

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2002.02.07	(73) Titular(es): WILEX AG GRILLPARZERSTRASSE 10 81675 MÜNCHEN DE
(30) Prioridade(s): 2001.02.07 US 266853 P 2001.10.05 US 327008 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.12.20	(72) Inventor(es): EGBERT OOSTERWIJK NL SVEN WARNAAR NL STEFAN ULLRICH DE
(45) Data e BPI da concessão: 2015.02.25 112/2015	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES CONTRA TUMORES**

(57) Resumo:

O INVENTO REFERE-SE À UTILIZAÇÃO DE UM ANTICORPO G250 PARA O FABRICO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS APÓS CIRURGIA, E À UTILIZAÇÃO DE UM ANTICORPO G250 PARA O FABRICO DE UM AGENTE PARA PROVOCAR UMA RESPOSTA IMUNITÁRIA RETARDADA NUM PACIENTE DE CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS.

RESUMO

**"Método de produção de anticorpos recombinantes
contra tumores"**

O invento refere-se à utilização de um anticorpo G250 para o fabrico de uma formulação farmacêutica para o tratamento de pacientes com carcinoma de células renais após cirurgia, e à utilização de um anticorpo G250 para o fabrico de um agente para provocar uma resposta imunitária retardada num paciente de carcinoma de células renais.

DESCRIÇÃO

**"Método de produção de anticorpos recombinantes
contra tumores"**

O presente invento refere-se à célula de hibridoma G250 ou a qualquer célula sua descendente capaz de produzir o anticorpo G250.

A fusão de células de mieloma de ratinho com as células do baço de ratinhos imunizados, descrita pela primeira vez por Kohler e Milstein, *Nature* 256: 495-997, 1975, torna possível obter linhas celulares contínuas que produzem anticorpos homogêneos, referidos como anticorpos monoclonais (mAb).

Existem muitos exemplos onde são descritas células híbridas ou hibridomas. Estes hibridomas são utilizados para produzir anticorpos úteis para várias investigações científicas ("Current Topics in Microbiology and Immunology", volume 81, "Lymphocyte Hybridomas", F. Melchers et al., Springer-Verlag, 1978, e referências aí; C.J. Barnstable et al., *Cell* 14: 9-20; 1978; P. Parham, W.F. Bodmer, *Nature* 276: 397-399, 1978; "Handbook of Experimental Immunology", 3ª edição, Vol. 2, D.M. Wier, editor, Blackwell, 1978, Capítulo 25, *Chem. Eng. News* 15-17, 1979; Kennett, R.H., McKearn, J.T., e Bechtol, K.B., 1980, "Monoclonal Antibodies, Hibridomas: A New Dimension in Biological Analysis (Plenum, New York)). Estes relatórios descrevem as principais técnicas para a produção de anticorpos monoclonais através de hibridomas.

O anticorpo monoclonal G250, subclasse IgG1, reconhece um antígeno expresso preferencialmente nas membranas de células de carcinoma das células renais (RCC) e não expresso em epitélio tubular proximal normal. O anticorpo G250 foi obtido através da imunização de um ratinho com homogenatos celulares de lesões primárias de RCC de diferentes pacientes (Oosterwijk et al., *Int. J. Cancer* 38: 489-494, 1986).

O anticorpo monoclonal G250, assim como derivados quiméricos deste, foram utilizados em estudos clínicos

(Steffens *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 15: 1529-1537, 1997; Steffens *et al.*, *Clinical Cancer Research* 5: 32681-32741, 1999). A sequência de ácido nucleico que codifica para o local de ligação ao antigénio de G250 é o objeto do pedido US copendente Nº 60/266853, que é aqui incorporado por referência.

A produção de uma linha celular de hibridoma expressando o anticorpo G250 foi geralmente descrita no pedido de patente internacional WO 88/08854 e em Oosterwijk *et al.* (*supra*). Como indicado acima, um homogenato celular de lesões primárias de RCC obtidas de diferentes pacientes e por isso um material inespecífico foi utilizado como imunogénio. Para além disso, a linha celular de hibridoma não tinha sido depositada numa instituição depositária reconhecida de acordo com o Tratado de Budapeste. Assim, não parece ser possível uma reprodução exata da linha celular de hibridoma G250 a partir dos documentos publicamente disponíveis do estado da técnica.

No entanto, verificou-se que o anticorpo G250 se liga ao designado antigénio MN que é descrito p. ex. em WO 93/18152. No entanto, o local de ligação a G250 no antigénio MN é atualmente desconhecido. Além disso, resultados recentes mostram que o local de ligação a G250 é um epitopo conformacional o que aumenta mais o esforço para reproduzir a linha celular de hibridoma G250, uma vez que não pode ser proporcionada nenhuma sequência do epitopo especificado no antigénio MN que se ligue a G250.

Assim, O presente invento refere-se a uma célula de hibridoma capaz de produzir um anticorpo monoclonal G250. Esta célula de hibridoma foi depositada segundo as disposições do Tratado de Budapeste para o Depósito de Microrganismos a 11 de setembro de 2001 em Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemanha sob o Número de Acesso DSM ACC 2526. O depósito é a primeira divulgação publicamente disponível de uma linha celular de hibridoma produtora do anticorpo G250.

Outro aspecto do presente invento é uma célula descendente derivada do referido hibridoma DSM ACC 2526 que produz um anticorpo G250.

Numa concretização preferida, o presente invento refere-se a uma célula descendente da célula de hibridoma depositada produtora de um anticorpo G250 em que a célula descendente é obtida através de métodos de ADN recombinante, p. ex. transferindo material genético codificando o anticorpo G250 ou pelo menos o seu local de ligação ao antigénio, para uma célula recetora. O material genético pode ser obtido diretamente ou indiretamente a partir da célula de hibridoma G250 depositada. "Obtido diretamente" significa que o material genético de G250 é derivado da célula de hibridoma depositada. "Obtido indiretamente" significa que o material genético de G250 é derivado de uma célula descendente de G250 já existente ou de outras fontes incluindo síntese química.

De preferência o material genético de G250 compreende sequências nucleotídicas codificando pelo menos o local de ligação ao antigénio de G250, particularmente sequências nucleotídicas codificando as regiões determinantes de complementaridade CDR3, CDR2 e/ou CDR1 do local de ligação ao antigénio da cadeia pesada tal como mostradas na Figura 1 (designadas H1-H3) e/ou as regiões determinantes de complementaridade CDR3, CDR2 e/ou CDR1 do local de ligação ao antigénio da cadeia leve (designadas L1-L3) tal como mostradas na Figura 1.

De acordo com o presente invento o termo "anticorpo G250" cobre qualquer anticorpo incluindo anticorpos multiespecíficos (p. ex. anticorpos biespecíficos) e fragmentos de anticorpo desde que exibam a atividade desejada, i.e. pelo menos um local de ligação ao antigénio de G250. O anticorpo pode ser um IgM, IgG (p. ex. IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄), IgD, IgA ou um IgE, particularmente um anticorpo IgG, um anticorpo recombinante ou um fragmento de anticorpo obtido através de métodos proteolíticos ou através de métodos de ADN recombinante.

O termo "anticorpo monoclonal" tal como aqui utilizado refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de

anticorpos substancialmente homogêneos, i.e., os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em menores quantidades.

O termo "anticorpo" tal como aqui utilizado refere-se a qualquer polipéptido contendo pelo menos um local de ligação ao antigénio de G250, i.e. pelo menos a região CDR3 da cadeia pesada de G250 e/ou a região CDR3 da cadeia leve de G250 ou uma região CDR3 de G250 variante possuindo uma identidade de pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90% com a região CDR3 de G250 original ao nível dos aminoácidos, desde que a região CDR3 variante tenha características de ligação ao antigénio equivalentes, particularmente a afinidade e especificidade em comparação com a região CDR3 original.

De preferência, o termo "anticorpo" aqui inclui anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e inteiramente humanizados, anticorpos de cadeia simples, p. ex. fragmentos de anticorpo sFv, fragmentos de diacorpo, fragmentos de anticorpo proteolíticos ou recombinantes tais como fragmentos Fv, Fab, Fab' ou F(ab')₂ ou outras subsequências de ligação ao antigénio dos anticorpos. O anticorpo pode também ser uma fusão ou um conjugado com outras entidades.

Os anticorpos aqui incluem especificamente anticorpos quiméricos nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve incluindo o local de ligação ao antigénio é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes derivadas da linha celular de hibridoma G250 original, enquanto o restante das cadeias é idêntico ou homólogo às sequências correspondentes derivadas de outras espécies ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpo bem como fragmentos de tais anticorpos desde que exibam a atividade biológica desejada. De maior preferência, o anticorpo quimérico compreende regiões variáveis, p. ex. as regiões determinantes de complementaridade (CDR) e as regiões estruturais da cadeia pesada e da cadeia leve do anticorpo monoclonal G250 original e sequências humanas constantes, particularmente as sequências da cadeia leve e da cadeia pesada humana. A produção de anticorpos quiméricos está descrita p.

ex. por Morrison *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855, 1984), que é aqui incorporado por referência.

Mais, o anticorpo aqui inclui especificamente anticorpos humanizados ou anticorpos inteiramente humanos. Os anticorpos humanizados são imunoglobulinas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos, que contêm uma sequência mínima derivada de uma imunoglobulina não humana. Mais particularmente, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas em que os resíduos de uma CDR de um dado anticorpo humano são substituídos por resíduos da CDR de G250, particularmente a região CDR1, 2 e/ou 3 da cadeia pesada e/ou leve. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não se encontrem nem no anticorpo humano recetor, nem nas sequências importadas da CDR de G250. Estas modificações são feitas para refinar e otimizar mais o desempenho do anticorpo. No geral, o anticorpo humanizado ou inteiramente humano compreenderá substancialmente tudo de pelo menos 1, e tipicamente 2, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às da imunoglobulina G250 original e todas ou substancialmente todas as regiões estruturais e regiões constantes são as de uma sequência de imunoglobulina humana. A produção de anticorpos humanizados está descrita, p. ex. em Jones *et al.* (*Nature* 321: 522-525, 1986), Riechmann *et al.* (*Nature* 332: 323-329, 1988) e Presta (*Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 332-339, 1992), que são aqui incorporados por referência.

Mais, os anticorpos incluem especificamente anticorpos de cadeia simples tais como fragmentos de anticorpo Fv de cadeia simples compreendendo os domínios VH e VL de um anticorpo, em que estes domínios estão presentes numa única cadeia polipeptídica. Geralmente, o polipéptido Fv compreende ainda um polipéptido ligador entre os domínios VH e VL que permite que o sFv forme a estrutura desejada para ligação ao antigénio. A produção de anticorpos sFv é descrita p. ex. por Plückthun em: "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", Vol. 113, Rosenberg e Moore, Eds., Springer Verlag, NY, págs. 269-315 (1994), Barbas III (*Methods: Companion Methods Enzymol.* 2: 119, 1991) e Hoogenboom *et al.* (*Immunol. Rev.* 130: 41-68, 1992), que são aqui incorporados por referência.

Mais, os anticorpos incluem especificamente diacorpos, i.e. pequenos fragmentos de anticorpo com dois locais de ligação ao antigénio, fragmentos esses que compreendem um domínio variável da cadeia pesada ligado a um domínio variável da cadeia leve na mesma cadeia polipeptídica. Através da utilização de um ligador que seja demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criam dois locais de ligação ao antigénio. A produção de diacorpos é descrita p. ex. por Hollinger *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448, 1993), que é aqui incorporado por referência.

Mais, os anticorpos incluem especificamente anticorpos multiespecíficos, p. ex. anticorpos heterobiespecíficos compreendendo pelo menos um local de ligação ao antigénio de G250 e o local de ligação ao antigénio de um anticorpo diferente, por exemplo um anticorpo anti-CD3.

O anticorpo produzido pela célula de hibridoma G250 ou por uma célula sua descendente pode ser fundido ou conjugado com um marcador ou componente efector. Por exemplo, o anticorpo G250 pode ser modificado de forma recombinante de modo a que seja ligado a citocinas tais como a interleucina-2 (IL-2), o fator de necrose tumoral (TNF) e/ou o fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF).

Além disso, o anticorpo G250 pode ser conjugado, p. ex. através de conjugação covalente ou fundido com um grupo marcador adequado, p. ex. um grupo fluorescente, um grupo marcador radioativo, etc. ou um agente citotóxico incluindo isótopos radioativos tais como I, Y, Pr, Tm, In, tais como ^{123}I , ^{125}I , ^{135}I , $^{99\text{m}}\text{Tm}$ ou ^{111}In , agentes quimioterapêuticos e toxinas tais como toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos.

A célula recetora para a qual o material genético específico de G250 da célula de hibridoma G250 original ou de qualquer sua descendente ou de origem sintética é transferido pode ser qualquer célula hospedeira adequada capaz de expressar anticorpos. Por exemplo, a célula hospedeira pode ser uma célula procariótica, de preferência uma célula de *E.*

Coli, ou uma célula eucariótica. As células eucarióticas preferidas são p. ex. células de inseto, levedura e de mamífero. As células hospedeiras mais preferidas são as células de mamífero, p. ex. células de mieloma humano ou de ratinho ou células CHO.

Ainda, o presente invento compreende um método para produzir o anticorpo G250 ou seus derivados compreendendo: cultura de uma célula de hibridoma G250 ou de uma célula sua descendente sob condições adequadas, em que um anticorpo G250 é produzido, e obtenção do anticorpo e/ou do seu derivado, a partir da célula e/ou do meio de cultura da célula.

O anticorpo obtido de acordo com este método é particularmente útil para produção de formulações terapêuticas que compreendam o anticorpo como agente ativo, para além de transportadores, diluentes e/ou adjuvantes farmacologicamente aceitáveis.

Numa concretização especialmente preferida, o agente ativo é um anticorpo G250 quimérico que pode estar presente como tal ou como um conjugado com um grupo radioativo, p. ex. com ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tm}$ ou ^{111}In .

Mais, o presente invento refere-se à utilização da célula de hibridoma depositada e a células suas descendentes para produção de anticorpos G250 tal como descrito acima, p. ex. anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos inteiramente humanizados, anticorpos biespecíficos e fragmentos de anticorpo tais como fragmentos $\text{F}(\text{ab}')_2$, Fab' , Fab e Fv .

O anticorpo quimérico G250 foi utilizado com sucesso em estudos clínicos para o tratamento de pacientes de carcinoma de células renais após cirurgia. Apesar de o estudo não estar ainda terminado, os pacientes tratados apresentam já um aumento significativo na sobrevivência mediana (mais de 15 meses) em comparação com os pacientes não tratados (três meses) ou com os pacientes tratados com terapia padrão (10-12 meses).

Surpreendentemente, verificou-se que nalguns casos ocorreu regressão do tumor mais de seis meses após o início da terapia. Assim, o anticorpo quimérico G250 e outros anticorpos G250 são capazes de provocar uma resposta imunitária retardada na terapia do cancro, de preferência no tratamento de carcinoma de células renais e de maior preferência para o tratamento de metástases após cirurgia ao tumor.

Exemplo 1

Depósito da linha celular de hibridoma G250

A linha celular de hibridoma G250 foi produzida tal como descrito no Exemplo 1 de WO 88/08854. É dado aí um protocolo geral de imunização. Faltam outras informações, p. ex. uma caracterização molecular do anticorpo G250 e da célula de hibridoma G250.

A linha celular de hibridoma G250 foi depositada de acordo com as exigências do Tratado de Budapeste em DSMZ sob o Nº de acesso DSM ACC 2526 a 11 de setembro de 2001.

Exemplo 2

Mapeamento do epitopo reconhecido pelo anticorpo monoclonal G250

Da evidência experimental coletiva assume-se que o epitopo da proteína G250 reconhecido pelo anticorpo monoclonal G250 (MAbG250) é conformacional, muito provavelmente de natureza não linear. Esta suposição baseia-se nas seguintes observações:

- O MAbG250 não reage com o antigénio G250 em análise de "Western blot".
- A purificação do antigénio G250 através de cromatografia de afinidade de MAbG250 é altamente ineficiente, com as eficiências a diminuírem com o aumento do tempo necessário para realizar a purificação, sugerindo uma rápida degradação/desdobramento do epitopo de G250, apesar das condições ótimas para impedir proteólise.

- A adição de detergentes conduz em geral a menores níveis de deteção de G250 em ELISA.
- A truncagem do ADNc codificando para o antigénio G250, seguida de transfecção transiente em células negativas para G250, seguida de análise imunohistoquímica revelou:

Construção de ADNc	Reatividade de G250
nt 1-1500 (aa 1-459), proteína completa	+
nt 1-1218 (aa 1-406), G250 sem região transmembranar	+/-
nt 1-1074 (aa 1-358)	-
nt 1-843 (aa 1-281)	-
nt 1-672 (aa 1-224)	-
nt 1-450 (aa 1-150)	-

Verificou-se que se perdia a reatividade de G250, mesmo quando eram utilizadas grandes construções de ADNc.

Para delinear melhor o epitopo de G250, foi utilizado o sistema NovaTope (Novagen Inc.), um sistema que assegura a expressão de todas as construções ligadas neste vetor, i.e., são expressos todos os fragmentos possíveis, independentemente do enquadramento de leitura. Isto permite a identificação dos epitopos presentes na parte média de uma proteína.

O ADNc codificando para o antigénio MN (G250) foi digerido com ADNase I durante 2 horas, resultando em fragmentos de aproximadamente 50-200 nucleótidos codificando polipéptidos possuindo um comprimento de cerca de 15-70 aminoácidos. Após a adição de uma cauda dA, os fragmentos foram introduzidos no vetor pScreen T e a mistura de ligação foi adicionada a bactérias competentes *E. coli* DE3 para transformação. As bactérias foram plaqueadas em placas de seleção. Os clones bacterianos foram transferidos para filtros de nitrocelulose e pesquisados com anticorpo G250. No total foram identificadas 7 colónias com MAbG250. A reatividade de G250 era fraca. Após uma nova pesquisa, somente um clone bacteriano pareceu reagir com MAbG250, apesar de extraordinariamente muito fraco, e muito

provavelmente devido a coloração de fundo. A análise da sequência do clone não revelou nenhuma sequência de G250, mas mostrou a presença de um vetor truncado. Assim, a coloração da mancha na nitrocelulose era muito provavelmente o resultado de fundo não específico.

Noutra experiência, o ADNc codificando o antigénio MN (G250) foi digerido com ADNase I, mas agora fragmentos de 200-600 nucleótidos, codificando polipéptidos de aproximadamente 65-200 aminoácidos foram isolados e clonados no vetor de expressão e expressos em bactérias. Colónias bacterianas separadas foram pesquisadas quanto à reatividade de G250.

A reatividade com G250 não foi aparente. As membranas foram coradas durante tempos prolongados, após os quais foi observada uma fraca coloração com 6 isolados bacterianos. Os isolados bacterianos continham apenas um vetor truncado e uma sequência não relacionada.

Assim, não se conseguiu identificar nenhuma sequência parcial do antigénio MN possuindo forte reatividade com MAbG250.

Estes resultados sugerem fortemente que o epitopo de G250 é um epitopo conformacional. Mais, o epitopo de G250 no antigénio MN não pode ser caracterizado através de métodos convencionais mesmo com esforços consideráveis.

Exemplo 3

Desenvolvimento de uma linha celular quimérica produtora de IgG G250

Estratégia geral

Para construir uma versão quimérica rato/humana do anticorpo G250 de murídeo, os genes da região variável para as cadeias pesada e leve, que determinam a especificidade de ligação do anticorpo, foram clonados a partir do hibridoma de murídeo G250 e montados *in vitro* com genes da região constante humana para gerar genes de anticorpo quimérico rato/humano. A expressão destes genes quiméricos na linha

celular apropriada resultou na produção de um anticorpo quimérico com as mesmas características de ligação que o anticorpo de murídeo original, mas com aproximadamente 75% da molécula compreendendo sequências humanas.

A estratégia para clonar as regiões variáveis para os genes das cadeias pesada e leve do hibridoma G250 foi baseada na ligação no genoma entre a região variável e a região J (junção) correspondente para genes de imunoglobulina funcionalmente rearranjados (e expressos). Podem ser utilizadas sondas de ADN da região J para pesquisar bibliotecas genómicas para isolar ADN ligado às regiões J; o ADN na configuração da linha germinativa (não rearranjado) também hibrida com as sondas J, mas não está ligado a uma sequência da região variável e pode ser identificado através de análise de enzimas de restrição dos clones isolados.

A estratégia de clonagem era, portanto, isolar regiões variáveis de genes das cadeias pesada e leve rearranjados utilizando sondas JH e JK. Adicionalmente, para ajudar a identificar e caracterizar os clones genómicos corretos, clones de ADNc correspondentes às regiões variáveis das cadeias pesada e leve foram também obtidos a partir do ARNm produzido no hibridoma G250. Os clones genómicos que correspondiam às sequências de ADNc de G250 foram clonados em vetores de expressão contendo regiões constantes humanas e transfectados para células de mieloma de ratinho para determinar se era produzido um anticorpo. O anticorpo das células produtoras foi então testado quanto a ligação específica em comparação com o anticorpo G250 de murídeo.

Clonagem do ADNc de VH e de VL de G250

ARN total foi isolado a partir de uma célula de hibridoma G250 e utilizado para gerar clones de ADNc específicos de VH e VL. A síntese da primeira cadeia de ADNc foi efetuada utilizando iniciadores oligonucleotídicos específicos para as regiões constantes capa e de IgG de murídeo. Após adição de uma cauda dA, a síntese da segunda cadeia foi efetuada utilizando iniciadores oligonucleotídicos com cauda em C. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve foram amplificadas através da reação em cadeia da

polimerase utilizando iniciadores 5' e 3' específicos, e os produtos da amplificação foram clonados no vetor plasmídico pUC19. Os clones de VH e VL foram sujeitos a análise de sequência de ADN para estabelecer as sequências de bases das putativas regiões variáveis das cadeias pesada e leve de G250. Os resultados da sequenciação são mostrados na Fig. 1.

Clonagem dos Genes das Regiões Variáveis de G250:

Para clonar os genes das regiões variáveis, foi isolado ADN genómico de elevado peso molecular a partir de células de hibridoma G250 através de tratamento de núcleos isolados com SDS e proteinase K seguido de duas extrações com fenol e uma precipitação em etanol.

A análise de "Southern blot" utilizando uma sonda da região J para o *locus* da cadeia pesada sugeriu que a cadeia pesada de G250 estava contida num fragmento de ADN *EcoRI* de 2,3 quilobases (Kb). Concordantemente, os fragmentos *EcoRI* do ADN do hibridoma foram fracionados num gel de agarose a 0,8% e os fragmentos de tamanho a variar de aproximadamente 2-3 Kb foram eluídos do gel e ligados aos braços de vetor do vetor do bacteriófago lambda Zap II (Stratagene, La Jolla Califórnia, EUA). A ligação foi empacotada em partículas fágicas *in vitro* utilizando Gigapack Gold (Stratagene) e plaqueadas em células *E. coli* LE392 a uma densidade de aproximadamente 20000 placas fágicas por placa de 150 mm. As placas fágicas foram transferidas para filtros de nitrocelulose e sondadas com uma sonda de ADN marcada com ³²P (um fragmento *EcoRI-BamHI* de 2,0 Kb contendo os exões J3 e J4 de murídeo).

Para o gene da região variável da cadeia leve de G250, uma análise de "Southern blot" utilizando uma sonda da região J de murídeo do *locus* capa indicou que o gene correto se situava num fragmento *HindIII* de 5,5 Kb. Concordantemente, o ADN do hibridoma G250 foi digerido com *HindIII* e os fragmentos de ADN de 5-6 Kb foram isolados a partir de um gel de agarose a 0,8% e ligados aos braços do vetor do bacteriófago lambda Charon 27. O ADN ligado foi empacotado em partículas fágicas *in vitro* utilizando Gigapack Gold (Stratagene) e plaqueadas em células de *E. coli* LE392 a uma

densidade de aproximadamente 20000 placas fágicas por placa de 150 mm. As placas fágicas foram transferidas para filtros de nitrocelulose e sondadas com uma sonda de ADN marcada com ^{32}P (um fragmento *HindIII* de 2,7 Kb contendo todos os cinco exões J capa).

Os clones positivos para os genes das cadeias pesada e leve foram isolados após pelo menos 3 ciclos de purificação de placas fágicas utilizando as sondas da região J para verificar a hibridação com o ADN fágico em cada estágio de purificação. O ADN purificado dos clones fágicos isolados para os genes das cadeias pesada e leve foi digerido com *EcoRI* (cadeia pesada) ou *HindIII* (cadeia leve) e fracionado em géis de agarose. Os fragmentos de tamanho apropriado (2,3 Kb para a cadeia pesada e 5,5 Kb para a cadeia leve) foram isolados dos géis e subclonados no vetor plasmídico pUC19. Foi mostrado através de mapeamento com enzimas de restrição e análise de sequência de ADN que estes fragmentos de ADN subclonados continham genes de anticorpo da região variável que correspondiam às estruturas dos clones de ADNc obtidos originalmente a partir do hibridoma G250.

Plasmídeos de Expressão

O fragmento *EcoRI* de 2,3 Kb da região variável da cadeia pesada foi clonado num vetor de expressão adequado que contém a região constante G1 humana e um gene que confere resistência a um marcador selecionável em células de mamífero. O fragmento *HindIII* de 5,5 Kb da cadeia leve foi clonado num vetor de expressão adequado que contém a região constante capa humana e um gene que confere resistência a um marcador selecionável em células de mamífero. A presença dos fragmentos clonados e sua orientação nos vetores de expressão foi determinada através de mapeamento com enzimas de restrição. Os vetores básicos foram utilizados previamente para a construção de anticorpos quiméricos (Sun, L. *et al.*, *PNAS* 84: 214, 1987; Knight *et al.*, *Molecular Immunology* 30: 1443-1453, 1993). A expressão dos genes do anticorpo quimérico é conseguida utilizando promotores naturais de imunoglobulina presentes a montante das regiões variáveis clonadas; os sinais reguladores a jusante são fornecidos pelos elementos associados aos genes da região constante.

Expressão do Anticorpo Quimérico G250

Os vetores de expressão das cadeias pesada e leve foram utilizados para cotransfectar uma linha celular de mieloma de ratinho não produtora utilizando a técnica de electroporação. Foi utilizado um ensaio ELISA para pesquisar clones quanto ao anticorpo segregado contendo uma região Fc humana e o maior produtor (cG250) foi escolhido para melhor caracterização.

O anticorpo quimérico foi purificado através de cromatografia de proteína A-Sepharose e analisado num ensaio de competição para verificar que o anticorpo tinha a especificidade correta. Verificou-se que o anticorpo cG250 era igualmente eficaz a competir com G250 de murídeo marcado com ^{125}I pela ligação a células de carcinoma de células renais A704 (que expressam o antigénio G250) como o anticorpo G250 de murídeo não marcado. O anticorpo G250 quimérico é, portanto, semelhante nas suas características de ligação ao anticorpo G250 de murídeo original.

Exemplo 4

Utilização do anticorpo G250 quimérico num estudo clínico

Protocolo de administração

Pacientes de carcinoma de células renais, possuindo metástases após cirurgia, foram tratados através da administração de 50 mg de anticorpo G250 quimérico através de uma infusão de 30 min. uma vez por semana durante 12 semanas.

Conclusões sobre a eficácia:

No presente estudo foi conseguido um estado de doença estável durável durante seis meses em oito dos 32 pacientes (25% dos pacientes). O tempo mediano até à progressão para todos os pacientes foi de 16 semanas (média de 26,67 semanas) com um intervalo de 4 a 70 semanas. Até dezembro de 2001, a data limiar, cinco pacientes estão ainda livres de progressão (51+, 56+, 60+, 64+ e 70+ semanas).

A importância destas constatações é apoiada pelo facto da maioria destes pacientes ter tido doença progressiva documentada, para outros dois pacientes assume-se que estavam a progredir à entrada no estudo. Adicionalmente, três destes pacientes foram refratários a terapia de citocinas e quimioterapia anteriores ou tinham tido recidivas vários anos após tratamento com citocinas. Quatro pacientes não tiveram terapia anterior e foram tratados com o fármaco do estudo imediatamente após o diagnóstico de metástases. À entrada no estudo três destes pacientes tinham um estatuto de desempenho de Karnofsky (KPS) de 80%, dois tinham um KPS de 90%. A hemoglobina (Hgb) estava abaixo de 10 g/dl em 5 pacientes. O estatuto de desempenho mediano de 90% (média de 91%) é idêntico ao do grupo de pacientes que não responderam. A Hgb mediana de 9,8 d/dl (média de 10,97 g/dl) é também relativamente baixa.

Um paciente alcançou uma remissão objetiva completa. A resposta objetiva ocorreu mais tarde, mais de seis meses após o início da terapia de estudo. Outro paciente experimentou uma redução relevante de 59% no tamanho das suas lesões alvo. A resposta de ambos os pacientes está a acontecer na semana 64 e 70, respetivamente, tal como avaliado em dezembro de 2001. A regressão do tumor ocorreu tarde, mais de seis meses após o começo da terapia de estudo. Uma explicação para a resposta retardada pode ser que a duração do tratamento com injeções iv do anticorpo quimérico foi relativamente curta e que se desenvolveu uma resposta imunitária retardada a ADCC não relacionada.

A resposta é durável em mais de um ano e ainda ocorre em dezembro de 2001. A taxa global do benefício clínico (pelo menos mais de seis meses ou resposta objetiva) é de 25%. Adicionalmente deve observar-se que seis meses após o início do tratamento de estudo, 87,5% (28/32) dos pacientes ainda estavam vivos.

No fim de novembro de 2001, uma estimativa da sobrevivência mediana foi calculada como sendo de pelo menos 13,5 meses.

No fim de janeiro de 2002, uma estimativa da sobrevivência mediana foi calculada como sendo de pelo menos 15 meses. Isto é significativamente mais elevado que a sobrevivência mediana de pacientes não tratados (três meses) e a sobrevivência mediana de pacientes tratados com uma terapia padrão aprovada pela FDA, i.e. administração de uma dose elevada de interleucina-2 (10-12 meses).

Assim, torna-se evidente que o anticorpo quimérico G250 é um agente terapêutico adequado para o tratamento de carcinoma de células renais. Numa concretização preferida o tratamento compreende uma remoção cirúrgica do tumor principal e uma administração subsequente de G250, a fim de eliminar as metástases distribuídas ao longo de todo o corpo.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Wilex AG

<120> Linha Celular de Hibridoma

<130> 26037P WO_CG

<140> PCT/EP02/01282

<141> 2002-02-07

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 357

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: gene de anticorpo quimérico ratinho/humano

<400> 1

```
gacgtgaagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ttggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactattaca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagaagaaga ggctggagtt ggctgcagcc atlaatagtg atggtgggat cacctactat 180
ctagacactg tgaagggccg attcaccatt tcaagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccttgt tttactgtgc aagacaccgc 300
tcgggtactc tttctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca 357
```

<210> 2

<211> 321

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: gene de anticorpo quimérico ratinho/humano

<400> 2

```
gacattgtga tgacccagtc tcaaagattc atgtccacaa cagtaggaga cagggtcagc 60
atcacctgca aggccagtca gaatgtggtt tctgctgtg cctgglatca acagaaacca 120
ggacaatctc ctaaaactact gatttactca gcatccaatc ggtacactgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccattagcaa tatgcagctc 240
gaagacctgg ctgatttttt ctgtcaacaa tatagcaact atccgtggac gttcgggtgga 300
ggaccaagc tggaaatcaa a 321
```

Lisboa, 2015-05-15

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um anticorpo G250 para o fabrico de uma formulação farmacêutica para o tratamento de pacientes de carcinoma de células renais após cirurgia, em que o anticorpo G250 é produzido por células de hibridoma DSM ACC 2526 ou uma célula sua descendente, em que a célula descendente foi obtida através de transferência de material genético que codifica o anticorpo G250 ou pelo menos o seu local de ligação ao antigénio, para uma célula recetora.

2. Utilização da reivindicação 1 para o tratamento de metástases após cirurgia ao tumor.

3. Utilização de um anticorpo G250 para o fabrico de um agente para provocar uma resposta imunitária retardada em pacientes de cancro mais do que seis meses após o início da terapia no tratamento de carcinoma de células renais, em que o anticorpo G250 é produzido pela célula de hibridoma DSM ACC 2526 ou uma célula sua descendente, em que a célula descendente foi obtida através de transferência de material genético que codifica o anticorpo G250 ou pelo menos o seu local de ligação ao antigénio, para uma célula recetora.

4. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1-3, em que o anticorpo é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, um anticorpo inteiramente humano, um anticorpo biespecífico, um anticorpo de cadeia simples ou um fragmento de anticorpo $F(ab')_2$, Fab' ou Fab.

5. Utilização da reivindicação 4, em que o anticorpo é um anticorpo G250 quimérico como tal.

6. Utilização da reivindicação 5, em que a formulação farmacêutica compreende um anticorpo G250 quimérico acoplado a uma citocina tal como IL-2, TNF e/ou GM-CSF.

7. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1-6, em que o ácido nucleico que codifica o anticorpo G250 compreende uma sequência de ácido nucleico como apresentada em SEQ ID NO: 1 e/ou SEQ ID NO: 2.

8. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1-7, em que o ácido nucleico que codifica o anticorpo G250 compreende

- a) uma sequência nucleotídica que codifica as regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e/ou CDR3 do local de ligação ao antigénio da cadeia pesada como apresentado na Figura 1, designadas H1-H3, e em SEQ ID NO: 1, e/ou
- b) uma sequência nucleotídica que codifica as regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e/ou CDR3 do local de ligação ao antigénio da cadeia leve como apresentado na Figura 1, designadas L1-L3, e em SEQ ID NO: 2.

9. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1-8, em que o anticorpo G250 compreende uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência nucleotídica como apresentada em SEQ ID NO: 1 e/ou SEQ ID NO: 2, e em que o anticorpo se liga seletivamente ao antigénio de G250.

10. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1-9, em que o anticorpo G250 compreende:

- (a) uma região variável da cadeia pesada compreendendo regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3 como apresentado na Fig. 1 ou pelo menos a região CDR3 da cadeia pesada de G250 ou uma região CDR3 de G250 variante possuindo uma identidade de sequência de pelo menos 80%, preferivelmente 90%, com a região CDR3 da cadeia pesada de G250 original como apresentado na Fig. 1, ao nível dos aminoácidos e/ou
- (b) uma região variável da cadeia leve compreendendo regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3 como apresentado na Fig. 1 ou pelo menos a região CDR3 da cadeia leve de G250 ou uma região CDR3 de G250 variante possuindo uma identidade de sequência de pelo menos 80%, preferivelmente 90%, com a região CDR3 da cadeia leve de G250 original como apresentado na Fig. 1, ao nível dos aminoácidos,

em que a referida região CDR3 variante da cadeia pesada e/ou da cadeia leve possui características de ligação ao antigénio equivalentes comparativamente com a região CDR3 original.

11. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1-10, em que os pacientes têm doença progressiva.

12. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1-11, em que os pacientes foram refratários a anterior terapia com citocinas ou quimioterapia, ou tinham tido recidivas após tratamento com citocinas.

Lisboa, 2015-05-15

