de DNA ou inibição da topoisomerase.

[00159] Toxinas enzimaticamente ativas e seus fragmentos que podem ser usados incluem cadeia A de difteria, fragmentos ativos não ligantes de toxina da difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcuma, crotina, inibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos.

[00160] Toxinas de moléculas pequenas, tais como dolastatinas, auristatinas, um tricoteceno e CC1065, e os derivados dessas toxinas que possuem atividade de toxina, são também aqui contemplados. Dolastatinas e auristatinas têm demonstrado interferir na dinâmica dos microtúbulos, hidrólise de GTP e divisão nuclear e celular, e apresentam atividade anticâncer e antifúngica.

[00161] "Ligante", "Unidade de Ligação" ou "ligação" significam uma porção química que compreende uma ligação covalente ou uma cadeia

de átomos que liga covalentemente uma proteína de ligação a, pelo menos, um agente citotóxico.

[00162] Ligantes podem ser produzidos utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais, tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimido-metil)cicloexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tal como suberato de dissuccinimidila), aldeídos (tal como glutaraldeído), compostos de bis-azido (tal como bis(p-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-ativos (tal como 1,5-diflúor-2,4-dinitrobenzeno). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno-triaminopentacético marcado com carbono 14 (MX-DTPA) é um exemplo de agente quelante para a conjugação de agentes citotóxicos no sistema de direcionamento a alvo. Outros reagentes de reticulação podem ser BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC e sulfo-SMPB, e SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfono)benzoato), que estão comercialmente disponíveis (por exemplo, a partir de *Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill., EUA*).

[00163] O ligante pode ser um ligante "não clivável" ou "clivável".

[00164] Em uma modalidade de realização preferida, o ligante consiste em um "ligante clivável" que facilita a liberação do agente citotóxico na célula. Por exemplo, podem ser usados um ligante instável em ácido, ligante sensível a peptidase, ligante fotolável, ligante de dimetila ou ligante contendo dissulfeto. O ligante é, em uma modalidade de realização preferida, clivável sob condições intracelulares, de modo que a clivagem do ligante libere o agente citotóxico da proteína de ligação no meio intracelular.

[00165] Por exemplo, em algumas modalidades de realização, o ligante é clivável por um agente de clivagem que está presente no ambiente intracelular (por exemplo, dentro de um lisossoma ou endossoma ou cavéola). O ligante pode ser, por exemplo, um ligante de peptidila que é clivado por uma enzima peptidase ou protease intracelular, incluindo, mas sem limitação, uma protease lisossômica ou endossômica. Tipicamente, o ligante de peptidila são pelo menos dois aminoácidos de comprimento ou pelo menos três aminoácidos de comprimento. Agentes de clivagem podem incluir catepsinas B e D e plasmina, os quais são todos sabidos hidrolisar derivados de fármacos dipeptídicos, resultando na liberação de fármaco ativo no interior das células-alvo. Por exemplo, pode ser utilizado um ligante de peptidila que é clivável pela protease dependente de tiol catepsina B, que é altamente expressa em tecido canceroso (por exemplo, um ligante Phe-Leu ou um ligante Gly-Phe-Leu-Gly). Em modalidades de realização específicas, o ligante de peptidila clivável por uma protease intracelular é um ligante Val-Cit ou um ligante Phe-Lys. Uma vantagem de usar liberação proteolítica intracelular do agente citotóxico é que o agente é tipicamente atenuado quando conjugado e a estabilidade dos conjugados em relação ao soro é geralmente elevada.

[00166] Em outras modalidades de realização, o ligante clivável é sensível a pH, isto é, sensível a hidrólise em certos valores de pH. Normalmente, o ligante sensível a pH é hidrolisável sob condições ácidas. Por exemplo, pode ser utilizado um ligante instável em ácido que é hidrolisável no lisossoma (por exemplo, uma hidrazona, semicarbazona, tiossemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal ou similar). Tais ligantes são relativamente estáveis sob condições de pH neutro, tais como aqueles no sangue, mas são instáveis sob um pH inferior a 5,5 ou 5,0, o pH aproximado do lisossoma. Em certas modalidades de realização, o ligante hidrolisável é um ligante de tioéter

(tal como, por exemplo, um tioéter ligado ao agente terapêutico por meio de uma ligação de acil-hidrazona.

[00167] Em ainda outras modalidades de realização, o ligante é clivável sob condições de redução (por exemplo, um ligante de dissulfeto). Uma variedade de ligantes de dissulfeto é conhecida no estado da técnica, incluindo, por exemplo, aqueles que podem ser formados utilizando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) e SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)tolueno)-, SPDB e SMPT.

[00168] Como exemplo não limitativo de ligantes não cliváveis ou ligantes "não redutíveis", pode ser mencionado o imunocjugado trastuzumab-DM1 (TDM1) que combina trastuzumab com um agente de quimioterapia associado, maitansina (*Cancer Research* 2008; 68:(22). 15 de novembro de 2008).

[00169] Numa modalidade de realização preferida, o imunocjugado da invenção pode ser preparado por qualquer método conhecido pelo perito no estado da técnica, tais como, sem limitação, i) reação de um grupo nucleofílico da proteína de ligação ao antígeno com um reagente ligante bivalente, seguida de reação com o agente citotóxico, ou ii) a reação de um grupo nucleofílico de um agente citotóxico com um reagente ligante bivalente, seguida de reação com o grupo nucleófilo da proteína de ligação ao antígeno.

[00170] Grupos nucleófilos sob a proteína de ligação ao antígeno incluem, sem limitação, grupos amina com término N, grupos amina com cadeia lateral, por exemplo, lisina, grupos tiol com cadeia lateral e grupos hidroxila ou amino de açúcar, quando a proteína de ligação ao antígeno é glicosilada. Grupos amina, tiol e hidroxila são grupos nucleofílicos e capazes de reagir de modo a formar ligações covalentes com grupos eletrofílicos em porções ligantes e reagentes ligantes,

incluindo, sem limitação, ésteres ativos tais como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos e haletos de ácido; haletos de alquila e de benzila tais como haloacetamidas; grupos aldeídos, cetonas, carboxila e maleimida. A proteína de ligação ao antígeno pode ter dissulfetos intercadeia redutíveis, ou seja, pontes de cisteína. As proteínas de ligação ao antígeno podem ser tornadas reativas para conjugação com reagentes ligantes por tratamento com um agente redutor tal como DTT (ditiotreitól). Cada ponte de cisteína formará, assim, teoricamente, dois nucleófilos tiol reativos. Grupos nucleofílicos adicionais podem ser introduzidos na proteína de ligação ao antígeno por meio de qualquer reação conhecida pelo perito no estado da técnica. Como exemplo não limitativo, grupos tiol reativos podem ser introduzidos na proteína de ligação ao antígeno mediante introdução de um ou mais resíduos de cisteína.

[00171] Imunoconjugados podem também ser produzidos por modificação da proteína de ligação ao antígeno para introduzir porções eletrofílicas, que podem reagir com substituintes nucleofílicos no reagente ligante ou agente citotóxico. Os açúcares de proteína glicosilada que se liga a antígeno podem ser oxidados para formar grupos aldeído ou cetona que podem reagir com o grupo amina de reagentes ligantes ou agente citotóxico. Os grupos base de Schiff imina resultantes podem formar uma ligação estável ou podem ser reduzidos para formar ligações de amina estáveis. Em uma modalidade de realização, reação da porção hidrato de carbono de uma proteína glicosilada que se liga a antígeno com galactose oxidase ou meta-periodato de sódio pode originar grupos carbonila (aldeído e cetona) na proteína, os quais podem reagir com grupos adequados no fármaco. Em outra modalidade de realização, proteínas que contêm resíduos serina ou treonina com término N podem reagir com meta-periodato de sódio, resultando na produção de um aldeído em lugar do primeiro aminoácido.

[00172] Em certas modalidades de realização preferidas, a unidade de ligação pode ter a seguinte fórmula geral:



em que:

-T- é uma unidade de extensão;

a é 0 ou 1;

-W- é uma unidade de aminoácido;

w é independentemente um número inteiro que varia de 1 a 12;

-Y- é uma unidade espaçadora;

y é 0, 1 ou 2.

[00173] A unidade de extensão (-T-), quando presente, liga a proteína de ligação ao antígeno a uma unidade de aminoácido (-W-). Grupos funcionais úteis que podem estar presentes na proteína de ligação ao antígeno, quer naturalmente, quer por manipulação química, incluem sulfidril, amino, hidroxila, o grupo hidroxila anomérico de um hidrato de carbono, e carboxila. Grupos funcionais adequados são sulfidril e amino. Grupos sulfidril podem ser gerados pela redução das pontes dissulfeto intramolecular da proteína de ligação ao antígeno, se presente. Alternativamente, grupos sulfidril podem ser gerados por meio de reação de grupo amino de uma porção lisina da proteína de ligação ao antígeno com 2-iminotiolano ou outros reagentes geradores de sulfidril. Em modalidades de realização específicas, a proteína de ligação ao antígeno é um anticorpo recombinante e é engenheirada para transportar uma ou mais lisinas. Mais preferencialmente, a proteína de ligação ao antígeno pode ser engenheirada para transportar uma ou mais cisteínas (cf. *ThioMabs*).

[00174] Em certas modalidades de realização específicas, a unidade de extensão forma uma ligação com um átomo de enxofre da proteína de ligação ao antígeno. O átomo de enxofre pode ser derivado de um

grupo sulfidril (-SH) de um grupo reduzido de uma proteína de ligação ao antígeno.

[00175] Em certas outras modalidades de realização específicas, a unidade de extensão liga-se à proteína de ligação ao antígeno via uma ligação dissulfeto entre um átomo de enxofre da proteína de ligação ao antígeno e um átomo de enxofre da unidade de extensão.

[00176] Em outras modalidades de realização específicas, o grupo reativo da unidade de extensão contém um sítio reativo que pode ser reativo com um grupo amino da proteína de ligação ao antígeno. O grupo amino pode ser aquele de uma arginina ou uma lisina. Sítios reativos amina adequados incluem, mas sem limitação, ésteres ativados tais como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenila, ésteres de pentafluorfenila, anidridos, cloretos de ácido, cloretos de sulfonila, isocianatos e isotiocianatos.

[00177] Em ainda outro aspecto, a função reativa da unidade de extensão contém um sítio reativo que é reativo com um grupo hidrato de carbono modificado que pode estar presente na proteína de ligação ao antígeno. Numa modalidade de realização específica, a proteína de ligação ao antígeno é glicosilada enzimaticamente para proporcionar uma porção hidrato de carbono (observe-se que, quando a proteína de ligação ao antígeno é um anticorpo, o anticorpo é em geral glicosilado naturalmente). O carboidrato pode ser levemente oxidado com um reagente tal como periodato de sódio e a unidade carbonila resultante do hidrato de carbono oxidado pode ser condensada com uma unidade de extensão que contém uma funcionalidade tal como uma hidrazida, uma oxima, uma amina reativa, uma hidrazina, uma tiossemicarbazida, um carboxilato de hidrazina ou uma aril-hidrazida.

[00178] A unidade aminoácido (-W-) liga a unidade de extensão (-T-) à unidade espaçadora (-Y-), se a unidade espaçadora está presente, e liga a unidade de extensão ao agente citotóxico, se a unidade

espaçadora está ausente.

[00179] Como mencionado acima, -Ww- pode ser uma unidade dipeptídeo, tripeptídeo, tetrapeptídeo, pentapeptídeo, hexapeptídeo, heptapeptídeo, octapeptídeo, nonapeptídeo, decapeptídeo, undecapeptídeo ou dodecapeptídeo.

[00180] Em algumas modalidades de realização, a unidade aminoácido pode compreender resíduos de aminoácidos, tais como, sem limitação, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, prolina, lisina protegida com acetila ou formila, arginina, arginina protegida com grupos tosila ou nitro, histidina, ornitina, ornitina protegida com acetila ou formila e citrulina. Componentes de ligação de aminoácidos exemplares incluem de preferência um dipeptídeo, um tripeptídeo, um tetrapeptídeo ou um pentapeptídeo.

[00181] Dipeptídeos exemplares incluem: Val-Cit, Ala-Val, Lys-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Phe, Phe-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosil-Arg, Phe-N⁹-Nitro-Arg.

[00182] Tripeptídeos exemplares incluem: Val-Ala-Val, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn-Phe-Phe-Lys, Gly-Gly-Gly, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys.

[00183] Tetrapeptídeos exemplares incluem: Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 33), Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 34).

[00184] Pentapeptídeo exemplares incluem: Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 35).

[00185] Resíduos de aminoácidos que compreendem um componente de ligação de aminoácidos incluem os que ocorrem naturalmente, bem como aminoácidos menores e análogos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente, tal como citrulina. Componentes de ligação de aminoácidos podem ser concebidos e otimizados em sua seletividade para clivagem enzimática por uma enzima particular, por exemplo, uma protease associada a tumor,

catepsina B, C e D, ou uma protease de plasmina.

[00186] A unidade de aminoácido da unidade de ligação pode ser clivada enzimaticamente por uma enzima que inclui, mas sem limitação, uma protease associada a tumor para libertar o agente citotóxico.

[00187] A unidade de amino ácido pode ser concebida e otimizada em sua seletividade para clivagem enzimática por uma protease associada a tumores em particular. As unidades adequadas são aquelas cuja clivagem é catalisada pelas proteases, catepsina B, C e D, e plasmina.

[00188] A unidade de espaçamento (-Y-), quando presente, liga uma unidade de aminoácido ao agente citotóxico. Unidades espaçadoras são de dois tipos gerais: autoimolativas e não autoimolativas. Uma unidade espaçadora não autoimolativa é aquela em que parte ou toda a unidade de espaçamento permanece ligada ao agente citotóxico após clivagem enzimática de uma unidade de aminoácido do imunocombinado. Exemplos de uma unidade de espaçamento não autoimolativa incluem, mas sem limitação, unidade de espaçamento (glicina-glicina) e uma unidade de espaçamento glicina. Para liberar o agente citotóxico, uma reação de hidrólise independente deve ter lugar dentro da célula-alvo para clivar a ligação da unidade glicina-fármaco.

[00189] Noutra modalidade de realização, uma unidade espaçadora não autoimolativa (-Y-) é-Gly-.

[00190] Numa modalidade de realização, o imunocombinado carece de uma unidade espaçadora ($y = 0$). Alternativamente, um imunocombinado contendo uma unidade de espaçamento autoimolativa pode liberar o agente citotóxico sem a necessidade de uma etapa de hidrólise separada. Nessas modalidades de realização, -Y- é uma unidade álcool p-aminobenzílico (PAB) que se liga a -Ww- por intermédio do átomo de nitrogênio do grupo PAB, e liga-se diretamente a -D por meio de um grupo carbonato, carbamato ou éter.

[00191] Outros exemplos de espaçadores autoimolativos incluem, mas sem limitação, compostos aromáticos que são eletronicamente equivalentes ao grupo PAB, tais como derivados 2-aminoimidazol-5-metanol e orto ou para-aminobenzilacetais. Podem ser utilizados espaçadores que sofrem fácil ciclização após hidrólise da ligação amida, tais como amidas substituídas e não-substituídas do ácido 4-aminobutírico, sistemas de anéis adequadamente substituídos biciclo [2.2.1] e biciclo [2.2.2] e amidas do ácido 2-aminofenilpropiónico.

[00192] Em uma modalidade de realização alternativa, a unidade de espaçamento é uma unidade de bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificado, que pode ser usado para incorporar agentes citotóxicos adicionais.

[00193] Finalmente, a invenção refere-se a um imunoc conjugado como descrito acima para uso no tratamento de câncer.

[00194] Cânceres podem ser preferencialmente selecionados de cânceres relacionados com Axl, incluindo células tumorais que expressam ou superexpressam toda ou parte da proteína Axl em sua superfície.

[00195] Mais particularmente, esses cânceres são câncer de mama, cólon, carcinoma de esôfago, câncer hepatocelular, gástrico, glioma, pulmão, melanoma, osteossarcoma, câncer de ovário, próstata, rabdomiossarcoma, renal, de tireoide, câncer do endométrio uterino e qualquer fenômeno de resistência a medicamentos. Outro objeto da invenção é uma composição farmacêutica que compreende o imunoc conjugado como descrito no relatório descritivo.

[00196] Mais particularmente, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende o imunoc conjugado da invenção com pelo menos um excipiente e/ou um veículo farmacêutico aceitável.

[00197] Na presente descrição, a expressão "veículo farmacêuticamente aceitável" ou "excipiente" destina-se a indicar um composto ou

uma combinação de compostos que entram em uma composição farmacêutica sem provocar reações secundárias e que permitem, por exemplo, facilitar a administração do(s) composto(s) ativo(s), um aumento em sua vida útil e/ou em sua eficácia no corpo, um aumento em sua solubilidade em solução ou, então, uma melhoria em sua conservação. Esses veículos e excipientes farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos e serão adaptados pelo perito no estado da técnica em função da natureza e do modo de administração do(s) composto(s) ativo(s) escolhido(s).

[00198] Preferencialmente, esses imunocombinados serão administrados por via sistêmica, em particular por via intravenosa, por via intramuscular, intradérmica, intraperitoneal ou subcutânea, ou por via oral. De um modo mais preferido, a combinação que compreende os imunocombinados acordo com a invenção será administrada várias vezes, de modo sequencial.

[00199] Seus modos de administração, dosagens e formas farmacêuticas ótimas podem ser determinados de acordo com os critérios geralmente levados em conta no estabelecimento de um tratamento adaptado a um paciente, tais como, por exemplo, a idade ou o peso corporal do paciente, a gravidade de sua condição geral, a tolerância ao tratamento e os efeitos secundários observados.

[00200] Outras características e vantagens da invenção aparecem na continuação da descrição com os exemplos e as figuras cujas legendas são representadas abaixo.

LEGENDAS DAS FIGURAS

[00201] Figura 1: Ensaio de citotoxicidade *in vitro* utilizando o anticorpo secundário combinado mAb-zap em células SN12C.

[00202] Figuras 2A, 2B e 2C: Especificidade de ligação de 1613F12 na proteína imobilizada rhAxl-Fc (2A), proteína rhDtk-Fc (2B) ou proteína rhMer-Fc (2C) por meio de ELISA.

[00203] Figura 3: Análise por SCAF da ligação de 1613F12 em células tumorais humanas.

[00204] Figura 4: ELISA da proteína imobilizada rmAxl-Fc ("rm" de recombinante murino).

[00205] Figura 5: Ligação de 1613F12 em células COS7, conforme determinado por protocolo de marcação indireta, utilizando método de citometria de fluxo.

[00206] Figura 6: Competição ELISA de ligação de Gas6 usando 1613F12.

[00207] Figura 7: Análise de ligação de epítomos por *Western blot* usando lisado de células SN12C. NH (sem calor); NR (sem redução); H (calor); R (redução). Detecção de GAPDH atesta a carga de amostra correta no gel.

[00208] Figuras 8A e 8B: Estudo de inibição de Axl após ligação de 1613F12 em células SN12C por *Western blot* com Figura 8 - Imagem de *Western blot* representativa de três experimentos independentes realizados (a análise de *Western blot* foi realizada após uma incubação de 4 h e 24 h de 1613F12 em células SN12C); e Figura 8B - Quantificação de densidade óptica do filme apresentado utilizando o software "*QuantityOne*".

[00209] Figuras 9A, 9B e 9C: Microscopia por imunofluorescência de células SN12C após incubação com 1613F12. Figura 9A - Fotografias das condições de controle do isotipo mlgG1 tanto para a membrana quanto para a coloração intracelular. Figura 9B – Coloração da membrana. Figura 9C - Coloração intracelular tanto do receptor Axl usando 1613F12 quanto do marcador inicial endossoma EEA1. Sobreposições de imagens são apresentadas abaixo e colocalizações visualizadas são indicadas pelas setas.

[00210] Figura 10: Efeito de 1613F12 na proliferação *in vitro* de células SN12C em comparação com o efeito do anticorpo de controle

do isotipo mlgG1.

[00211] Figuras 11A-11K: Ensaio direto de citotoxicidade do imunoconjugado 1613F12-saporina usando várias linhagens de células de tumores humanos. A-SN12C, B-Calu-1, C-A172, D-A431, E-DU145, F-MDA-MB435S, G-MDA-MB231, H-PC3, I-NCI-H226, J-NCI-H125, K-Panc1.

[00212] Figura 12: Experimentos de ELISA estudando ligação à proteína rhAxl-Fc de ambos os anticorpos m1613F12 e hz1613F12.

[00213] Figura 13: Comparação de ligação dos anticorpos murino, quimérico e humanizado 1613F12 em células SN12C.

[00214] Figura 14: Ensaio direto de citotoxicidade na presença tanto do imunoconjugado de camundongo e humanizado 1613F12-saporina quanto dos controles de isotipo usando linhagem de células de tumor renal humano SN12C.

[00215] Figura 15: Ensaio direto de citotoxicidade na presença tanto do imunoconjugado de camundongo e humanizado 1613F12-saporina quanto dos controles de isotipo usando linhagem de células de carcinoma de pulmão humano Calu-1.

EXEMPLOS

[00216] Nos exemplos seguintes, as expressões anticorpo 1613F12 ou anticorpo m1613F12 referem-se a uma forma murina do anticorpo 1613F12. Formas humanizadas do anticorpo 1613F12 são denominadas hz1613F12.

[00217] Da mesma maneira, o anticorpo de controle de isotipo utilizado consiste de uma IgG1 murina referida como 9G4. Isso significa que, nos exemplos que seguem, as expressões controle de mlgG1 e 9G4 são similares.

Exemplo 1: Internalização do receptor Axl

[00218] Como uma abordagem de imunoconjugado é mais eficiente quando o antígeno-alvo é uma proteína de internalização, foi estudada a internalização do receptor Axl usando ensaio de citotoxicidade mAb-

Zap em linhagens de células de tumores humanos. Mais precisamente, o reagente de mAb-Zap é um conjugado químico que inclui uma IgG de cabra antirrato purificada por afinidade e a proteína de inativação de ribossomas, saporina. Se ocorre internalização do complexo imune, saporina rompe-se do agente de direcionamento a alvo e inativa os ribossomos, resultando na inibição da síntese de proteínas e, finalmente, morte celular. Determinação da viabilidade celular após 72 horas de incubação com o anticorpo de controle do isotipo 1613F12 ou mIgG1 em células positivas a Axl permite concluir sobre a internalização do receptor Axl induzida por 1613F12.

[00219] Para este exemplo, foram utilizadas células altamente positivas a Axl, tal como determinado usando o reagente *Qifikit (Dako)*. Os dados são apresentados na tabela 5 a seguir.

Tabela 5

Capacidade de ligação a antígeno do anticorpo comercial MAB154 determinada pelas células de câncer renal humano SN12C	
RTK	AXL
Anticorpo Linhagem da célula	MAB154
SN12C	>100 000

[00220] No exemplo a seguir, as células SN12C foram usadas como exemplo não limitativo. Qualquer outra linhagem de células que expresse nível apropriado de receptor Axl em sua superfície celular pode ser usada.

[00221] Faixas de concentrações do anticorpo de controle do isotipo 1613F12 ou mIgG1 foram pré-incubadas com 100 ng de anticorpo secundário mAb-Zap (sistemas de direcionamento a alvo avançados) em meio de cultura de células durante 30 min a TA. Essas misturas foram carregadas em células SN12C subconfluentes plaqueadas em microplacas de placa branca de 96 poços. As placas foram incubadas

durante 72 h a 37°C na presença de 5% de CO₂. Viabilidade celular foi determinada utilizando um método de proliferação de células *Cell Titer Glo* de acordo com as instruções do fabricante (*Promega*). Vários controles são realizados: i) sem qualquer imunocorpuscular secundário e ii) sem anticorpuscular primário. Em paralelo, são realizados ensaios com um controle de isotipo mlgG1.

[00222] Os resultados obtidos estão representados na Figura 1.

[00223] 1613F12 mostra um efeito citotóxico máximo sobre as células SN12C de ~36%. Nenhum efeito citotóxico foi observado na presença do anticorpuscular 9G4, considerado como controle de isotipo mlgG1 no experimento. Nenhuma citotoxicidade foi observada em poços contendo apenas anticorpusculares primários (dados não mostrados). Assim, o receptor Axl parece ser um antígeno conveniente para orientar uma abordagem de imunocorpuscular, na medida em que o complexo imune que compreende Axl-1613F12-mAbZap desencadeia uma citotoxicidade eficaz das células-alvo.

Exemplo 2: Geração de um anticorpuscular contra DEC rhAxl.

[00224] Para gerar anticorpusculares monoclonais murinos (mAbs) contra o domínio extracelular humano (DEC) do receptor Axl, cinco ratinhos BALB/c foram imunizados cinco vezes s.c. com 15-20 x 10⁶ células CHO-Axl e duas vezes com 20 µg de DEC rhAxl. A primeira imunização foi realizada na presença de Adjuvante Completo de Freund (*Sigma*, St. Louis, MD, EUA). Adjuvante incompleto de Freund (*Sigma*) foi adicionado para imunizações posteriores.

[00225] Três dias antes da fusão, murganhos imunizados foram estimulados tanto com 20 x 10⁶ células CHO-Axl e 20 µg do DEC rhAxl com IFA.

[00226] Para gerar hibridomas, esplenócitos e linfócitos foram preparados por perfusão do baço e picagem dos nodos linfáticos proximais, respectivamente, colhidos de 1 dos 5 ratinhos imunizados

(selecionados após titulação de soros) e fundidos com células de mieloma Sp2/0-Ag14 (ATCC, *Rockville*, MD, EUA). O protocolo de fusão é descrito por Kohler e Milstein (*Nature*, 256:495-497, 1975). As células fundidas são então submetidas a seleção com HAT. Em geral, para a preparação de anticorpos monoclonais ou seus fragmentos funcionais, especialmente de origem murina, é possível referir-se a técnicas que são descritas em particular no manual "*Antibodies*" (Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 726, 1988).

[00227] Aproximadamente dez dias após a fusão, colônias de células híbridas foram rastreadas. Para a primeira pesquisa, sobrenadantes de hibridomas foram avaliados quanto à secreção de mAbs originados contra a proteína DEC Axl usando um ELISA. Em paralelo, uma análise SCAF foi realizada para selecionar mAbs capazes de se ligar à forma celular de Axl presente na superfície da célula, utilizando tanto células wt CHO quanto células CHO que expressam Axl (ATCC).

[00228] Tão rapidamente quanto possível, hibridomas selecionados foram clonados por diluição limite e subsequentemente pesquisados quanto à sua reatividade contra a proteína DEC Axl. mAbs clonados foram então isotipados usando um *kit* de isotipagem (Nº cat. 5300.05, *Southern Biotech*, *Birmingham*, AL, EUA). Um clone obtido de cada hibridoma foi selecionado e ampliado.

[00229] Ensaio ELISA foram realizados como se segue utilizando sobrenadante de hibridoma puro, ou, quando o teor de IgG nos sobrenadantes foi determinado, titulação foi realizada a partir de 5 µg/mL. Em seguida, foi realizada uma diluição em série 1/2 nas 11 filas seguintes.

[00230] Resumidamente, placas ELISA de 96 poços (*Costar 3690*, *Corning*, NY, EUA) foram revestidas com 50 µL/poço da proteína rhAxl-Fc (Sistemas R e D, Nº cat. 154-AL) ou DEC rhAxl sob 2 µg/mL em PBS

durante a noite a 4°C. As placas foram então bloqueadas com PBS contendo gelatina a 0,5% (Nº 22151, *Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemanha*) durante 2 h a 37°C. Uma vez descartado o tampão de saturação agitando rapidamente as placas, 50 µL de sobrenadantes de células de hibridoma puras ou 50 µL de uma solução 5 µg/mL foram adicionados às placas ELISA e incubados durante 1 h a 37°C. Após três lavagens, 50 µL de IgG policlonal de cabra antirrato conjugada com peroxidase de rábano (Nº 115-035-164, *Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, EUA*) foram adicionados sob uma diluição de 1/5.000 em PBS contendo gelatina a 0,1% e *Tween 20* a 0,05% (p:p) durante 1 h a 37°C. Em seguida, as placas ELISA foram lavadas três vezes e substrato TMB (Nº UP664782, *Uptima, Interchim, França*) foi adicionado. Depois de um tempo de incubação de 10 min a temperatura ambiente, a reação foi parada utilizando ácido sulfúrico 1 M e a densidade óptica a 450 nm foi medida.

[00231] Para a seleção por citometria de fluxo, 10⁵ células (wt CHO ou CHO-Axl) foram plaqueadas em cada poço de uma placa de 96 poços, em PBS contendo BSA a 1% e azida de sódio a 0,01% (tampão de SCAF), a 4°C. Após dois minutos de centrifugação a 2.000 rpm, o tampão foi removido e sobrenadantes de hibridoma ou mAbs purificados (1 µg/mL) a ser testados foram adicionados. Após 20 min de incubação a 4°C, células foram lavadas duas vezes e um anticorpo de cabra antirrato conjugado com Alexa 488 diluído 1/500° em tampão de SCAF (Nº A11017, *Molecular Probes Inc., Eugene, EUA*) foi adicionado e incubado durante 20 minutos a 4°C. Após uma lavagem final com tampão de SCAF, células foram analisadas por SCAF (*FACSCalibur, Becton-Dickinson*), após adição de iodeto de propídio em cada tubo, sob uma concentração final de 40 µg/mL. Poços contendo células isoladas e células incubadas com o anticorpo secundário conjugado com Alexa 488 foram incluídos como controlos negativos. Controles de isotipo

foram utilizados em cada experimento (*Sigma*, ref. M90351MG). Pelo menos 5.000 células foram avaliadas para o cálculo do valor médio de intensidade da fluorescência (IMF).

[00232] Mais precisamente, a fusão foi realizada com 300×10^6 de esplenócitos colhidos e 300×10^6 células de mieloma (razão 1:1). Duas centenas de células da suspensão de células resultante foram então plaqueadas em 2×10^6 células/mL em 30 placas de 96 poços.

[00233] A primeira pesquisa (em torno do 14º dia após a fusão) tanto por ELISA na proteína DEC rhAxl quanto por análise SCAF usando tanto células wt CHO quanto células CHO que expressam Axl permitiram selecionar dez hibridomas apresentando densidades ópticas (DOs) superiores a 1 no revestimento de DEC rhAxl, IMF abaixo de 50 em células wt CHO e acima de 200 em células CHO-Axl.

[00234] Esses dez hibridomas foram expandidos e clonados por diluição limite. Uma placa de 96 poços foi preparada para cada código. Nove dias após o plaqueamento, sobrenadantes de placas de clonagem foram primeiramente rastreados por ELISA em relação à sua especificidade de ligação para o domínio extracelular da proteína DEC rhAxl. Três clones de cada código foram expandidos e isotipados. Uma vez produzidos, os anticorpos anti-Axl foram ainda estudados quanto à sua capacidade de ser internalizados após ligação de Axl na superfície celular.

Exemplo 3: Especificidade de ligação de Axl

[00235] Neste exemplo, a ligação de 1613F12 foi estudada em primeiro lugar com a proteína rhAxl-Fc. Em seguida, foi estudada sua ligação com os outros dois membros da família TAM, rhDtk-Fc e rhMer-Fc.

[00236] Resumidamente, as proteínas recombinantes humanas Axl-Fc (sistemas R e D, N° cat. 154AL/CF), rhDtk (Sistemas R e D, N° cat. 859-DK) ou rhMer-Fc (Sistemas R e D, N° cat. 891-MR) foram revestidas durante a noite a 4°C em placas *Immulon II* de 96 poços, e,

após uma etapa de bloqueio de 1 h com uma solução de gelatina a 0,5%, anticorpo purificado 1613F12 foi adicionado por 1 h adicional a 37°C, sob concentração inicial de 5 µg/mL ($3,33 \cdot 10^{-8}$ M). Em seguida, diluições em série $\frac{1}{2}$ foram realizadas em 12 colunas. As placas foram lavadas e uma IgG-HRP de cabra específica antirrato (*Jackson*) foi adicionada durante 1 hora a 37°C. O desenvolvimento da reação foi realizado usando a solução de substrato TMB. O anticorpo mIgG1 de controle de isotipo e o anticorpo comercial anti-Axl mAb 154 foi também usado em paralelo. Controles de revestimento foram realizados na presença de um soro policlonal de IgG Fc de cabra anti-humana marcado com HRP (*Jackson*, ref. 109-035-098) e/ou na presença de um anticorpo anti-histidina acoplado a HRP (Sistemas R e D, ref.: MAB050H). Os resultados estão representados nas Figuras 2A, 2B e 2C, respectivamente.

[00237] Este exemplo mostra que o anticorpo 1613F12 só se liga à proteína rhAxl-Fc e não se liga aos dois outros membros da família TAM, rhDtk ou rhMer. Nenhuma especificidade cruzada de ligação do anticorpo 1613F12 é observada entre os membros TAM. Nenhuma ligação não específica foi observada na ausência de anticorpo primário (diluído). Nenhuma ligação foi observada na presença do anticorpo de controle de isotipo.

Exemplo 4: 1613F12 reconheceu a forma celular de Axl expressa em células tumorais.

[00238] Nível de expressão de Axl na superfície de células tumorais humanas foi primeiramente estabelecido utilizando um anticorpo comercial Axl (Sistemas R e D, ref.: MAB154) em paralelo com grânulos de calibração para permitir a quantificação do nível de expressão de Axl. Em segundo lugar, ligação de Axl em superfície celular foi estudada usando 1613F12.

[00239] Para os estudos de ligação de superfície celular, duas

diluições em série em dobro de solução de anticorpo primário 10 µg/mL ($6,66 \times 10^{-8}$ M), (1613F12, anticorpo MAB154 ou controle de isotipo mIgG1 9G4 mAb) são preparadas e aplicadas em 2×10^5 células por 20 min a 4°C. Após três lavagens em solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS) suplementada com BSA a 1% e NaN_3 a 0,01%, as células foram incubadas com o anticorpo secundário Alexa 488 de cabra antirrato (diluição 1/500°) durante 20 minutos a 4°C. Após três lavagens adicionais em PBS suplementado com BSA a 1% e NaN_3 a 0,1%, células foram analisadas por SCAF (*FACSCalibur*, *Becton-Dickinson*). Pelo menos 5.000 células foram avaliadas para o cálculo do valor médio da intensidade da fluorescência.

[00240] Para determinação quantitativa de ABC usando anticorpo MAB154, são usadas esferas de calibração *QIFIKIT*®. Em seguida, as células são incubadas, em paralelo com os grânulos *QIFIKIT*®, com imunoglobulinas policlonais de cabra antirrato/FITC, cabra F(ab')_2 , na concentração de saturação. O número de sítios antigênicos das células de amostra é então determinado por interpolação da curva de calibração (a intensidade de fluorescência das populações individuais de grânulos contra o número de moléculas de mAb nos grânulos).

4.1. Quantificação do nível de expressão de Axl em superfície celular

[00241] Nível de expressão de Axl na superfície de células tumorais humanas foi determinado por citometria de fluxo usando ensaio de imunofluorescência indireta (método *QIFIKIT*® (*Dako*, Dinamarca)), um *kit* de citometria de fluxo quantitativa para avaliar antígenos da superfície celular. Uma comparação da intensidade média de fluorescência (IMF) dos níveis de antígeno conhecidos dos grânulos via um gráfico de calibração permite a determinação da capacidade de ligação a anticorpos (ABC) das linhagens de células.

[00242] A Tabela 6 apresenta níveis de expressão de Axl detectados na superfície de várias linhagens de células tumorais humanas (SN12C,

Calu-1, A172, A431, DU145, MDA-MB435S, MDA-MB231, PC3, NCI-H226, NCI-H125, MCF7, Panc 1) (ATCC, NCI), conforme determinado empregando QIFIKIT®, usando o anticorpo comercial MAB154 (Sistemas R e D). Os valores são dados como complexo de ligação ao antígeno (ABC).

Tabela 6

	MCFT	NCI- H125	MDA- MB- 4355	Pac1	MDA- MB-231	Calu-1	SN12C
Tumor	Mama	NSCLC	Mama	Pâncreas	Mama	Pulmão	Renal
Tipo/orgão							
ABC (Qifikit)	71	5 540	17 814	36 809	61 186	>100 000	> 100 000
	A172	A431	DU-145	PC3	NCI- H226		
Tumor	glioblastoma	Carcinoma	Próstata	Próstata	NSCLC		
Tipo/orgão		epidermoide					
ABC (Qifikit)	52421	3953	55268	8421	32142		

[00243] Os resultados obtidos com um anticorpo monoclonal comercial Axl (MAB154) mostraram que o receptor Axl é expresso em vários níveis, dependendo da célula de tumor humano considerada.

4.2. Detecção de Axl por 1613F12 em células tumorais humanas

[00244] Mais especificamente, ligação de Axl foi estudada usando 1613F12.

[00245] Curvas dose-resposta de 1613F12 foram preparadas. IMFs obtidas utilizando as várias células tumorais humanas foram então analisadas com o *software Prism*. Os dados são apresentados na Figura 3.

[00246] Os dados indicam que 1613F12 liga-se especificamente ao receptor Axl de membrana como atestam os perfis da curva de saturação. No entanto, foram observadas diferentes intensidades de marcação, revelando níveis variáveis de receptor Axl na superfície de

células tumorais humanas. Nenhuma ligação de receptor Axl foi observada usando linhagem de células de tumor de mama humano MCF7.

Exemplo 5: Especificidade cruzada interespecies de 1613F12

[00247] Para abordar a especificidade cruzada a espécie de 1613F12, duas espécies foram consideradas: rato e macaco. Primeiro, a ligação no receptor Axl recombinante de rato (rm) é estudado por ELISA (Figura 4). Em seguida, experimentos de citometria de fluxo foram realizados utilizando células COS7 de macaco, uma vez que essas células expressam o receptor Axl em sua superfície (Figura 5). A linhagem de células COS7 foi obtida por imortalização de uma linhagem de células CV-1 derivada de células do rim do macaco verde africano, com uma versão do genoma de SV40 que pode produzir o antígeno T grande, mas tem um defeito na replicação genômica.

ELISA de rmAxl-Fc

[00248] Resumidamente, as proteínas Axl-Fc recombinantes de rato (Sistemas R e D, N° cat. 854-AX/CF) foram revestidas durante a noite a 4°C em placas *Immulon II* de 96 poços e, após uma etapa de bloqueio de 1 h com uma solução de gelatina a 0,5%, o anticorpo purificado 1613F12 foi adicionado durante uma hora adicional a 37°C, sob concentração inicial de 5 mg/mL ($3,33 \times 10^{-8}$ M). Em seguida, diluições em série $\frac{1}{2}$ foram realizadas em 12 colunas. As placas foram então lavadas e uma IgG HRP de cabra específica antirrato (*Jackson*) foi adicionada durante 1 hora a 37°C. O desenvolvimento da reação foi realizado usando a solução de substrato TMB. O controle de isotipo mIgG1 e o anticorpo comercial mAb 154 são também usados em paralelo. Controles de revestimento são realizados na presença de um soro policlonal IgG-Fc anti-humano de cabra acoplado a HRP (*Jackson*, ref. 109-035-098) e/ou na presença de um anticorpo anti-histidina acoplado a HRP (Sistemas R e D, ref.: MAB050H).

[00249] Os resultados estão representados na Figura 4. Essa figura mostra que 1613F12 não se liga ao domínio murino DEC Axl. Nenhuma ligação específica é observada na ausência de anticorpo primário (diluyente).

SCAF de COS7

[00250] Para estudos de ligação celular de 1613F12 utilizando células COS7, 2×10^5 células foram incubadas com uma faixa de concentrações de anticorpo preparadas por diluição em série $\frac{1}{2}$ (12 pontos) de uma solução de anticorpo de $10 \mu\text{g/mL}$ ($6,66 \times 10^{-8}$ M) de 1613F12 ou controle mAb de isotipo mIgG1, durante 20 min a 4°C . Após três lavagens em solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS) suplementada com BSA a 1% e NaN_3 a 0,01%, células foram incubadas com anticorpo secundário Alexa 488 de cabra antirrato (diluição 1/500) durante 20 minutos a 4°C . Após três lavagens adicionais em PBS suplementado com BSA a 1% e NaN_3 a 0,1%, células foram analisadas por SCAF (*FACSCalibur*, *Becton-Dickinson*). Pelo menos 5.000 células foram avaliadas para o cálculo do valor médio da intensidade de fluorescência. Os dados são analisados utilizando o *software Prism*.

[00251] Os resultados estão representados na Figura 5. A curva de titulação estabelecida sobre células COS7 utilizando 1613F12 confirma que 1613F12 é capaz de reconhecer a forma celular de macaco do receptor Axl expressa na superfície das células COS7. Platô é atingido por concentrações de 1613F12 acima de $0,625 \mu\text{g/mL}$ ($4,2 \times 10^{-10}$ M). Nenhuma ligação é observada na presença do controle de isotipo mIgG1.

[00252] Este exemplo ilustra o fato de 1613F12 não reagir de forma cruzada com o receptor Axl de rato. Em contraste, ele se liga fortemente ao receptor Axl de macaco expresso na superfície de células COS7.

Exemplo 6: Experimentos de competição de Gas6 realizados na presença de 1613F12

[00253] Para caracterizar adicionalmente 1613F12, ensaios de competição de Gas6 foram realizados. Nesse ensaio, a proteína rhAxl-Fc livre e 1613F12 são incubados para formar complexos antígeno-anticorpo e, em seguida, os complexos são carregados na superfície da placa de ensaio revestida com Gas6. Os complexos anticorpo-antígeno não ligados são lavados antes da adição de anticorpo secundário ligado a enzima contra a porção Fc humana da proteína rhAxl-Fc. O substrato é depois adicionado e a concentração de antígeno pode ser determinada pela intensidade do sinal provocado pela reação enzima-substrato.

[00254] Em resumo, misturas reacionais que compreendem a proteína rhAxl-Fc na presença ou não dos mAbs anti-Axl a ser testados são preparadas em uma placa saturada separada (gelatina a 0,5% em PBS IX). Diluições em série 1:2 (partindo de 80 µg/mL em 12 colunas) de anticorpos murinos anti-Axl são realizadas. Em seguida, 0,5 µg/mL da proteína rhAxl-Fc é adicionado (Sistemas R e D, ref. 154AL/CF), exceto à linhagem de controle negativo que contém apenas diluente de ELISA (gelatina a 0,1%, *Tween 20* a 0,05% em PBS 1X). Após homogeneização, as amostras de competição são carregadas em placas revestidas com Gas6, com uma solução de rhGas6 6 µg/mL em PBS (Sistemas R e D, N° cat. 885-GM-CS/CF). Depois de incubação e diversas lavagens, proteínas rhAxl-Fc ligadas são detectadas utilizando um anticorpo de cabra IgG-HRP anti-humano (*Jackson*, ref. 109-035-098). Uma vez ligado, o substrato TMB é adicionado às placas. A reação é parada por adição de solução de ácido H₂SO₄ 1 M e as densidades ópticas obtidas lidas a 450 nm utilizando um instrumento de leitura de microplacas.

[00255] Esse experimento (Figura 6) mostra que 1613F12 é capaz de competir com a ligação de rhAxl-Fc em seu ligante imobilizado. Competição com ligação de Gas6 ocorre na presença de concentrações

de anticorpos 1613F12 acima de 2,5 µg/mL ($1,67 \times 10^{-8}$ M). Nenhuma ligação mais de rhAxl-Fc em Gas6 imobilizado é observada na presença de uma concentração de 1613F12 acima de 10 µg/mL ($6,67 \times 10^{-8}$ M). 1613F12 bloqueia ligação de Gas6 a rhAxl-Fc.

Exemplo 7: Reconhecimento de epítomos por *Western blot*

[00256] Para determinar se 1613F12 reconhece um epítipo linear ou um epítipo conformacional, análise *Western blot* foi efetuada utilizando lisados de células SN12C. Amostras foram tratadas de forma diferente para se encontrar em condições de redução ou de não redução. Se uma faixa é visualizada com amostra reduzida, o anticorpo testado atinge um epítipo linear do domínio DEC; se não, ele é disparado contra um epítipo de conformação de DEC Axl.

[00257] Células SN12C foram semeadas em meio RPMI + FBS a 10% inativado com calor + L-glutamina 2 mM sob 5×10^4 células/cm² em frascos de T162 cm² durante 72 horas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS) e lisadas com 1,5 ml de tampão de lise resfriado com gelo [Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); NaCl 150 mM; *Nonidet P40* a 1%; desoxicolato a 0,5%; e um comprimido de coquetel completo inibidor da protease mais 1% de antifosfatases]. Lisados celulares foram agitados durante 90 min a 4°C e limpos a 15.000 rpm durante 10 min. A concentração de proteínas foi quantificada usando BCA. Várias amostras foram carregadas. Primeiro, 10 µg de lisado de células inteiras (10 µg em 20 µL) foram preparados em condições de redução (1 x tampão de amostra (*BIORAD*) + 1x agente redutor (*BIORAD*)) e carregada em SDS-PAGE após 2 min de incubação a 96°C. Em segundo lugar, duas outras amostras de 10 µg de lisado de células inteiras foram preparados em condições não redutoras (em 1x tampão de amostra (*BIORAD*) apenas). Antes de ser carregado no gel de SDS-PAGE, um desses dois últimos exemplos é

aquecido sob 2 min de incubação a 96°C; o outro é mantido em gelo. Após a migração, as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram saturadas durante 1 h a TA com *TBS-Tween 20* a 0,1% (TBST), leite sem gordura a 5% e sondadas com 1613F12 sob 10 µg/mL durante a noite a 4°C. Anticorpos foram diluídos em solução fisiológica tamponada com Tris - *Tween 20* a 0,1% (v/v) (TBST) com 5% de leite em pó sem gordura. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (diluição 1/1.000) durante 1 h a TA. Proteínas imunorreativas foram visualizadas com ECL (*Pierce* N° 32209). Após a visualização de Axl, as membranas foram lavadas novamente com TBST e incubadas durante 1 h a TA com anticorpo antirrato anti-GAPDH (diluição 1/200.000). Em seguida, as membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase, por 1 h a TA. As membranas foram lavadas e GAPDH foi revelada utilizando ECL.

[00258] Os resultados estão representados na Figura 7.

[00259] 1613F12 reconhece principalmente um epítipo conformacional, uma vez que uma banda específica é essencialmente observada em condições não reduzidas. No entanto, um sinal fraco é detectado nas condições de migração desnaturantes do lisado de células SN12C, indicando que 1613F12 é capaz de se ligar fracamente a um epítipo linear.

Exemplo 8: Medição de inativação de Axl desencadeada por 1613F12 por *Western blot*.

[00260] No exemplo a seguir, a linhagem de células SN12C de carcinoma de células renais humanas (ATCC) foi selecionada para dirigir a atividade de anticorpos Axl na expressão do receptor Axl. A linhagem de células SN12C superexpressa o receptor Axl. A inativação de Axl foi estudada por *Western blot* em extratos de células inteiras nas Figuras 8A-8B.

[00261] Células SN12C foram semeadas em meio RPMI + FBS a 10% inativado termicamente + L-glutamina 2 mM sob 6×10^4 células/cm² em placas de seis poços, durante 48 h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após duas lavagens com solução fisiológica de tampão de fosfato (PBS), células foram privadas de soro em um meio contendo 800 ng/mL de ligante Gas6 de rato recombinante (Sistemas R e D, ref.: 986-GS/CF), ou 10 µg/mL de um anticorpo de controle de isotipo mIgG1 (9G4) ou 10 µg/mL do anticorpo Axl da presente invenção, e incubadas durante 4 horas ou 24 horas adicionais. Em seguida, o meio foi suavemente removido e as células lavadas duas vezes com PBS frio. As células foram lisadas com 200 µL de tampão de lise resfriado com gelo [Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); NaCl 150 mM; *Nonidet P40* a 1%; desoxicolato a 0,5%; e um comprimido de coquetel completo inibidor da protease mais 1% de antifosfatases]. Lisados celulares foram agitados durante 90 min a 4°C e limpos a 15.000 rpm durante 10 min. A concentração de proteínas foi quantificada usando o método BCA. Lisados de células inteiras (10 µg em 20 µL) foram preparados por SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram saturadas durante 1 h a TA com *TBS-Tween 20* a 0,1% (TBST), leite sem gordura a 5% e sondadas com um anticorpo comercial M02 Axl sob 0,5 µg/mL (*AbNova* H00000558-M02) durante a noite a 4°C. Os anticorpos foram diluídos em solução fisiológica tamponada com Tris - *Tween 20* a 0,1% (v/v) (TBST) com 5% de leite em pó sem gordura. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (diluição 1/1.000) durante 1 h a TA. Proteínas imunorreativas foram visualizadas com ECL (*Pierce* Nº 32209). Após a visualização de Axl, as membranas foram lavadas novamente com TBST e incubadas durante 1 h a TA com anticorpo antirrato anti-GAPDH (diluição 1/200.000). Em seguida, as membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpos

secundários conjugados com peroxidase, por 1 h a TA. As membranas foram lavadas e GAPDH foi revelada utilizando ECL. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria.

[00262] Os resultados apresentados nas Figuras 8A e 8B são representativos de três experimentos independentes e demonstram que 1613F12 é capaz de inativar Axl em uma linhagem de células de tumor humano que superexpressam Axl. Em 4 horas, 1613F12 desencadeia uma inativação de 66% de Axl, e até 87% após uma incubação de 24 horas com 1613F12.

Exemplo 9: Estudo por citometria de fluxo do efeito de 1613F12 sobre a expressão de Axl na superfície celular

[00263] Técnica de citometria de fluxo permite marcação de receptor Axl na superfície celular. A utilização dessa técnica pode ressaltar o efeito de anticorpos sobre a expressão de Axl em membrana. Células SN12C de tumor renal humano que expressam elevados níveis de Axl foram usadas neste exemplo.

[00264] Linhagem de células SN12C de tumor cultivadas em RPMI1640 com L-glutamina a 1% e 10% de FCS durante 3 dias antes do experimento. Células foram então separadas utilizando tripsina e plaqueadas em placa de 6 poços múltiplos em RPMI1640 com L-glutamina a 1% e FBS a 5%. No dia seguinte, anticorpos de interesse foram adicionados a 10 µg/mL. Poços não tratados também foram incluídos. As células são incubadas a 37°C, 5% de CO₂. Vinte e quatro horas mais tarde, as células foram lavadas com PBS, separadas e incubadas com os mesmos anticorpos de interesse em tampão de SCAF (PBS, BSA a 1%, azida de sódio a 0,01%). Poços não tratados também foram coradas com o mesmo anticorpo a fim de comparar a intensidade do sinal obtido com o mesmo mAb nas células tratadas e células não-tratadas. Células foram incubadas durante 20 minutos a 4°C e lavadas três vezes com tampão de SCAF. Um anticorpo IgG de cabra

antirrato marcado com Alexa 488 foi incubado durante 20 minutos e as células foram lavadas três vezes antes da análise por SCAF em população de células negativas a iodeto de propídio.

[00265] Dois parâmetros são determinados: (i) a diferença do sinal fluorescente detectado na superfície de células não tratadas (sem Ab) em comparação com as células tratadas com Ab em T24 h e (ii) a percentagem de Axl remanescente na superfície da célula. A percentagem de Axl remanescente é calculada como segue:

$$\% \text{ restante de Axl} = (\text{IMF}_{\text{Ab 24 h}} / \text{IMF}_{\text{sem Ab 24 h}}) \times 100$$

[00266] Dados de um experimento representativo são apresentados na Tabela 7. Os resultados foram reproduzidos em três experimentos independentes.

[00267] A diferença de IMF entre a coloração de um mAb nas células não tratadas e a condição tratada com o mesmo anticorpo reflete uma inativação da proteína Axl na superfície das células, devido à ligação do mAb considerado. Condições sem anticorpo deram resultados semelhantes à condição na presença do anticorpo de controle de isotipo (m9G4).

Tabela 7

Marcação	Tratamento	IMF a T24h	$\Delta(\text{IMF}_{\text{Sem Ab 24 h}} - \text{IMF}_{\text{Ab 24 h}})$	% de Axl remanescente
1613F12	No Ab	934	514	45,2
	1613F12	424		
9G4	No Ab	11	-2	117
	9G4	13		
MAB154	No Ab	950	ND	ND
	9G4	ND		

[00268] Os dados demonstram que a intensidade média de fluorescência detectada na superfície das células tratadas com 1613F12 durante 24 horas é reduzida (-514) em comparação com os IMFs obtidos com células não tratadas marcadas com 1613F12. Após 24 h de incubação com o anticorpo 1613F12, 45,2% do receptor Axl da

superfície da célula permanece na superfície de células SN12C.

Exemplo 10: Estudo de internalização de 1613F12 usando marcação imunocitoquímica fluorescente

[00269] Resultados da internalização complementar são obtidos por microscopia confocal utilizando método de marcação fluorescente indireta.

[00270] Resumidamente, linhagem de células de tumor SN12C foi cultivada em RPMI1640 com L-glutamina a 1% e 10% de FCS, durante três dias antes do experimento. Células foram então separadas utilizando tripsina e plaqueadas em placa de seis poços múltiplos contendo em RPMI 1640 com L-glutamina a 1% e FCS a 5%. No dia seguinte, 1613F12 foi adicionado sob 10 µg/mL. Células tratadas com um anticorpo irrelevante também foram incluídas. As células foram então incubadas durante 1 h e 2 h a 37°C, 5% de CO₂. Para T 0 h, células foram incubadas durante 30 minutos a 4°C para a determinação da ligação do anticorpo à superfície celular. As células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído durante 15 minutos. As células foram lavadas ligeiramente e incubadas com um anticorpo de cabra antirrato IgG Alexa 488 durante 60 minutos a 4°C para identificar anticorpo remanescente na superfície da célula. Para seguir a penetração de anticorpo nas células, células foram fixadas e permeabilizadas com saponina. Um anticorpo de cabra antirrato IgG Alexa 488 (*Invitrogen*) foi utilizado para corar tanto a membrana quanto o anticorpo intracelular. Endossomas precoces foram identificados utilizando um anticorpo policlonal de coelho contra EEA1 revelado com um anticorpo de cabra anti-coelho IgG-Alexa 555 (*Invitrogen*). Células foram lavadas três vezes e os núcleos foram corados com Draq5. Após a coloração, células foram montadas em meio de montagem *Prolong Gold* (*Invitrogen*) e analisados por meio de um microscópio confocal Zeiss LSM 510.

[00271] As fotografias são apresentadas nas Figuras 9A-9C.

[00272] Imagens foram obtidas por microscopia confocal. Na presença do controle de isotipo I (9G4), nem coloração da membrana, nem marcação intracelular são observadas (Figura 9A). A perda progressiva da marcação de membrana anti-Axl é observada logo após 1 h de incubação das células SN12C com 1613F12 (Figura 9B). Acumulação intracelular do anticorpo 1613F12 é claramente observada em 1 h e 2 h (Figura 9C). Anticorpo intracelular colocaliza-se com EEA1, um marcador de endossoma inicial. Essas fotografias confirmam a internalização de 1613F12 em células SN12C.

Exemplo 11: Atividade antitumoral *in vitro* mediada por anti-Axl

Ensaio de proliferação de SN12C

[00273] Dez mil células SN12C por poço foram semeadas em meio sem FCS em placas de 96 poços durante a noite a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. No dia seguinte, as células foram pré-incubadas com 10 µg/mL de cada anticorpo durante 1 h a 37°C. As células foram tratadas com ou sem rmGas6 (Sistemas R e D, N° cat. 986-GS/CF), mediante adição do ligante diretamente no poço, e, em seguida, deixadas crescer durante 72 h. Proliferação foi medida após incorporação de ³H timidina.

[00274] Os dados são apresentados na figura 10. Nenhum efeito foi observado com 1613F12 que é silencioso quando adicionados a células SN12C.

Exemplo 12: Potência da citotoxicidade de imunoconjugado 1613F12-saporina em várias linhagens de células de tumores humanos

[00275] No presente exemplo, está documentada a potência da citotoxicidade de 1613F12 acoplado a saporina. Com esse propósito, foram realizados ensaios diretos de citotoxicidade *in vitro* usando um grande painel de linhagens de células tumorais humanas (Figuras 11A-11K). Esse painel de linhagem de células tumorais oferece várias

expressões de Axl em superfície celular.

[00276] Resumidamente, 5.000 células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços em 100 µL de meio de cultura adequado (DO) FBS a 5%. Após 24 horas de incubação em atmosfera com 5% de CO₂, a 37°C, uma faixa de concentrações do imunocjugado (1613F12-saporina ou 9G4-saporina ou 1613F12 ou 9G4 nus) é aplicado às células. As placas de cultura são então incubadas a 37°C numa incubadora de atmosfera úmida com 5% CO₂ durante 72 horas.

[00277] Em D4, a viabilidade celular é avaliada usando o *kit* Viabilidade Celular Luminescente *CellTiter-Glo*® (*Promega Corp., Madison, Wisconsin*) que permite determinar o número de células viáveis em cultura com base na quantificação do ATP presente, um indicador de células metabolicamente ativas. Emissões luminescentes são registradas por um dispositivo luminômetro.

[00278] A partir da saída de luminescência, calcula-se a percentagem de citotoxicidade utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidade} = 100 - [(RLU_{Ab-sap} \times 100) / RLU_{No Ab}]$$

[00279] Nas Figuras 11A-11K são colocados juntos gráficos que apresentam citotoxicidade percentual em função da concentração de imunocjugado obtido em ensaios distintos de citotoxicidade de células *in vitro* com (A) SN12C, (B) Calu-1, (C) A 172, (D) A431, (E) DU145, (F) MDA-MB-435S, (G) MDA-MB-231, (H) PC3, (I) NCI-H226, (J) NCI-H125 ou (K) células tumorais Panc1 tratadas com uma faixa de concentrações de imunocjugado 1613F12-saporina.

[00280] As Figuras 11A-11K mostram que o imunocjugado 1613F12-saporina desencadeada citotoxicidade nessas linhagens de células tumorais humanas diferentes. A potência do efeito de citotoxicidade resultante depende da linhagem de células de tumor humano.

Exemplo 13: Humanização dos domínios variáveis de anticorpos 1613F12

[00281] O uso de anticorpos de rato (mAbs) para aplicações terapêuticas em seres humanos geralmente resulta em um grande efeito adverso, dando origem nos pacientes uma resposta a anticorpos humanos antirrato (HAMA), reduzindo assim a eficácia do tratamento e impedindo administração contínua. Uma abordagem para ultrapassar esse problema é humanizar mAbs de rato, substituindo as sequências de rato por suas contrapartes humanas, mas sem alterar a atividade de ligação ao antígeno. Isso pode ser conseguido de duas maneiras principais: (i) construindo anticorpos quiméricos rato/humanos, em que as regiões variáveis de ratinho são unidas a regiões constantes humanas (Boulianne e colaboradores, 1984) e (ii) enxertando as regiões determinantes de complementaridade (RDCs) das regiões variáveis de ratos em regiões variáveis humanas selecionadas cuidadosamente e depois unindo essas regiões variáveis "humanas reconfiguradas" a regiões constantes humanas (Riechmann e colaboradores, 1988).

13.1. Projeto de versão humanizada do anticorpo 1613F12

13.1.1 Humanização do domínio variável de cadeias leves VL

[00282] Como etapa preliminar, a sequência de nucleotídeos de 1613F12 VL foi comparada com a parte de sequências de genes de linhagem germinativa murina do banco de dados IMGT (<http://www.imgt.org>). Genes de linhagem germinativa de murídeos GKV16-104*01 e IGKJ5*1 foram identificados. A fim de identificar o melhor candidato humano para o enxerto de RDCs, foi pesquisado o gene de linhagem germinativa humana que apresentasse a melhor identidade com a sequência de 1613F12 VL murino. Com a ajuda das ferramentas de análise do banco de dados IMGT, foi identificado um possível receptor de regiões humanas V das RDCs de 1613F12 VL murino: IGKV1-27*01 e IGKJ4*02. A fim de realizar a humanização do domínio variável de cadeias leves, cada resíduo que é diferente entre as sequências humanas e de murganho foi estabelecida uma ordem de

classificação de prioridade. Essas prioridades (1-4) foram usadas para criar 11 diferentes variantes humanizadas da região variável de cadeias leves com até 14 retromutações.

	FR1-IMGT	CDR1-IMGT	FR2-IMGT	CD
1613F12VL Homsap IGKV1-27*01	DIQMTQSPFSLATSPGETITINCRAS	KSI.....SKY	LAWYQEKPGKTNKLLIY	SG
	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS	QGI.....SNY	LAWYQKPKGKVPKLLIY	AA
Prioridade	V I Y A T P E T I N		E T N	
	1 1 3 34 4 433 2		3 33	
hz1613F12 (VL1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPKGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL1I2V)	DVQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPKGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL1M4I)	DIQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPKGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.1)	DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPKGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.1V49T)	DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPKGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.1P50N)	DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPKGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.2)	DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPKGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.2V49T)	DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPKGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.2P50N)	DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPKGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.3)	DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQEKPGKTNKLLIY	SG
hz1613F12 (VL3)	DVQITQSPSLAASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQEKPGKTNKLLIY	SG
	R2-IMGT	FR3-IMGT		
1613F12VL Homsap IGKV1-27*01S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	E F M F	
Prioridade			4 4 4 2	
hz1613F12 (VL1)S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
hz1613F12 (VL1I2V)S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
hz1613F12 (VL1M4I)S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
hz1613F12 (VL2.1)S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
hz1613F12 (VL2.1V49T)S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
hz1613F12 (VL2.1P50N)S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
hz1613F12 (VL2.2)S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
hz1613F12 (VL2.2V49T)S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
hz1613F12 (VL2.2P50N)S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
hz1613F12 (VL2.3)S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
hz1613F12 (VL3)S	TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
	CDR3-IMGT	FR4-IMGT		
1613F12VL Homsap IGKJ4*02	QQHHEYPLT	FGAGTELEIK		
	LT	FGGGTRVEIK		
Prioridade		A E L L		
		3 33 4		
hz1613F12 (VL1)	QQHHEYPLT	FGGGTRVEIK		
hz1613F12 (VL1I2V)	QQHHEYPLT	FGGGTRVEIK		
hz1613F12 (VL1M4I)	QQHHEYPLT	FGGGTRVEIK		
hz1613F12 (VL2.1)	QQHHEYPLT	FGGGTRVEIK		
hz1613F12 (VL2.1V49T)	QQHHEYPLT	FGGGTRVEIK		
hz1613F12 (VL2.1P50N)	QQHHEYPLT	FGGGTRVEIK		
hz1613F12 (VL2.2)	QQHHEYPLT	FGGGTRVEIK		
hz1613F12 (VL2.2V49T)	QQHHEYPLT	FGGGTRVEIK		
hz1613F12 (VL2.2P50N)	QQHHEYPLT	FGGGTRVEIK		
hz1613F12 (VL2.3)	QQHHEYPLT	FGGGTRVEIK		
hz1613F12 (VL3)	QQHHEYPLT	FGAGTELEIK		

13.1.2 Humanização do domínio variável de cadeias pesadas VP

[00283] De forma a identificar o melhor candidato humano ao enxerto de RDCs, foram pesquisados os genes de linhagens germinativas de rato e humanas apresentando a melhor identidade com 1613F12 VP. A sequência de nucleotídeos de 1613F12 VP foi alinhada com sequências de genes de linhagens germinativas tanto

de rato quanto humanas, utilizando o *software* de alinhamento de sequências "IMGT/V-QUEST" que faz parte do banco de dados IMGT. Alinhamentos de sequências de aminoácidos também foram realizados para verificar os resultados do alinhamento de sequências de nucleotídeos utilizando o *software* "Align X" do pacote *VectorNTI*. O alinhamento com genes de linhagens germinativas de rato mostrou que o gene V de IGHV14-3*02 e o gene J de IGHJ2*01 são os genes de linhagens germinativas de rato mais homólogos. Usando o banco de dados IMGT, a linhagem germinativa de gene D de rato IGHD1-1*01 foi identificada como sequência homóloga. A fim de selecionar uma linhagem germinativa humana apropriada para o enxerto de RDCs, foi identificado o gene de linhagem germinativa humana com a maior homologia com a sequência de murideo 1613F12 VP. Com a ajuda do banco de dados IMGT e ferramentas, o gene de linhagem germinativa humana IGHV1-2*02 e o gene de linhagem germinativa humana IGHJ5*01J foram selecionados como sequências receptoras humanas para as RDCs murinas 1613F12 VP. A fim de realizar a humanização do domínio variável de cadeias pesadas de cada resíduo que é diferente entre as sequências humanas e de murganho foi estabelecida uma ordem de classificação de prioridade (1-4). Essas prioridades foram usadas para criar 20 diferentes variantes humanizadas da região variável de cadeias pesadas, com até 18 retromutações,

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CD (
1413F12	EVNLDQSSGA.ELVKRFQASVYKLSCTAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
Nomeap 1GRV1-2*02	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GYTY....TDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	IN
Prioridade	K R Q	L V	L T	I K R E I R
	3 2 3	33	3 3	1 3 4 4 3 2
ha1413F12 (VR1)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR1M391)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR1M558M64K)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR1I949)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR1H958)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR1I948M95N)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.1)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.1Q3H)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.1M558)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.1M64K)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.1M558M64K)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.1M650)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.1M64KX900)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.2)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.2M99L)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.3)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.3M558)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.3Q3M558)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR2.4)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD
ha1413F12 (VR3)	QVQLVQSSGA.EVVKRFQASVYKVSCKAS	GFNI....RDTY	ISMVWQAPOQGLEKHW	LD

R2-IMGT (54-65) FR3-IMGT (66-104)

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CD (
1413F12	FA..RGT KYQRFQ.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
Nomeap 1GRV1-2*02	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
Prioridade	K QW	A S SW	LQ S T E	
	2 344	4 2 11	33 4 4 4	
ha1413F12 (VR1)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR1M391)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR1M558M64K)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR1I949)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR1H958)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR1I948M95N)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.1)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.1Q3H)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.1M558)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.1M64K)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.1M558M64K)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.1M650)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.1M64KX900)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.2)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.2M99L)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.3)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.3M558)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.3Q3M558)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR2.4)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		
ha1413F12 (VR3)	FA..RGT NYAQRFD.GAVTHRDTSIISTAYNELRLS	SCCTAVYYC		

CDR3-IMGT (94-104) FR4-IMGT (105-132)

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CD (
1413F12VH	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
Nomeap 1GRV1-2*01	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
Prioridade	TL6			
	444			
ha1413F12 (VR1)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR1M391)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR1M558M64K)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR1I949)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR1H958)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR1I948M95N)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.1)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.1Q3H)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.1M558)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.1M64K)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.1M558M64K)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.1M650)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.1M64KX900)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.2)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.2M99L)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.3)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.3M558)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.3Q3M558)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR2.4)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		
ha1413F12 (VR3)	ARGATYYGSGGLFTYDY	WQGTLLVTVSS		

3.2. Validação de hz1613F12 versus m1613F12

[00284] A fim de determinar se 1613F12 humanizado era comparável à sua forma murina 1613F12, experimentos de ligação foram realizados tanto por ELISA, utilizando ensaios de proteína rhAxl-Fc, e por SCAF utilizando células SN12C. Em complemento, ensaios de citotoxicidade direta *in vitro* foram realizados usando células de tumor renal humano SN12C e linhagem de células de carcinoma de pulmão humano Calu-1.

[00285] Primeiramente, foram realizados experimentos de ELISA. No ensaio, placas de 96 poços (*Immulon II, Thermo Fisher*) foram revestidas com 5 µg/mL de solução de 1613F12 em 1x PBS, durante a noite a 4°C. Após uma etapa de saturação, uma faixa de concentrações de proteína rhAxl-Fc (Sistemas R e D, ref.: 154-AL) (de 5 µg/mL a 0,02 µg/mL) é incubada durante 1 hora a 37°C nas placas revestidas. Para a etapa de revelação, um anticorpo biotilado Axl (produto próprio) foi adicionado a 0,85 µg/mL durante 1 hora a 37°C. Esse anticorpo Axl pertence a um grupo epitópico distinto. Em seguida, uma solução de avidina-peroxidase de rábano a 1/2.000° em tampão de diluição é adicionada aos poços. Em seguida, a solução de substrato TMB é adicionada durante 5 min. Após adição da solução de parada de peroxidase, a absorbância a 405 nm foi medida com uma leitora de microplacas.

[00286] A Figura 12 mostra que anticorpos 1613F12 tanto murinos quanto humanizados liga-se de modo similar à proteína rhAxl-Fc.

[00287] Para análise SCAF, células SN12C foram cultivadas em RPMI 1640 + L-glutamina 2 mM + soro a 10%. As células foram descoladas utilizando tripsina e a concentração celular foi ajustada em 1×10^6 células/mL em tampão de SCAF. Um volume de 100 µL de suspensão de células foi incubado com concentrações crescentes de controles de isotipo ou anticorpos anti-Axl durante 20 min. a 4°C. As células foram então lavadas três vezes com tampão de SCAF e

incubadas durante 20 min. adicionais usando um anticorpo secundário antirrato IgG Alexa488 ou anticorpo secundário anti-humano IgG Alexa488 a 4°C no escuro. As células foram lavadas três vezes com tampão de SCAF e ressuspensas com 100 µL de tampão de SCAF antes da adição de iodeto de propídio.

[00288] As células foram incubadas com concentrações crescentes de qualquer controle de isotipo ou anticorpos anti-Axl. m1613F12 corresponde a 1613F12 murino, c1613F12 corresponde a 1613F12 quimérico e hz1613F12 corresponde ao anticorpo humanizado. CE_{50s} foram determinadas usando o *software Prism*.

[00289] Tal como ilustrado na Figura 13, a forma humanizada de 1613F12 ligou-se a células SN12C com CE₅₀ equivalente à forma quimérica e à forma murina de 1613F12. Esses resultados indicam que hz1613F12 reconheceu o antígeno Axl com propriedades de ligação similares às de 1613F12 murino.

[00290] Procedimentos experimentais do ensaio direto de citotoxicidade *in vitro* foram anteriormente descritos no Exemplo 12. No presente exemplo, quatro imunocjugados de saporina foram preparados, m9G4-saporina, ch9G4-saporina, 1613F12-saporina e hzl613F12-saporina, e testados em dois modelos celulares (células de tumor renal humano SN12C e células de carcinoma de pulmão humano Calu-1).

[00291] A Figura 14 mostra que tanto m9G4-saporina quanto controles de isotipo ch9G4-saporina eram silenciosos e que o anticorpo humanizado Axl 1613F12-saporina desencadeia efeitos citotóxicos similares sobre células SN12C na contrária do imunocjugado de rato 1613F12-saporina.

[00292] A Figura 15 mostra que o imunocjugado humanizado 1613F12-saporina desencadeia efeitos citotóxicos semelhantes sobre células Calu-1 ao contrário do imunocjugado de rato 1613F12-

saporina. Em contraste, tanto m9G4-saporina quanto controles de isotipo ch9G4-saporina mostraram atividade fraca (~10% de citotoxicidade máxima) para concentrações de anticorpos acima de 10^{-9} M.

Exemplo 14: Cinética de ligação de 1613F12 a DEC Axl humano

[00293] Medição de afinidade de 1613F12 foi então determinada utilizando *Biacore*. Um *Biacore X* é usado para medir a cinética de ligação de 1613F12 sobre DEC Axl humano.

[00294] O instrumento baseado no fenômeno óptico de ressonância de plasmons de superfície (RPS) utilizado pelos sistemas *Biacore* permite a detecção e medição de interações proteína-proteína em tempo real, sem a utilização de marcadores.

[00295] Resumidamente, os experimentos foram realizados usando um *chip* sensor CM5 como biossensor. IgGs de coelho foram imobilizados em células de fluxo 1 e 2 (FC1 e FC2) de um *chip* sensor CM5 em um nível de 9.300-10.000 unidades de resposta (RU) usando química de acoplamento de amina para capturar anticorpos.

[00296] A ligação é avaliada utilizando múltiplos ciclos. Cada ciclo de medida é realizado usando uma vazão de 30 μ L/min em um tampão HBS-EP. Em seguida, o anticorpo Axl para teste é capturado no *chip* por 1 min em FC2 só para atingir um valor médio de captura de 311,8 RU (DP = 5,1 RU) para 1613F12. O anárito (antígeno DEC Axl) é injetado partindo de 200 nM e utilizando diluições em série duas vezes para medir k_a e k_d brutos em tempo real.

[00297] No final de cada ciclo, as superfícies são regeneradas por injeção de uma solução de cloridrato de glicina 10 mM, pH 1,5, para eliminar os complexos anticorpo-antígeno e o anticorpo de captura também. O sinal considerado corresponde à diferença dos sinais observados entre FC1 e FC2 (FC2-FC1). As taxas de associação (k_a) e as taxas de dissociação (k_d) foram calculadas utilizando um modelo de

ligação de um a um de Langmuir. A constante de dissociação de equilíbrio (KD) é determinada como a razão k_a/k_d . Os valores experimentais foram analisados no *software Biaevaluation* versão 3.0. Uma análise χ^2 será realizada para avaliar a precisão dos dados.

[00298] Os dados encontram-se resumidos na seguinte Tabela 8.

Tabela 8

Anticorpo	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Chi ²
1613f12	1,06 10 ⁵	2,42 10 ⁻⁴	2,29 10 ⁻⁹	0,71 (0,6%)

[00299] Para produzir o domínio extracelular humano (DEC) de Axl, os cDNAs humanos que codificam o receptor humano solúvel AXL foi primeiro clonado no vetor de expressão pCEP4 por PCR. O produto purificado foi então digerido com enzimas de restrição HindIII e BamHI e ligado ao vetor de expressão pCEP4 que tinha sido pré-cortado com as mesmas enzimas. Finalmente, o plasmídeo recombinante identificado pCEP[AXL]His6 foi ainda confirmada por sequenciamento de DNA.

[00300] Em seguida, células HEK293E adaptadas em suspensão foram cultivadas em meio *Ex-cell 293 (SAFC Biosciences)* com glutamina 4 mM. Todas as transfecções foram realizadas utilizando polietilenoimina linear de 25 kDa (PEI). As células transfectadas foram mantidas a 37°C em um agitador incubadora com 5% de CO₂ e com agitação a 120 rpm durante seis dias. As células foram coletadas por centrifugação, e o sobrenadante contendo a proteína recombinante marcada com His foi tratada para purificação em uma coluna de Ni-NTA agarose.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo humanizado, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que:

i) se liga especificamente à uma proteína humana Axl, e
ii) é internalizado após sua ligação à dita proteína humana Axl,

em que o dito anticorpo ou fragmento compreende as três cadeias leves das regiões determinantes de complementaridade CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 das sequências SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente; e as três cadeias pesadas das regiões determinantes de complementaridade CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 das sequências SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente,

em que as regiões constantes da cadeia leve e da cadeia pesada derivada do anticorpo humano são, respectivamente, a região lambda ou kappa da região gama-1, gama-2 ou gama-4, e

em que o dito fragmento é um fragmento Fab ou scFv.

2. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que induz uma redução da intensidade média de fluorescência (IMF) medida por separação celular ativada por fluorescência (FACS) de pelo menos 200.

3. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

4. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento compreende um domínio variável de cadeia leve selecionado do grupo que consiste em:

i) um domínio variável de cadeia leve de sequência SEQ ID NO: 7,

ii) um domínio variável de cadeia leve de sequência SEQ ID NO: 36; e

iii) um domínio variável de cadeia leve de sequência SEQ ID NOs: 37 a 47.

5. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento compreende um domínio variável de cadeia pesada selecionado do grupo que consiste em:

i) um domínio variável de cadeia pesada de sequência SEQ ID NO: 8;

ii) um domínio variável de cadeia pesada de sequência SEQ ID NO: 48; e

iii) um domínio variável de cadeia pesada de sequência SEQ ID NO: 49 a 68.

6. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento compreende:

i) um domínio variável de cadeia leve de sequência SEQ ID NOs: 7, 36 ou 37 a 47; e

ii) um domínio variável de cadeia pesada de sequência SEQ ID NOs: 8, 48 ou 49 a 68.

7. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que consiste no anticorpo monoclonal 1613F12 produzido pelo hibridoma 1-4505 depositado no CNCM, Instituto Pasteur, França, em 28 de julho de 2011.

8. Hibridoma murino, caracterizado pelo fato de que é o hibridoma 1-4505 depositado no CNCM, Instituto Pasteur, França, no dia 28 de julho de 2011.

9. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que

a proteína humana Axl, como definida na reivindicação 1, apresenta a sequência de SEQ ID NOs: 29 ou 30, ou de uma sequência variante natural da mesma.

10. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente a um epítipo localizado no domínio extracelular da proteína Axl humana apresentando a sequência de SEQ ID NOs: 31 ou 32, ou uma sequência natural variante da mesma.

11. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia leve de sequência SEQ ID NO: 47 e um domínio variável de cadeia pesada de sequência SEQ ID NO: 68.

12. Imunoconjugado, caracterizado pelo fato de que compreende o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e 11, conjugado a um agente citotóxico.

13. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o imunoconjugado, como definido na reivindicação 12, e pelo menos um excipiente e/ou um veículo farmacêuticamente aceitável.

Ensaio de citotoxicidade de SN12C – 1613F12

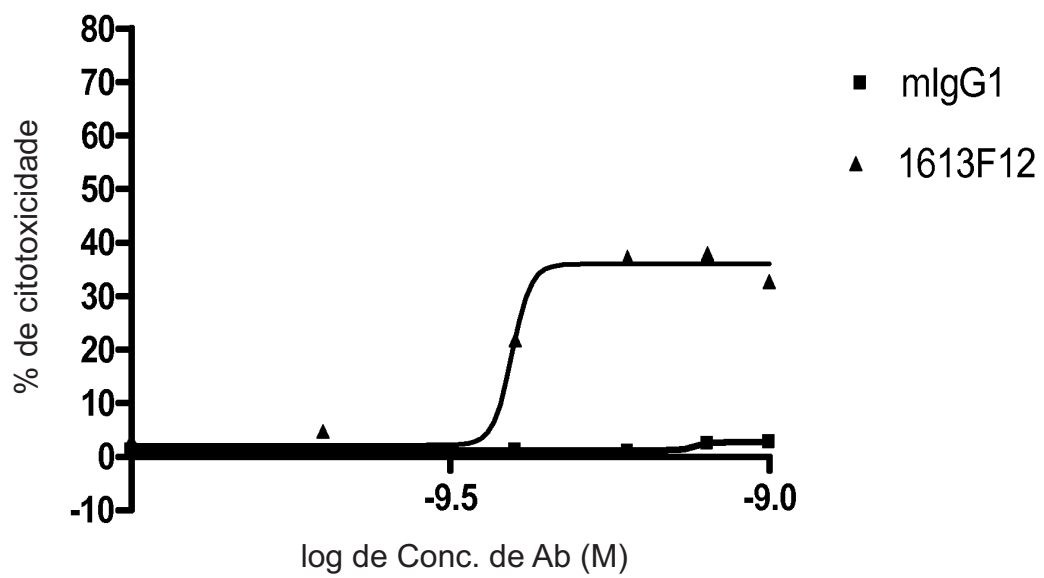


FIG. 1

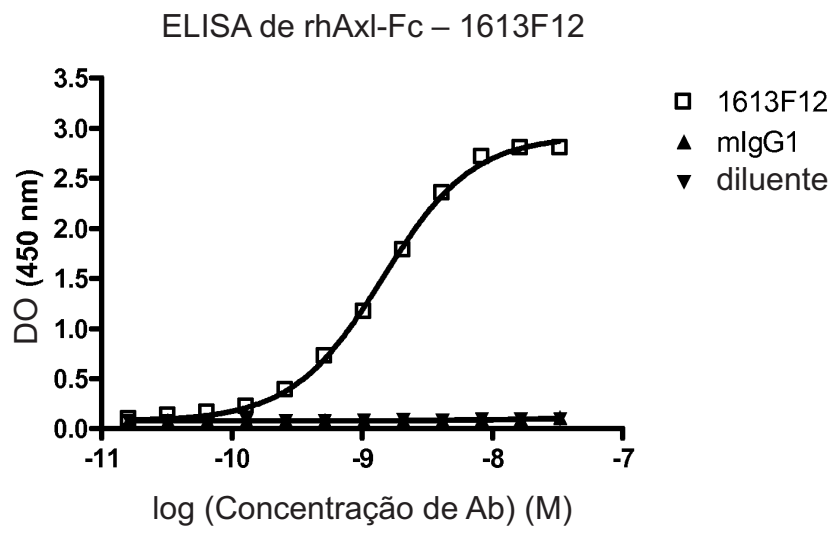


FIG. 2A

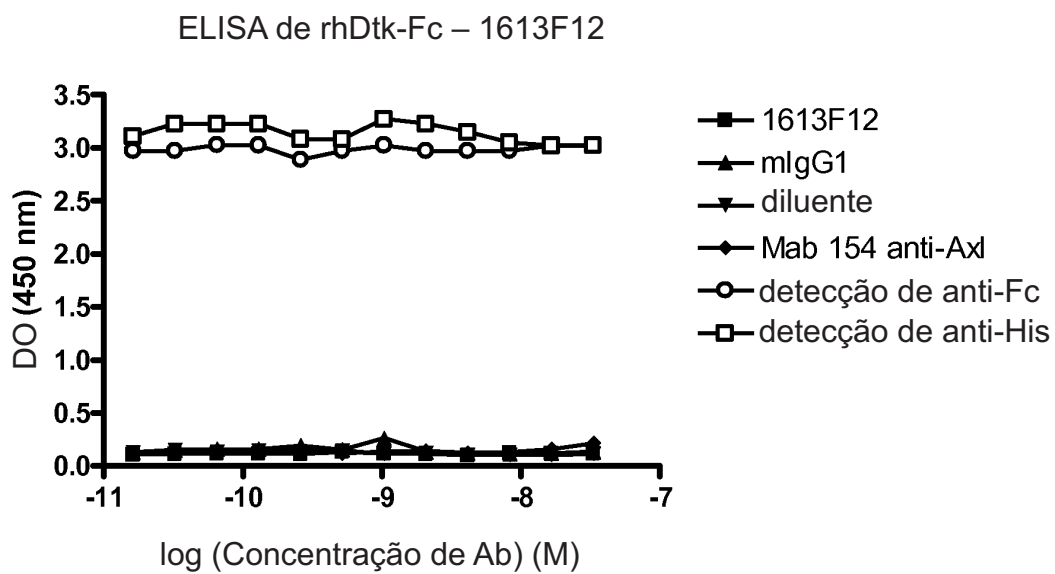


FIG. 2B

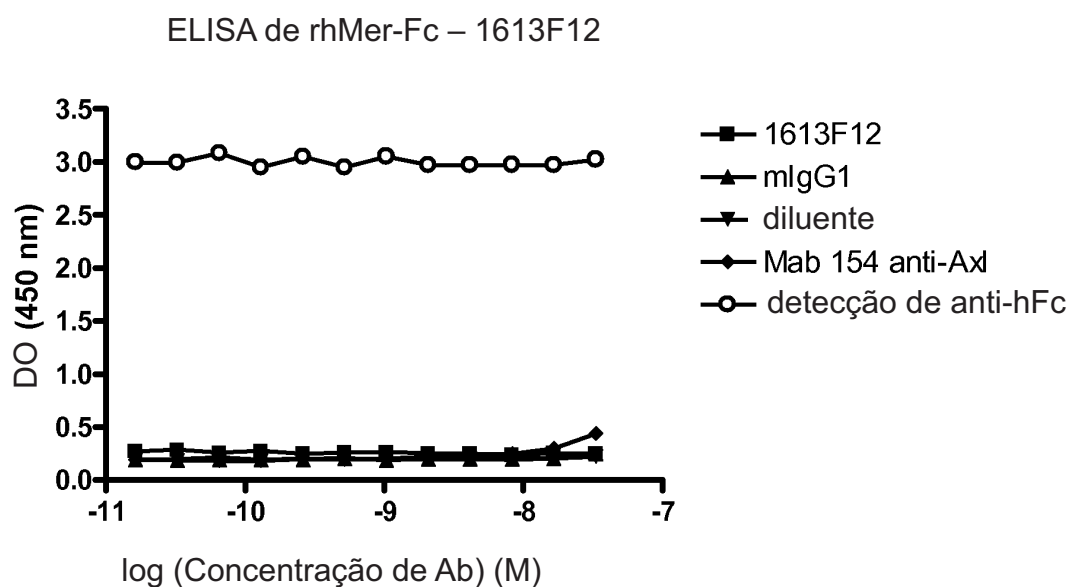


FIG. 2C

SCAF de linhagens de células de tumor humano – 1613F12

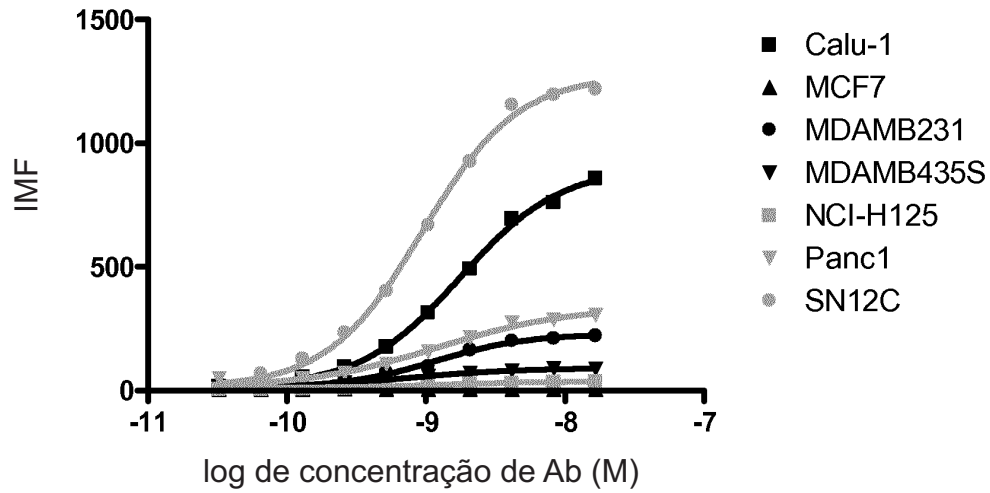


FIG. 3

ELISA de rmAxl-Fc – 1613F12

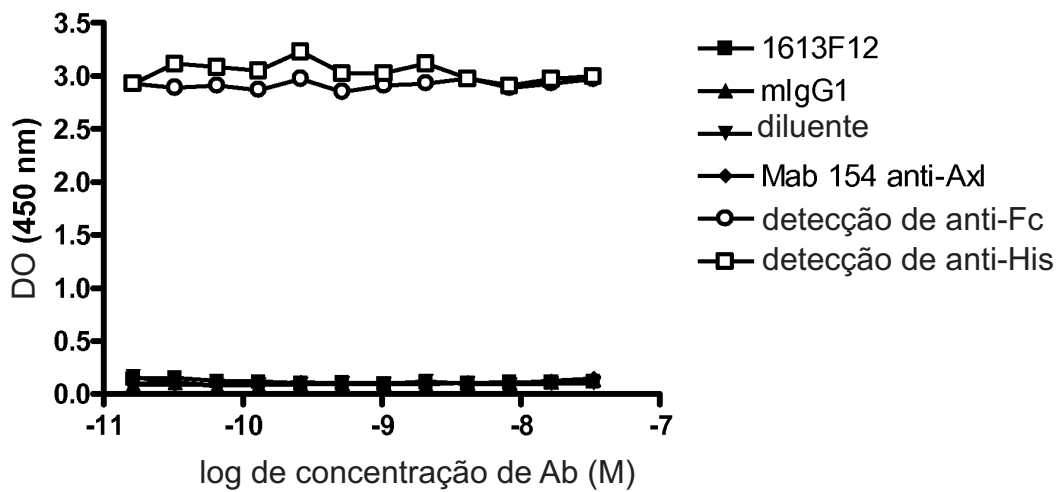


FIG. 4

SCAF DE COS7 – 1613F12

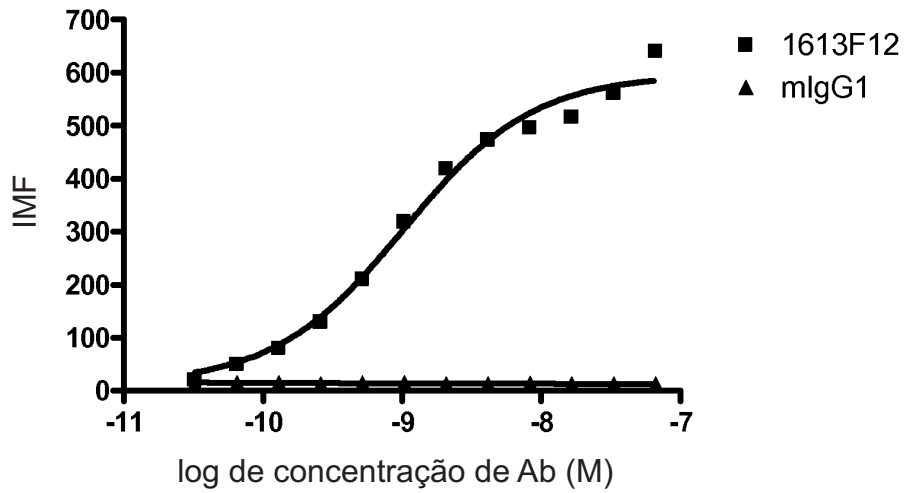


FIG. 5

ELISA de competição de ligação de Gas6 – 1613F12

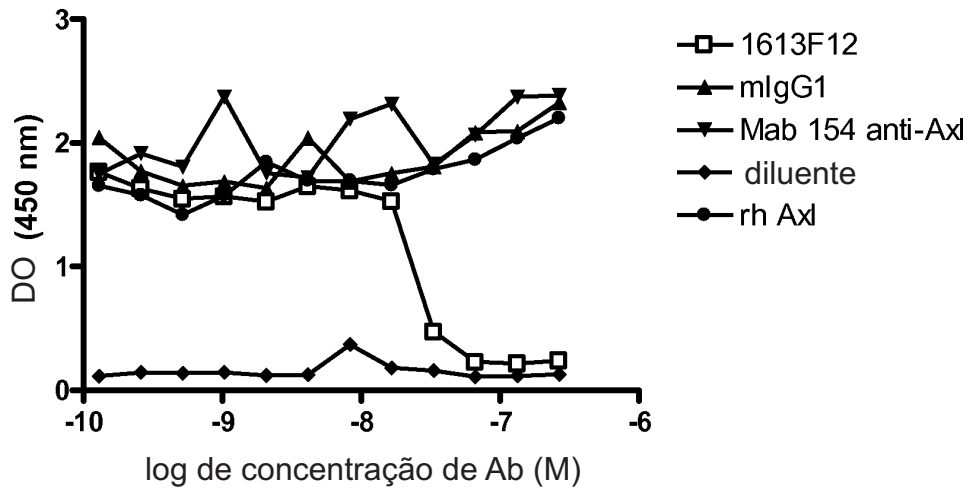


FIG. 6

1613F12

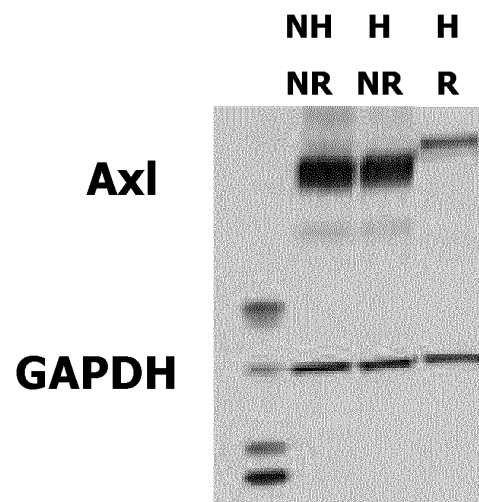


FIG. 7

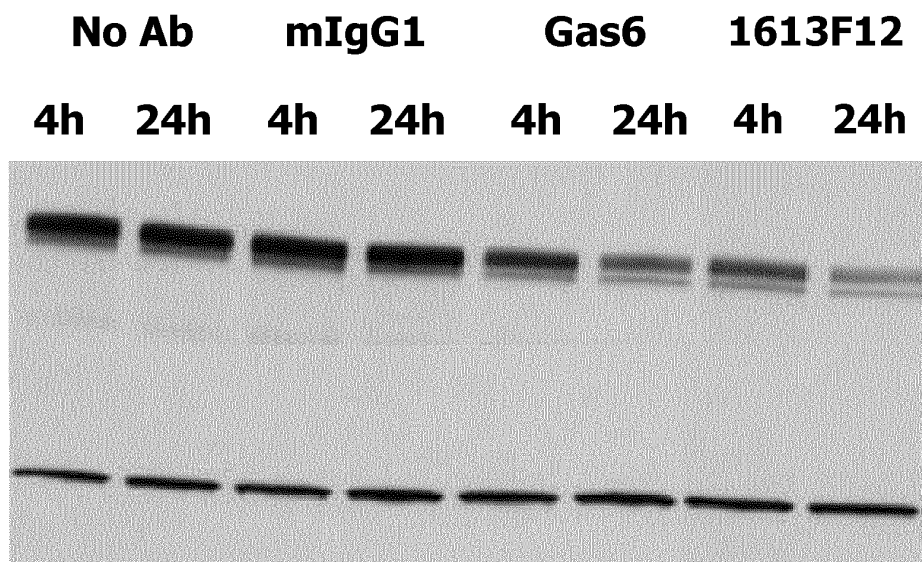


FIG. 8A

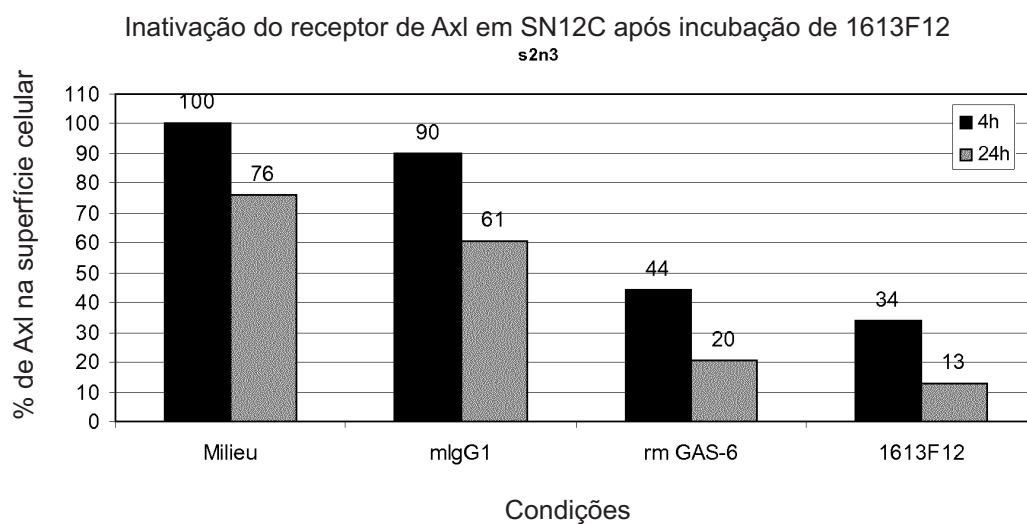


FIG. 8B

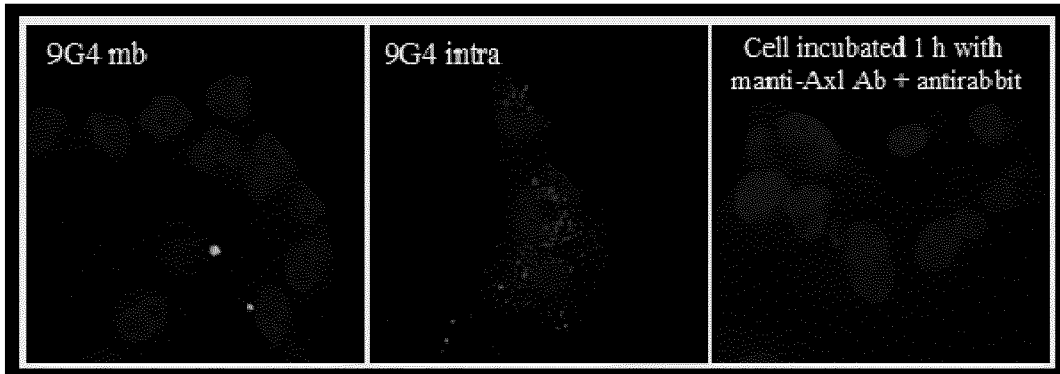


FIG. 9A

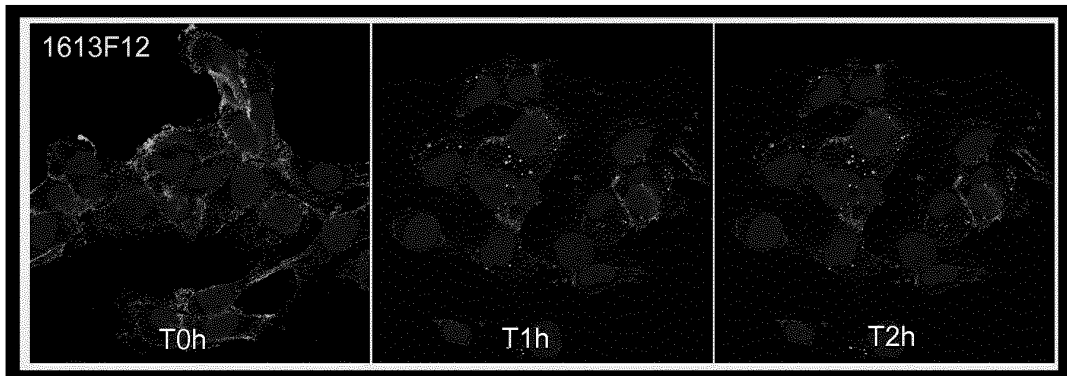


FIG. 9B

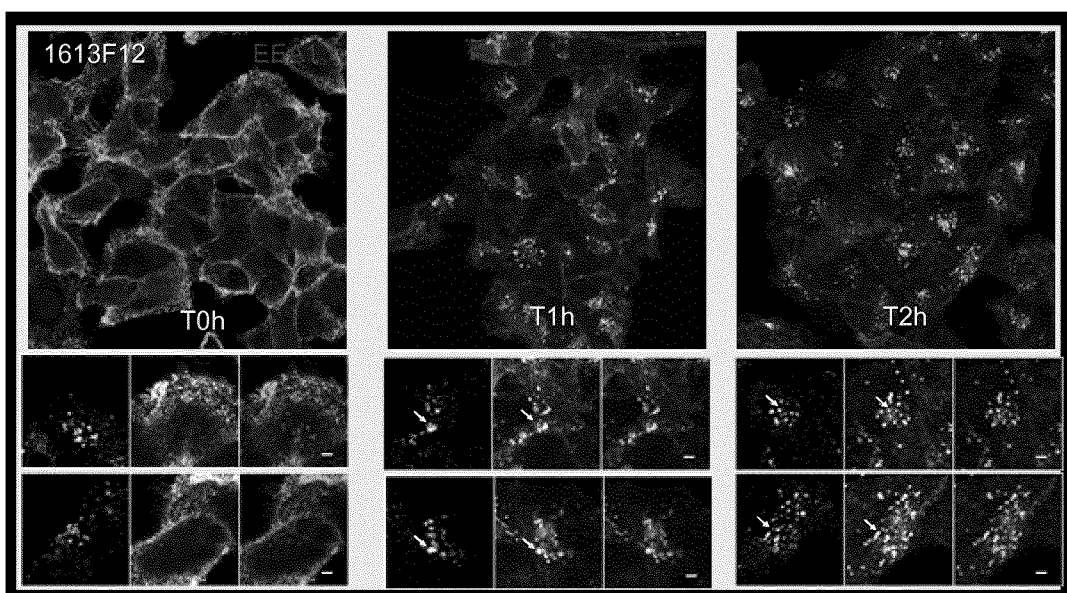


FIG. 9C

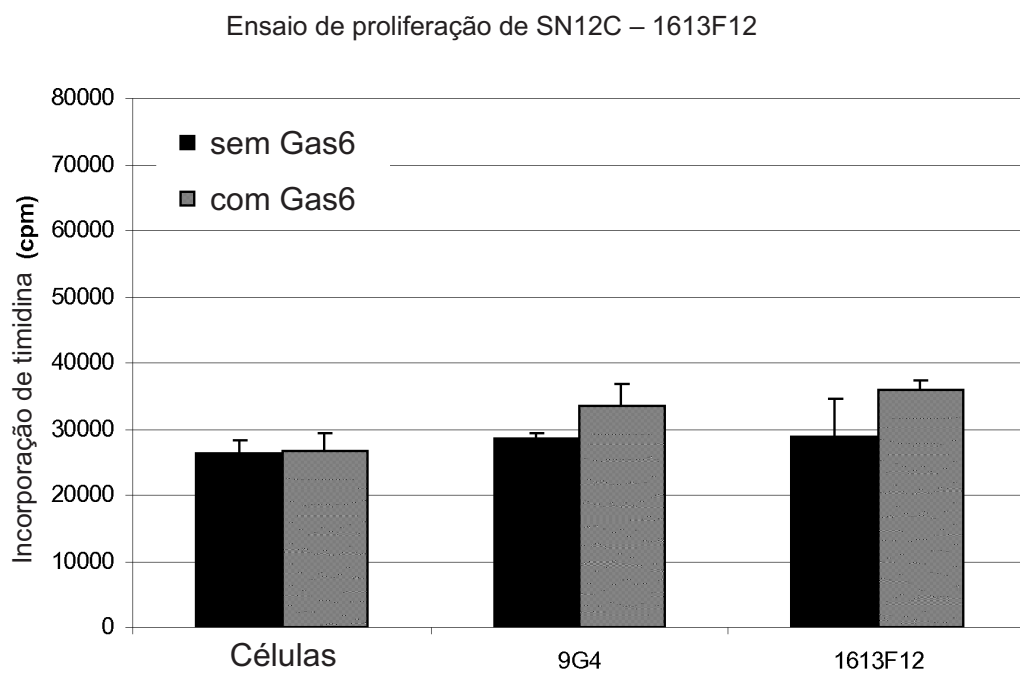


FIG. 10

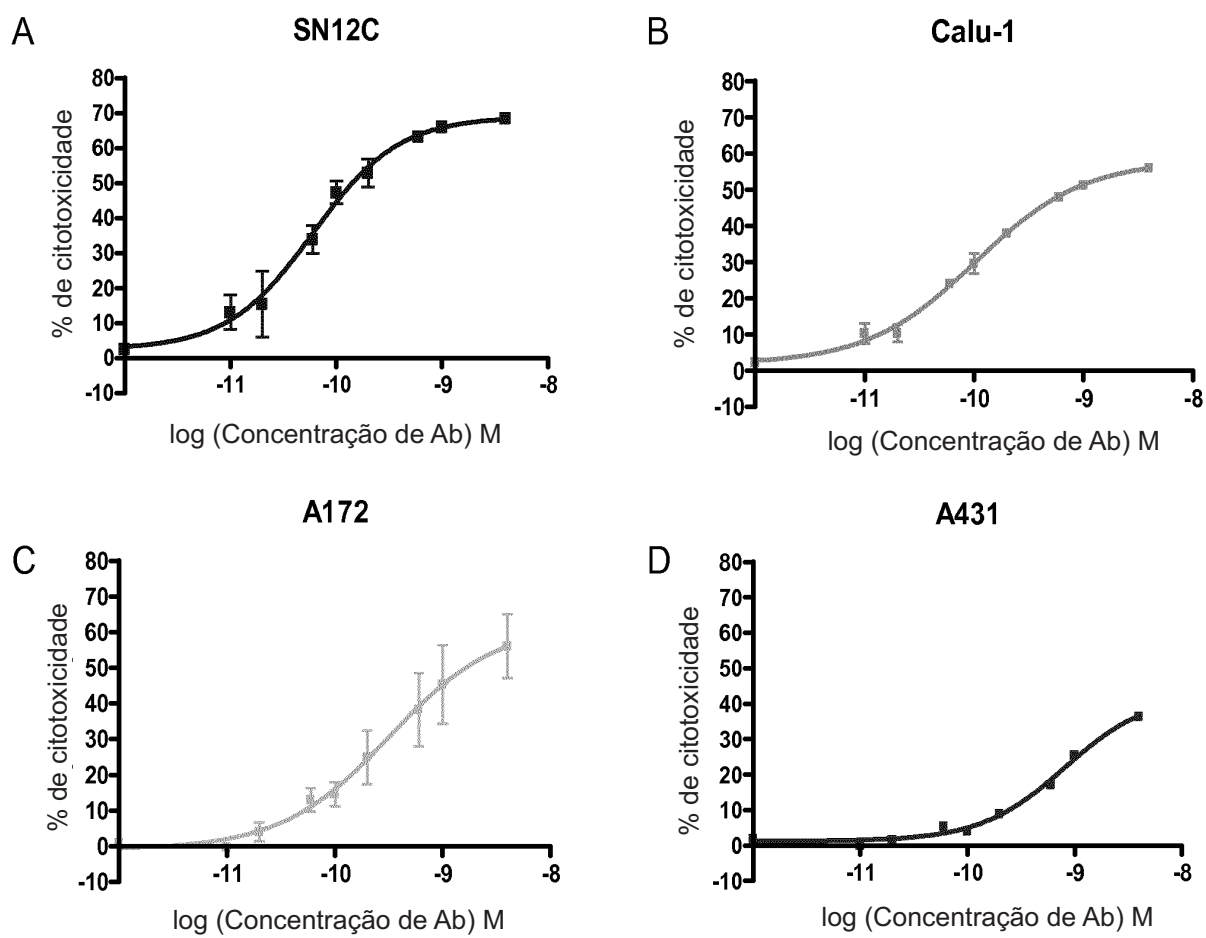


FIG. 11

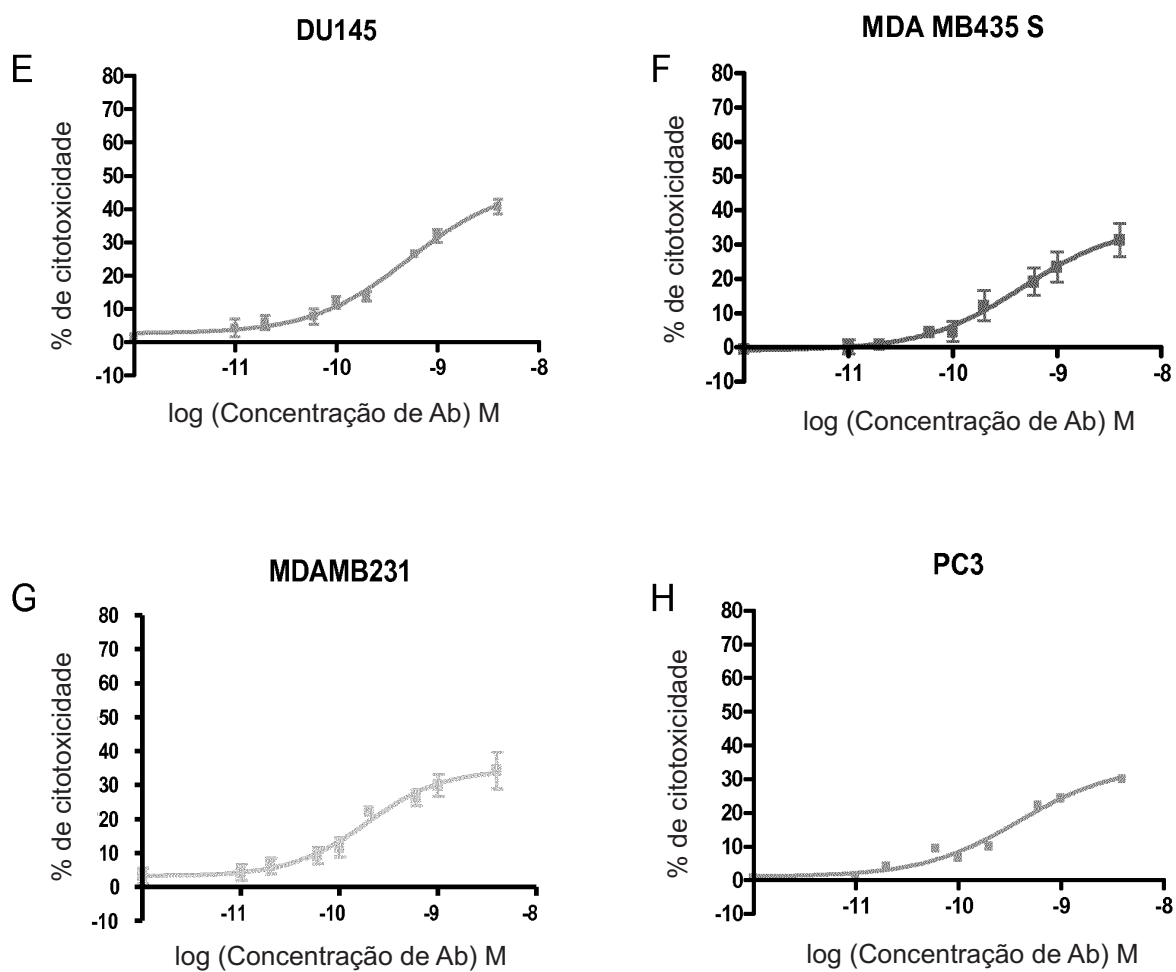


FIG. 11
(Continuação)

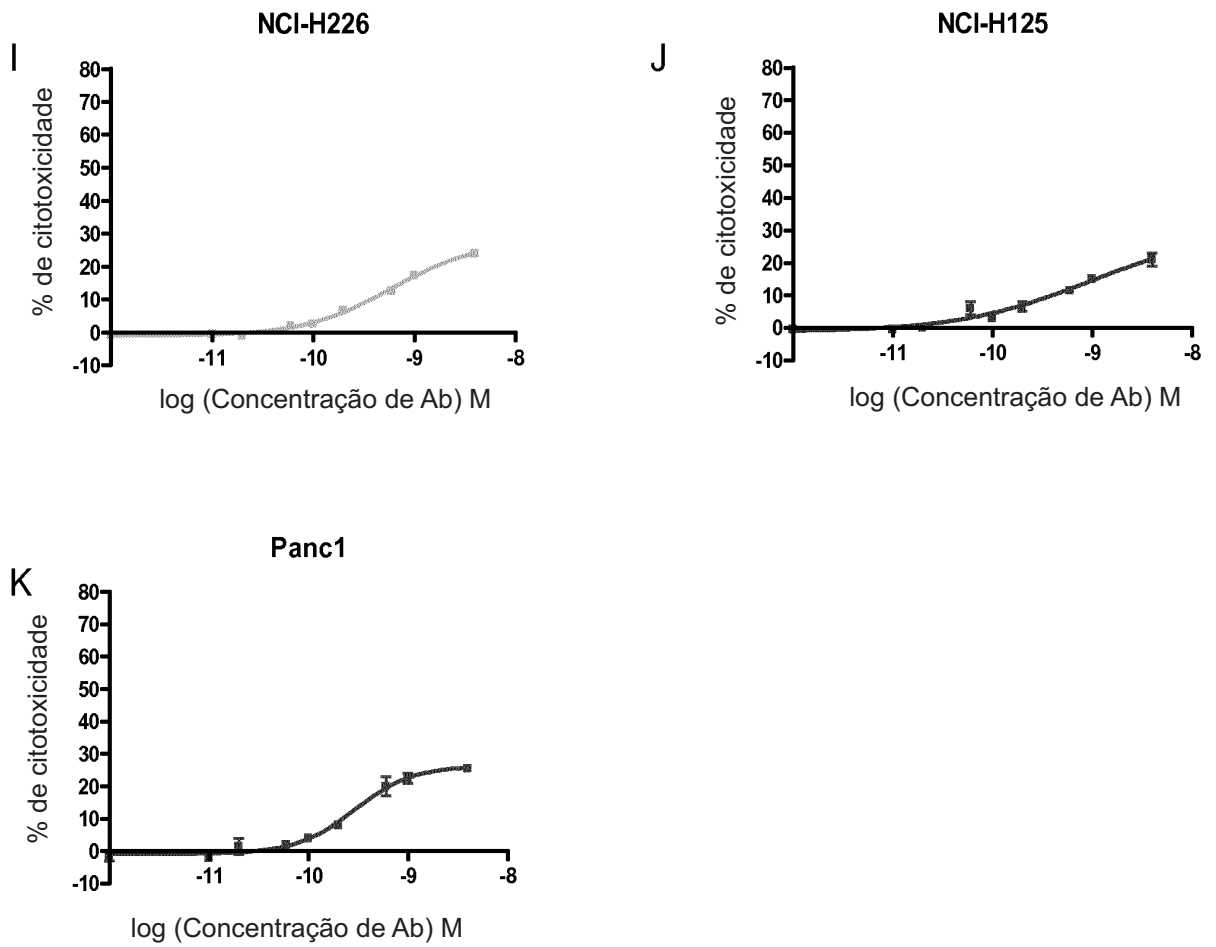


FIG. 11
(Continuação)

Validação por ELISA do anticorpo 1613F12 Axl humanizado

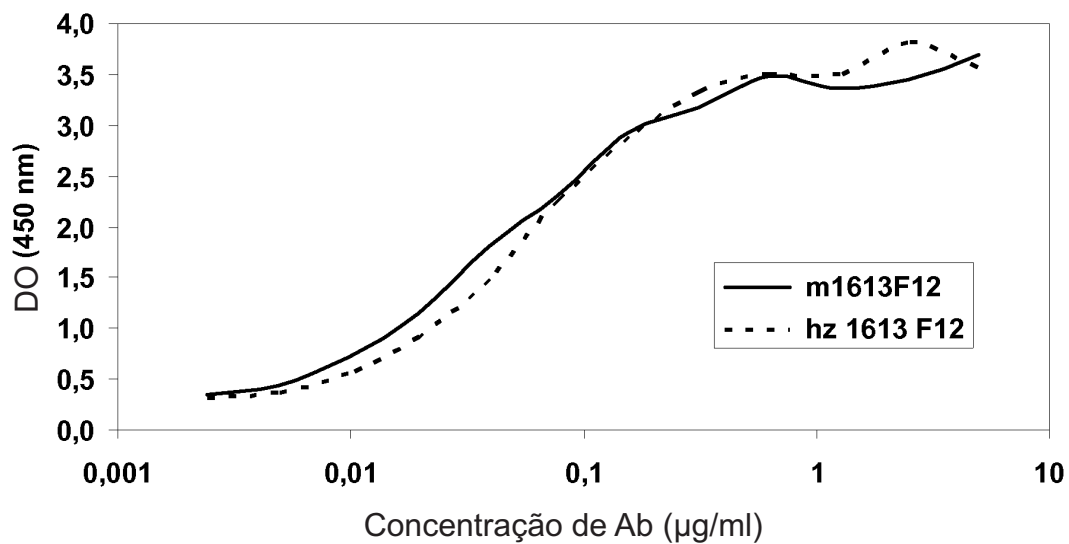
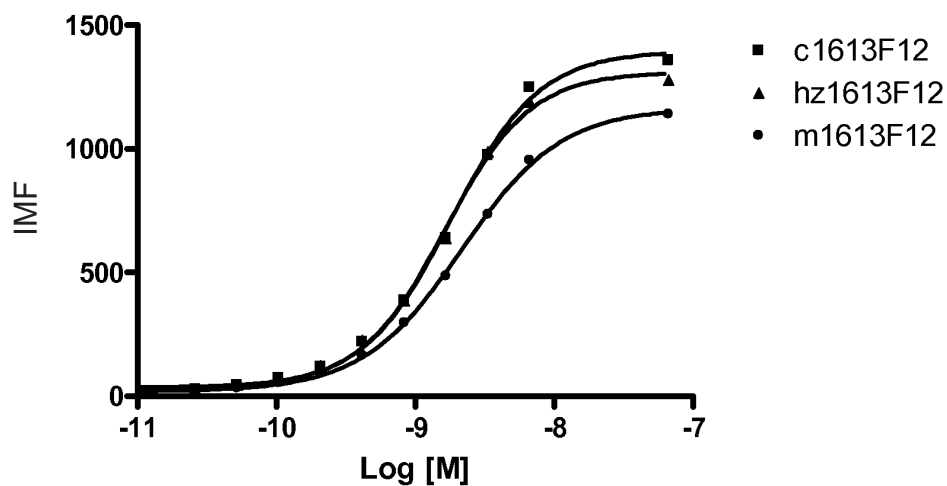


FIG. 12

Ligação a células SN12C por Citometria de Fluxo



	EC50
c1613F12	1.810e-009
hz1613F12	1.638e-009
m1613F12	2.162e-009

FIG. 13

Citotoxicidade *in vitro* de m1613F12-sap,
hz1613F12-sap, m9G4-sap e ch9G4-sap
in SN12C

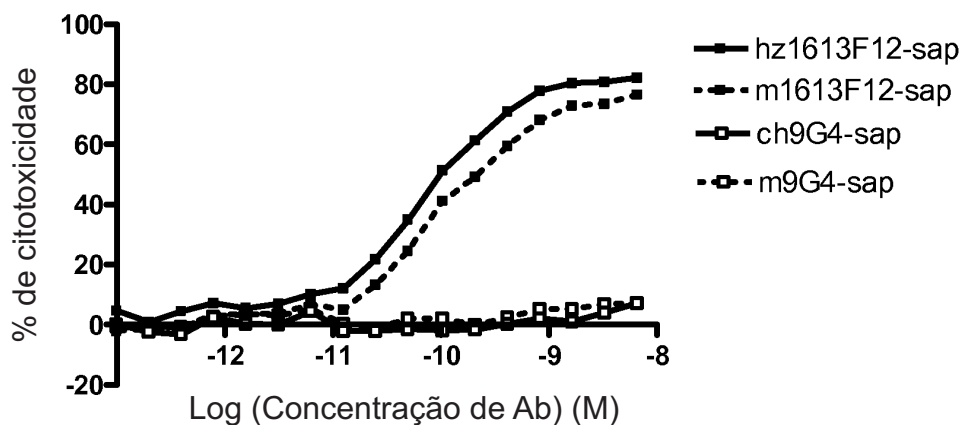


FIG. 14

Citotoxicidade *in vitro* de m1613F12-sap, hz1613F12-sap,
m9G4-sap e c9G4-sap
em células Calu-1

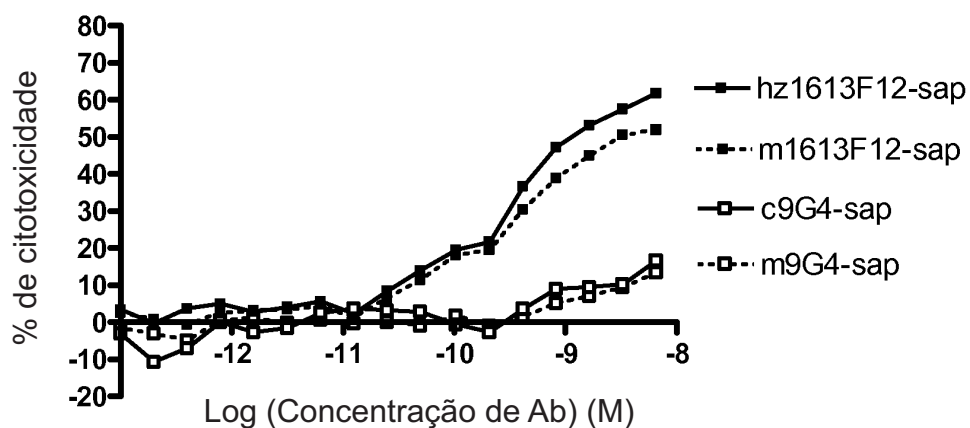


FIG. 15