

(11) Número de Publicação: **PT 1973950 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/28 (2014.01) **C12N 5/10** (2014.01)

G01N 33/53 (2014.01) **A61K 39/395** (2014.01)

A61P 35/00 (2014.01) **C07K 16/30** (2014.01)

C12N 15/13 (2014.01) **C12N 15/63** (2014.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.01.04	(73) Titular(es): GENENTECH, INC.	
(30) Prioridade(s): 2006.01.05 US 756889 P 2006.01.20 US 760892 P	1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO CA	US
(43) Data de publicação do pedido: 2008.10.01	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2014.09.17 248/2014	YAN WU	US
	MINHONG YAN	US
	(74) Mandatário:	
	JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA	
	RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-EPBH4 E MÉTODOS QUE OS UTILIZAM**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA ANTICORPOS ANTI-EPHB4, E COMPOSIÇÕES QUE OS COMPREENDEM, E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DESTES ANTICORPOS.

DESCRIÇÃO

ANTICORPOS ANTI-EPBH4 E MÉTODOS QUE OS UTILIZAM

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se, de forma geral, aos campos da biologia molecular. Mais especificamente, a invenção diz respeito a anticorpos anti-EphB4, e utilizações dos mesmos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O desenvolvimento de um fornecimento vascular é um requisito fundamental para muitos processos fisiológicos e patológicos. Os tecidos que estão ativamente em crescimento, tais como os embriões e os tumores necessitam de um fornecimento de sangue adequado. Eles satisfazem esta necessidade através da produção de fatores pró-angiogênicos, que promovem a formação de novos vasos sanguíneos através de um processo chamado angiogênese. A formação do tubo vascular é um evento biológico complexo mas ordenado, que envolve todos ou muitos dos passos que se seguem: a) as células endoteliais (CE) proliferam a partir de CE existentes ou diferenciam-se a partir de células progenitoras; b) as CE migram e aglutinam-se para formar estruturas em forma de cordão; c) os cordões vasculares submetem-se então a tubulogênese para formar os vasos com um lúmen central; d) os cordões ou vasos existentes enviam brotos para formar os vasos secundários; e) o plexo vascular primitivo sofre mais remodelação e conformação; e f) as células peri-endoteliais são recrutadas para envolver os tubos endoteliais, proporcionando funções de manutenção e de modulação aos vasos; tais células incluem pericitos para os capilares pequenos, células do músculo liso para os vasos maiores, e células do miocárdio no coração. Hanahan, Science 277: 48-50 (1997); Hogan e Kolodziej, Nat. Rev.

Genet. 3: 513-23 (2002); Lubarsky e Krasnow, Cell 112: 19-28 (2003).

Está agora bem estabelecido que a angiogênese está implicada na patogênese de uma variedade de distúrbios. Estes incluem tumores sólidos e metástases, aterosclerose, retinopatia da prematuridade, hemangiomas, inflamação crônica, doenças neovasculares intraoculares, tais como as retinopatias proliferativas, por exemplo, a retinopatia diabética, a degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), o glaucoma neovascular, a rejeição imunológica de tecido córneo transplantado e de outros tecidos, a artrite reumatoide e a psoríase. Folkman et al., J. Biol. Chem. 267: 10931-34 (1992); Klagsbrun et al., Annu. Rev. Physiol. 53: 217-39 (1991); e Garner A., "Vascular diseases", em: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2ª edição (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

No caso do crescimento tumoral, a angiogênese parece ser crucial para a transição de hiperplasia para neoplasia e para proporcionar alimento para o crescimento e metástase do tumor. Folkman et al., Nature 339: 58 (1989). A neovascularização permite que as células tumorais adquiram uma vantagem de crescimento e de autonomia proliferativa em comparação com as células normais. Um tumor começa geralmente como uma única célula aberrante que pode proliferar apenas para um tamanho de poucos milímetros cúbicos, devido à distância de leitos capilares disponíveis, e pode ficar "latente" sem mais crescimento e disseminação durante um longo período de tempo. Algumas células tumorais mudam em seguida para o fenótipo angiogénico para ativar as células endoteliais, que proliferam e amadurecem em novos vasos sanguíneos capilares. Estes vasos sanguíneos recém formados permitem não só a continuação do crescimento do tumor primário, mas também a dissiminação e recolonização das células tumorais

metastáticas. Por conseguinte, tem sido observada uma correlação entre a densidade de microvasos em secções de tumores e a sobrevivência de pacientes com cancro da mama bem como com vários outros tumores. Weidner *et al.*, N. Engl. J. Med. 324: 1-6 (1991); Horak *et al.*, Lancet 340: 1120-24 (1992); Macchiarini *et al.*, Lancet 340: 145-46 (1992). Os mecanismos exatos que controlam o interruptor angiogénico não são bem compreendidos, mas crê-se que a neovascularização da massa tumoral resulta do equilíbrio total de uma multiplicidade de estimuladores e inibidores da angiogénese (Folkman, Nat. Med. 1 (1): 27-31 (1995)).

O processo de desenvolvimento vascular é rigidamente controlado. Até à data, um número significativo de moléculas, principalmente fatores segregados produzidos por células circundantes, têm mostrado regular a diferenciação, proliferação, migração e coalescência de CE em estruturas do tipo cordão. Por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi identificado como o fator chave envolvido na estimulação da angiogénese e na indução da permeabilidade vascular. Ferrara *et al.*, Endocr. Rev. 18: 4-25 (1997). A descoberta de que a perda de mesmo um único alelo do VEGF resulta em pontos de letalidade do embrião para um papel insubstituível desempenhado por este fator no desenvolvimento e na diferenciação do sistema vascular. Para além disso, o VEGF tem sido mostrado ser um mediador chave da neovascularização associada a tumores e a distúrbios intraoculares. Ferrara *et al.*, Endocr. Rev., supra. O ARNm do VEGF é sobre-expresso pela maioria dos tumores humanos examinados. Berkman *et al.*, J. Clin. Invest. 91: 153-59 (1993); Brown *et al.*, Human Pathol. 26: 86-91 (1995); Brown *et al.*, Cancer Res. 53: 4727-35 (1993); Mattern *et al.*, Brit. J. Cancer 73: 931-34 (1996); Dvorak *et al.*, Am. J. Pathol. 146: 1029-39 (1995).

Para além disso, os níveis de concentração do VEGF nos fluidos do olho estão altamente correlacionados com a

presença de proliferação ativa de vasos sanguíneos em pacientes com retinopatias relacionadas com a diabetes e com outras relacionadas com isquemia. Aiello *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 331: 1480-87 (1994). Para além disso, os estudos têm demonstrado a localização do VEGF nas membranas neovasculares da coróide em pacientes afetados pela DMRI. Lopez *et al.*, *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 37: 855-68 (1996).

Os anticorpos neutralizantes anti-VEGF suprimem o crescimento de uma variedade de linhas celulares tumorais humanas em ratinhos nus (Kim *et al.*, *Nature*, 362: 841-44 (1993); Warren *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95: 1789-97 (1995); Borgström *et al.*, *Cancer Res.* 56: 4032-39 (1996); Melnyk *et al.*, *Cancer Res.* 56: 921-24 (1996)), e também inibem a angiogénese intraocular em modelos de distúrbios retiniais isquémicos. (Adamis *et al.*, *Arch. Ophthalmol.* 114: 66-71 (1996)). Por conseguinte, os anticorpos monoclonais anti-VEGF ou outros inibidores da ação do VEGF são candidatos promissores para o tratamento de tumores e de vários distúrbios neovasculares intraoculares. Tais anticorpos são descritos, por exemplo, no documento EP 817 648, publicada a 14 de janeiro de 1998; e nos documentos WO 98/45331 e WO 98/45332, ambas publicadas a 15 de outubro de 1998. Um anticorpo anti-VEGF, o bevacizumab, foi aprovado pela FDA para o uso em combinação com um regime de quimioterapia para o tratamento do cancro colorretal metastático (CCR). E o bevacizumab está a ser investigado em muitos ensaios clínicos em curso para o tratamento de várias indicações de cancro.

O recetor EphB4 ("EphB4" ou "EphB4R") é um membro da família de recetores eph, que constitui a maior família de recetores tirosina cinase no genoma humano (revisto em Dodelet, *Oncogene*, 19: 5614-5619, 2000). Os recetores eph humanos de tirosina cinases são categorizados por identidade de sequência numa classe A e numa classe B, com

os ligandos do tipo A e do tipo B correspondentes referidos como efrinas. A sinalização pode ocorrer de uma maneira direta, na qual o recetor tirosina cinase é ativado pelo ligando, e de uma maneira inversa, em que os ligandos efrinaB transmembranares são ativados pela interação com os recetores. As interações de ligando Eph com o recetor têm sido implicadas numa grande variedade de funções biológicas, incluindo o direcionamento de axónios, a formação das fronteiras do tecido, a vasculogénese e a motilidade celular (Kullander *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3: 475-486, 2002; Cheng *et al.*, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13: 75-85, 2002; Coulthard *et al.*, *Int. J. Dev. Biol.*, 46: 375-384, 2002). O EphB4 liga-se a ligandos tais como a efrina-B1, a efrina-B2 e a efrina-B3. O recetor EphB4 tem uma região extracelular com um motivo rico em cisteína que se prolonga ao longo da sua metade do terminal amino seguido por dois motivos de fibronectina de tipo II. Existe um domínio intracelular com uma região conservada de cinase e um domínio transmembranar.

É evidente que continua a existir uma necessidade de agentes que tenham atributos clínicos que sejam ótimos para o desenvolvimento como agentes terapêuticos. A invenção aqui descrita alcança esta necessidade e proporciona outros benefícios.

O documento WO 2004/024773 divulga métodos para a inibição do crescimento de uma célula cancerígena utilizando um anticorpo, ou uma porção de ligação ao antigénio do mesmo, que se liga a um epitopo do polipéptido de EphB4. São também aqui divulgados os anticorpos purificados de EphB4, os métodos para a prevenção ou o tratamento de cancro e os métodos de identificação de agentes que podem inibir o crescimento cancerígeno de uma célula.

O documento WO 2005/090406 divulga composições polipeptídicas (por exemplo, anticorpos e porções de

ligação a antígenos dos mesmos, que se ligam ao EphB4), e métodos para a inibição da atividade do EphB4. São também divulgados os métodos e as composições para o tratamento do cancro ou para o tratamento de doenças associadas à angiogénese.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção é em parte baseada na identificação de uma variedade de agentes de ligação do EphB4 (tais como imunocombinados, anticorpos e fragmentos dos mesmos). O EphB4 apresenta-se como um alvo terapêutico importante e vantajoso, e a invenção proporciona composições e métodos baseados na ligação do EphB4. Os agentes de ligação do EphB4 da invenção, tal como aqui descritos, proporcionam agentes terapêuticos e de diagnóstico importantes para a utilização no direcionamento a condições patológicas associadas com a expressão e/ou a atividade das vias ligando EphB4-EphB4. Por conseguinte, a invenção proporciona os métodos, as composições, os kits e os artigos de fabrico relacionados com a ligação do EphB4.

A presente invenção proporciona anticorpos, tal como definidos nas reivindicações, que se ligam (tal como ligação específica) ao EphB4. A forma de comprimento completo de IgG do anticorpo pode ligar-se especificamente ao EphB4 humano com uma afinidade de ligação de cerca de 50 pM ou melhor. Tal como está bem estabelecido na tecnologia, a afinidade de ligação de um ligando ao seu recetor pode ser determinada utilizando qualquer um de uma variedade de ensaios, e expressa em termos de uma variedade de valores quantitativos. Por conseguinte, numa forma de realização, a afinidade de ligação é expressa como valores de Kd, e reflete a afinidade de ligação intrínseca (por exemplo, com efeitos de avidéz minimizados). Geralmente e preferivelmente, a afinidade de ligação é medida in vitro, quer num ambiente isento de células ou associado a células. Podem ser utilizados qualquer um de uma série de ensaios

conhecidos na tecnologia, incluindo aqueles aqui descritos, para obter medições de afinidade de ligação, incluindo, por exemplo, Biacore, radioimunoensaio (RIA) e ELISA.

O anticorpo pode ligar-se a uma região de ligação do ligando do EphB4. Em algumas formas de realização, o anticorpo isolado ligasse a um polipéptido que compreende, que consiste em, ou que consiste essencialmente do domínio extracelular do EphB4.

O anticorpo inibe, reduz, e/ou bloqueia a atividade do EphB4, incluindo a autofosforilação do EphB4 e a ligação da Efrina B2 ao EphB4. É também divulgado um anticorpo anti-EphB4, que compreende:

(a) pelo menos uma, duas, três, quatro ou cinco sequências da região hipervariável (HVR) selecionadas a partir do grupo que consiste de:

(i) HVR-L1 que compreende a sequência A1 - A11, em que A1 - A11 é RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 9)

(ii) HVR-L2 que compreende a sequência B1 - B7, em que B1 - B7 é SASFLYS (SEQ ID NO: 11)

(iii) HVR-L3 que compreende a sequência C1 - C9, em que C1 - C9 é QESTTTPPT (SEQ ID NO: 15)

(iv) HVR-H1 que compreende a sequência D1 - D10, em que D1 - D10 é GFSISNYLH (SEQ ID NO: 2)

(v) HVR-H2 que compreende a sequência E1 - E18, em que E1 - E18 é GGIYLYGSSSEYADSVKG (SEQ ID NO: 4) e

(vi) HVR-H3 que compreende a sequência F1 - F17, em que F1 - F17 é ARGSGRLRLGGLDYAMDY (SEQ ID NO: 7); e

(b) pelo menos uma variante da HVR, em que a sequência da variante da HVR compreende a modificação de pelo menos um resíduo da sequência representada nas SEQ ID NO: 1 - 17.

De acordo com as reivindicações, a invenção proporciona um anticorpo que compreende seis HVR, em que cada HVR compreende ou consiste de uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NO: 1 - 17, e em que a SEQ ID NO: 9 ou a 10 correspondem a uma

HVR-L1, a SEQ ID NO: 11 ou a 12 correspondem a uma HVR-L2, as SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, ou a 17 correspondem a uma HVR-L3, a SEQ ID NO: 1 ou a 2 correspondem a uma HVR-H1, as SEQ ID NO: 3, 4, 5, ou a 6 correspondem a uma HVR-H2, e a SEQ ID NO: 7 ou a 8 correspondem a uma HVR-H3.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende a HVR-L1, a HVR-L2, a HVR-L3, a HVR-H1, a HVR-H2 e a HVR-H3, em que cada uma, por ordem, compreende a SEQ ID NO: 9, 11, 13, 1, 3, 7.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende a HVR-L1, a HVR-L2, a HVR-L3, a HVR-H1, a HVR-H2 e a HVR-H3, em que cada uma, por ordem, compreende a SEQ ID NO: 10, 12, 14, 1, 3, 8.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende a HVR-L1, a HVR-L2, a HVR-L3, a HVR-H1, a HVR-H2 e a HVR-H3, em que cada uma, por ordem, compreende a SEQ ID NO: 9, 11, 15, 2, 4, 7.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende a HVR-L1, a HVR-L2, a HVR-L3, a HVR-H1, a HVR-H2 e a HVR-H3, em que cada uma, por ordem, compreende a SEQ ID NO: 9, 11, 16, 1, 5, 7.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende a HVR-L1, a HVR-L2, a HVR-L3, a HVR-H1, a HVR-H2 e a HVR-H3, em que cada uma, por ordem, compreende a SEQ ID NO: 9, 11, 17, 1, 6, 7.

As variantes das HVR num anticorpo aqui descrito podem ter modificações de um ou mais (tal como dois, três, quatro, cinco, ou mais) resíduos dentro da HVR.

Uma variante da HVR-L1 pode compreender de 1 - 5 (1, 2, 3, 4 ou 5) substituições, em qualquer combinação, das posições que se seguem: A6 (V ou S), A7 (S ou E), A8 (T ou I), A9 (A ou F), e A10 (V ou L).

Uma variante da HVR-L2 pode compreender de 1 - 2 (1 ou 2) substituições, em qualquer combinação, das posições que se seguem: B4 (F ou N) e B6 (Y ou E).

Uma variante da HVR-L3 pode compreender de 1 - 7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7) substituições, em qualquer combinação, das posições que se seguem: C2 (Q, E, ou K), C3 (S ou T), C4 (Y, N, T, E ou A), C5 (T, A ou Q), C6 (T, V, ou I), C8 (P, L, ou E), e C9 (T ou S).

Uma variante da HVR-H1 pode compreender de 1 - 3 (1, 2, ou 3) substituições, em qualquer combinação, das posições que se seguem: D3 (T ou S), D6 (G ou N), e D9 (I ou L).

Uma variante da HVR-H2 pode compreender de 1 - 5 (1, 2, 3, 4 ou 5) substituições, em qualquer combinação, das posições que se seguem: E5 (P ou L), E7 (S ou G), E8 (G ou S), E10 (T, S ou R), e E11 (D, E ou G).

Uma variante da HVR-H3 pode compreender 1 substituição nas posições que se seguem: F3 (G ou S).

A(s) letra(s) entre parênteses a seguir a cada posição indica(m) uma substituição ilustrativa (ou seja, uma substituição) de aminoácidos; como seria evidente para um perito na especialidade, a adequação de outros aminoácidos como aminoácidos de substituição no contexto aqui descrito pode ser avaliada rotineiramente utilizando técnicas conhecidas na tecnologia e/ou aqui descritas.

As sequências de aminoácidos das SEQ ID NO: 1 - 17 estão numeradas em relação à HVR individual (isto é, H1, H2 ou H3), tal como indicado na figura 1, sendo a numeração consistente com o sistema de numeração de Kabat tal como descrito em seguida.

Também são divulgados anticorpos que compreendem as sequências da cadeia pesada da HVR tal como representado na figura 1.

Também são divulgados anticorpos que compreendem as sequências da cadeia leve da HVR tal como representado na figura 1.

Alguns anticorpos aqui divulgados compreendem um domínio variável de cadeia leve do anticorpo 4D5 humanizado

(huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EUA) (também referido na patente U.S. N°. 6.407.213 e em Lcc *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340 (5): 1073-93), tal como ilustrado na SEQ ID NO: 18 em seguida.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
Ser Gln Asp Val **Asn** Thr Ala Val Ala **Trp** Tyr Gln Gln
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala
Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 Ser **Arg** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO: 18) (os resíduos da
 HVR estão sublinhados)

Em algumas formas de realização dos anticorpos da invenção, a sequência do domínio variável de cadeia leve de huMAb4D5-8 é modificada em uma ou mais das posições 30, 66 e 91 (Asn, Arg e His, tal como indicado anteriormente a negrito/itálico, respetivamente). Numa forma de realização, a sequência modificada de huMAb4D5-8 compreende Ser na posição 30, Gly na posição 66 e/ou Ser na posição 91. Por conseguinte, numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência ilustrada na SEQ ID NO: 52 em seguida:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
Ser Gln Asp Val **Ser** Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala
Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO: 52) (os resíduos da
 HVR estão sublinhados)

Os resíduos substituídos com respeito a huMAb4D5-8 estão anteriormente indicados em negrito/itálico.

Os anticorpos da invenção podem compreender qualquer sequência de domínio variável de estrutura adequada, desde que a atividade de ligação de EphB4 seja substancialmente retida. Por exemplo, em algumas formas de realização, os anticorpos da invenção compreendem uma sequência de consenso de estrutura de cadeia pesada do subgrupo III humana. Numa forma de realização destes anticorpos, a sequência de consenso de estrutura compreende substituição na posição 71, 73 e/ou 78. Em algumas formas de realização destes anticorpos, a posição 71 é A, a 73 é T e/ou a 78 é A. Numa forma de realização, estes anticorpos compreendem sequências de estrutura do domínio variável de cadeia pesada de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EUA) (também referido nas patentes US n°. 6.407.213 e 5.821.337, e em Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340 (5): 1073-93). Numa forma de realização, estes anticorpos compreendem ainda uma sequência de consenso de estrutura de cadeia leve humana κ I. Numa forma de realização, estes anticorpos compreendem sequências de cadeia leve da HVR de huMAb4D5-8, tal como descrito nas patentes U.S. n°. 6.407.213 e 5.821.337). Numa forma de realização, estes anticorpos compreendem sequências de domínio variável de cadeia leve de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN□, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EUA) (também referido nas patentes U.S. n°. 6.407.213 e 5.821.337, e em Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340 (5): 1073-93).

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende a sequência das SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 e/ou 37, e as sequências das HVR-H1, H2 e H3 são as SEQ ID NO: 9, 11, e 15, respetivamente. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um

domínio variável de cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende a sequência das SEQ ID NO: 38, 39, 40 e/ou 41, e as sequências das HVR L1, L2 e L3 são as SEQ ID NO: 2, 4, e 7, respectivamente.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende a sequência das SEQ ID NO: 46, 47, 48 e/ou 49, e as sequências das HVR H1, H2 e H3 são as SEQ ID NO: 2, 4, e 7, respectivamente. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende a sequência das SEQ ID NO: 42, 43, 44 e/ou 45, e as sequências das HVR L1, L2 e L3 são as SEQ ID NO: 9, 11, e 15, respectivamente.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada, em que a sequência de estrutura compreende as sequências das SEQ ID NO: 46, 47, 51, e 49, e as sequências das HVR H1, H2 e H3 são as SEQ ID NO: 2, 4, e 7, respectivamente. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia leve, em que a sequência de estrutura compreende as sequências das SEQ ID NO: 42, 43, 50, e 45, e as sequências das HVR L1, L2 e L3 são as SEQ ID NO: 9, 11 e 15, respectivamente.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção é maturado por afinidade para se obter a afinidade de ligação ao alvo desejada. Num exemplo, um anticorpo maturado por afinidade da invenção compreende uma substituição em uma ou mais posições de aminoácido H28, H31, H34, H52a, H54, H55, H57, H58, H95, L29, L30, L31, L32, L33, L53, L55, L90, L91, L92, L93, L94, L96, ou L97. Num exemplo um anticorpo maturado por afinidade da invenção compreende uma ou mais das substituições que se seguem: (a) na cadeia pesada, T28S, G31N, I34L, P52aL, S54G, G55S, T57S ou R, D58, E ou G, G95S ou (b) na cadeia leve, V29S, S30E, T31I, A32F,

V33L, F53N, Y55E, Q90E ou K, S91T, Y92N T E ou A, T93V ou I, T94V ou I, P96L ou E, ou T97S.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 53. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 54. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 53, e um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 54.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 55. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 56. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 55, e um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 56.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 57. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 58. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 57, e um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 58.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 59. Numa forma de

realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 60. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 59, e um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 60.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 61. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 62. Numa forma de realização, um anticorpo da invenção compreende um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 61, e um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 62.

Num aspeto, a invenção proporciona um anticorpo que compete com qualquer um dos anticorpos mencionados anteriormente para a ligação a EphB4. Num aspeto, a invenção proporciona um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo em EphB4, tal como qualquer um dos anticorpos mencionados anteriormente.

Tal como é conhecido na tecnologia, e tal como descrito em maior pormenor em seguida, a posição/limite do aminoácido que delimita uma região hipervariável de um anticorpo pode variar, dependendo do contexto e das diversas definições conhecidas na tecnologia (tal como descrito em seguida). Algumas posições dentro de um domínio variável podem ser vistas como posições hipervariáveis híbridas, uma vez que estas posições podem ser consideradas como estando dentro de uma região hipervariável sob um conjunto de critérios, enquanto estando a ser consideradas como estando fora de uma região hipervariável sob um conjunto diferente de critérios. Uma ou mais destas

posições podem também ser encontradas nas regiões hipervariáveis prolongadas (tal como melhor definido em seguida).

Em algumas formas de realização, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em algumas formas de realização, o anticorpo é um anticorpo policlonal. Em algumas formas de realização, o anticorpo é selecionado a partir do grupo que consiste de um anticorpo quimérico, um anticorpo maturado por afinidade, um anticorpo humanizado e um anticorpo humano. Em algumas formas de realização, o anticorpo é um fragmento de anticorpo. Em algumas formas de realização, o anticorpo é Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ ou scFv.

Numa forma de realização, o anticorpo é um anticorpo quimérico, por exemplo, um anticorpo que compreende as sequências de ligação ao antigénio de um dador não humano transplantado para uma sequência heteróloga não humana, humana ou humanizada (por exemplo, sequências de estrutura e/ou de domínio constante). Numa forma de realização, o dador não humano é um ratinho. Numa forma de realização, uma sequência de ligação ao antigénio é sintética, por exemplo, obtida através de mutagénesis (por exemplo, rastreio de apresentação de fagos, etc.). Numa forma de realização, um anticorpo quimérico da invenção possui regiões V de murino e a região C humana. Numa forma de realização, a região V da cadeia leve de murino é fusionada com uma cadeia leve kapa humana. Numa forma de realização, a região V da cadeia pesada de murino é fusionada com uma região IgG1 C humana.

Os anticorpos humanizados da invenção incluem aqueles que têm substituições de aminoácidos na FR e nas variantes de maturação de afinidade com alterações nas CDR transplantadas. Os aminoácidos substituídos na CDR ou FR não estão limitados aos presentes no anticorpo do dador ou do recetor. Em outras formas de realização, os anticorpos da invenção compreendem ainda alterações nos resíduos de

aminoácidos na região Fc, que conduzem a uma função efectora aumentada incluindo CDC potenciada e/ou função ADCC e morte de células-B. Outros anticorpos da invenção incluem aqueles que têm modificações específicas que melhoram a estabilidade. Em outras formas de realização, os anticorpos da invenção compreendem alterações nos resíduos de aminoácidos na região Fc, que levam à diminuição da função efectora, por exemplo, diminuição de CDC e/ou função ADCC e/ou diminuição da morte de células-B. Em algumas formas de realização, os anticorpos da invenção são caracterizados pela diminuição da ligação (tal como ausência de ligação) ao fator do complemento humano C1q e/ou recetor de Fc humano em células *natural killer* (NK). Em algumas formas de realização, os anticorpos da invenção são caracterizados pela diminuição da ligação (tal como a ausência de ligação) a FcγRI humano, FcγRIIA, e/ou FcγRIIIA. Em algumas formas de realização, os anticorpos da invenção são da classe IgG (por exemplo, IgG1 ou IgG4), e compreendem pelo menos uma mutação em E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 e/ou P329 (numeração de acordo com o índice da UE). Em algumas formas de realização, os anticorpos compreendem a mutação L234A/L235A ou D265A/N297A.

Num aspeto, a invenção proporciona polipéptidos anti-EphB4 que compreendem qualquer uma das sequências de ligação ao antigénio aqui proporcionadas, em que os polipéptidos anti-EphB4 se ligam especificamente a EphB4.

Os anticorpos da invenção ligam-se (tal como se ligam especificamente) a EphB4, e bloqueiam a ligação de EfrinaB2 a EphB4, e bloqueiam a fosforilação da tirosina de EphB4 mediada por EfrinaB2, e não reagem de forma cruzada com EphB1 humano, EphB2 humano, EphB3 humano ou EphB6 humano. Em algumas formas de realização, eles podem modular um ou mais outros aspetos dos efeitos associados a EphB4, incluindo, mas não se limitado a, ativação de EphB4,

sinalização molecular a jusante de EphB4, ativação do ligando de EphB4, sinalização molecular a jusante do ligando de EphB4, e/ou multimerização de EphR4, e/ou fosforilação do ligando de EphB4, e/ou perturbações de qualquer via biológica biologicamente relevante de EphB4 e/ou do ligando de EphB4, inibição da angiogénese, e/ou tratamento e/ou prevenção de um tumor, distúrbio proliferativo celular ou um cancro; e/ou tratamento ou prevenção de um distúrbio associado à expressão de EphB4 e/ou atividade (tal como o aumento da expressão de EphB4 e/ou atividade). Em algumas formas de realização, o anticorpo da invenção liga-se especificamente a EphB4. Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se especificamente ao domínio extracelular de EphB4 (ECD). Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se especificamente a um polipéptido que consiste em, ou que consiste essencialmente no domínio extracelular de EphB4. Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se especificamente a EphB4 com uma KD de cerca de 50 pM ou mais forte. Em algumas formas de realização, o anticorpo da invenção reduz, inibe, e/ou bloqueia a atividade de EphB4 in vivo e/ou in vitro. De acordo com a invenção, o anticorpo reduz, inibe e/ou bloqueia a autofosforilação de EphB4. De acordo com a invenção, o anticorpo compete pela ligação com EfrinaB2 (reduz e/ou bloqueia a ligação de EfrinaB2 a EphB4).

Num aspeto, a invenção proporciona a utilização de um anticorpo da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma neuropatia ou uma doença neurodegenerativa.

Num aspeto, a invenção proporciona a utilização de um anticorpo da invenção na preparação de um medicamento para a inibição da angiogénese.

Num aspeto, a invenção proporciona composições que compreendem um ou mais anticorpos da invenção e um transportador. Numa forma de realização, o transportador é farmacologicamente aceitável.

Num aspeto, a invenção proporciona ácidos nucleicos que codificam para um anticorpo anti-EphB4 da invenção.

Num aspeto, a invenção proporciona vetores que compreendem um ácido nucleico da invenção.

Num aspeto, a invenção proporciona composições que compreendem um ou mais ácidos nucleicos da invenção e um transportador. Numa forma de realização, o transportador é farmacologicamente aceitável.

Num aspeto, a invenção proporciona células hospedeiras que compreendem um ácido nucleico ou um vetor da invenção. Um vetor pode ser de qualquer tipo, por exemplo, um vetor recombinante tal como um vetor de expressão. Podem ser utilizadas qualquer uma de uma variedade de células hospedeiras. Numa forma de realização, uma célula hospedeira é uma célula procariótica, por exemplo, E. coli. Numa forma de realização, uma célula hospedeira é uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de mamífero, tal como células de ovário de hamster chinês (CHO).

Num aspeto, a invenção proporciona métodos para a preparação de um anticorpo da invenção. Por exemplo, a invenção proporciona métodos para a preparação de um anticorpo anti-EphB4 (que, tal como é aqui definido, inclui de comprimento total e fragmentos do mesmo), ou de um imunocombinado, compreendendo o método referido a expressão numa célula hospedeira adequada, um vetor recombinante da invenção que codifica para o anticorpo referido (ou um fragmento do mesmo), e a recuperação do anticorpo referido.

Também é divulgado um artigo de fabrico que compreende um recipiente; e uma composição contida no interior do recipiente, em que a composição compreende um ou mais anticorpos anti-EphB4 da invenção. Numa forma de

realização, a composição compreende um ácido nucleico da invenção. Numa forma de realização, uma composição que compreende um anticorpo compreende ainda um transportador, que em algumas formas de realização é farmacologicamente aceitável. Numa forma de realização, um artigo de fabrico da invenção compreende ainda as instruções para a administração da composição (para, por exemplo, o anticorpo) a um sujeito (tais como instruções para qualquer um dos métodos aqui descritos).

É também divulgado um kit que compreende um primeiro recipiente que compreende uma composição que compreende um ou mais anticorpos anti-EphB4 da invenção; e um segundo recipiente que compreende um tampão. Numa forma de realização, o tampão é farmacologicamente aceitável. Numa forma de realização, uma composição que compreende um anticorpo compreende ainda um transportador, que em algumas formas de realização é farmacologicamente aceitável. Numa forma de realização, um kit compreende ainda instruções para a administração da composição (para, por exemplo, o anticorpo) a um sujeito.

Num aspeto, a invenção proporciona a utilização de um anticorpo anti-EphB4 da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma neuropatia ou uma doença neurodegenerativa. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma condição patológica associada com a angiogénese.

Também é divulgada a utilização de um ácido nucleico da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma neuropatia ou uma doença neurodegenerativa.

Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma condição patológica associada com a angiogénese.

Também é divulgada a utilização de um vetor de expressão da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma neuropatia ou uma doença neurodegenerativa. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma condição patológica associada com a angiogénese.

Também é divulgada a utilização de uma célula hospedeira da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma neuropatia ou uma doença neurodegenerativa. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma condição patológica associada com a angiogénese.

Também é divulgada a utilização de um artigo de fabrico da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma neuropatia ou uma doença neurodegenerativa. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma condição patológica associada com a angiogénese.

Também é divulgada a utilização de um kit da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio, tal como um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma neuropatia ou uma doença neurodegenerativa. Em algumas formas de realização, o distúrbio é uma condição patológica associada com a angiogénese.

A invenção proporciona meios, tal como definidos nas

reivindicações, úteis para a modulação de estados de doença associados à expressão e/ou a atividade de EphB4, tais como o aumento ou a diminuição da expressão e/ou da atividade, ou da expressão indesejada e/ou atividade.

Num aspeto, a invenção proporciona meios para o tratamento ou a prevenção de um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular associados à expressão aumentada e/ou a atividade de EphB4, por administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 a um sujeito em necessidade de tal tratamento.

Também são divulgados métodos para matar uma célula (tal como uma célula cancerígena ou tumoral), compreendendo os métodos a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 a um sujeito em necessidade de tal tratamento.

Num aspeto, a invenção proporciona meios para reduzir, inibir, bloquear ou prevenir o crescimento de um tumor ou cancro, por administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 a um sujeito em necessidade de tal tratamento.

Também são divulgados métodos para o tratamento ou a prevenção de uma neuropatia ou de uma doença neurodegenerativa, ou a reparação de uma célula do nervo danificada, compreendendo os métodos a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 a um sujeito em necessidade de tal tratamento.

Também são divulgados métodos para promover o desenvolvimento, proliferação, manutenção ou regeneração de neurónios, compreendendo os métodos a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 a um sujeito em necessidade de tal tratamento.

Num aspeto, a invenção proporciona meios para a inibição da angiogénese, que compreendem a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 a um sujeito em necessidade de tal tratamento.

Num aspeto, a invenção proporciona meios para o tratamento de uma condição patológica associada com a angiogénese, que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 a um sujeito em necessidade de tal tratamento. Em algumas formas de realização, a condição patológica associada com a angiogénese é um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Em algumas formas de realização, a condição patológica associada com a angiogénese é uma doença neovascular intraocular.

A invenção pode ser utilizada para afetar qualquer estado patológico adequado. Os distúrbios exemplares são aqui descritos, e incluem um cancro selecionado a partir do grupo que consiste em cancro do pulmão de pequenas células, neuroblastomas, melanoma, carcinoma da mama, cancro gástrico, cancro colorretal (CCR), e carcinoma hepatocelular.

Numa forma de realização, uma célula que é visada pela invenção é uma célula cancerígena. Por exemplo, uma célula cancerígena pode ser uma selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula de cancro da mama, uma célula de cancro colorretal, uma célula de cancro do pulmão, uma célula de carcinoma papilar, uma célula de cancro do cólon, uma célula de cancro pancreático, uma célula de cancro do ovário, uma célula de cancro cervical, uma célula de cancro do sistema nervoso central, uma célula de sarcoma osteogénico, uma célula de carcinoma renal, uma célula de carcinoma hepatocelular, uma célula de cancro da bexiga, uma célula de carcinoma gástrico, uma célula de carcinoma escamoso da cabeça e pescoço, uma célula de melanoma, uma célula de leucemia, e uma célula de adenoma do cólon. Numa forma de realização, uma célula que é visada pela invenção é uma célula hiperproliferativa e/ou hiperplásica. Numa forma de realização, uma célula que é visada pela invenção é uma célula displásica. Em ainda outra forma de

realização, uma célula que é visada pela invenção é uma célula metastática.

Podem ser empregues passos adicionais de tratamento. Por exemplo, numa realização, uma célula alvo e/ou um tecido (por exemplo, uma célula cancerígena) é exposto a um tratamento de radiação ou a um agente quimioterapêutico.

O anticorpo anti-EphB4 da invenção pode ser administrado em combinação com uma quantidade eficaz de um outro agente terapêutico (tal como um agente antiangiogénese). Por exemplo, um (uns) anticorpo(s) anti-EphB4 é (são) utilizado(s) em combinações com um agente anticancro ou um agente antiangiogénico para o tratamento de várias condições neoplásicas ou não neoplásicas. Numa forma de realização, a condição neoplásica ou não neoplásica é uma condição patológica associada com a angiogénese. Em algumas formas de realização, o outro agente terapêutico é um agente antiangiogénico, um agente antineoplásico, e/ou um agente quimioterapêutico.

O anticorpo anti-EphB4 pode ser administrado em série ou em combinação com o outro agente terapêutico que é eficaz para estes fins, quer na mesma composição ou em composições separadas. A administração do anticorpo anti-EphB4 e do outro agente terapêutico (por exemplo, um agente anticancro, um agente antiangiogénico) pode ser feita simultaneamente, por exemplo, como uma composição única, ou como duas ou mais composições distintas, usando a mesma ou diferentes vias de administração. Alternativamente, ou adicionalmente, a administração pode ser feita sequencialmente, em qualquer ordem. Alternativamente, ou adicionalmente, as etapas podem ser realizadas como uma combinação de tanto sequencialmente e simultaneamente, em qualquer ordem. Em certas formas de realização, os intervalos que variam de minutos a dias, até de semanas a meses, podem estar presentes entre as administrações das duas ou mais composições. Por exemplo, o agente anticancro

pode ser administrado primeiro, seguido pelo anticorpo anti-EphB4. No entanto, também é contemplada a administração simultânea ou a administração do anticorpo anti-EphB4 primeiro. Deste modo, num aspeto, a invenção proporciona métodos que compreendem a administração de um anticorpo anti-EphB4, seguida da administração de um agente antiangiogénico (tal como um anticorpo anti-VEGF, tal como o bevacizumab). Em certas formas de realização, os intervalos que variam de minutos a dias, até de semanas a meses, podem estar presentes entre as administrações das duas ou mais composições.

Em certos aspetos, a invenção proporciona meios para o tratamento de um distúrbio (tal como um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular), através da administração de quantidades eficazes de um anticorpo anti-EphB4 e/ou de um (uns) inibidor(es) da angiogénese, e de um ou mais agentes quimioterapêuticos. Podem ser utilizados uma variedade de agentes quimioterapêuticos nos métodos de tratamento combinados da invenção. É aqui proporcionada uma lista exemplificativa e não limitativa de agentes quimioterapêuticos contemplados sob "Definições". A administração do anticorpo anti-EphB4 e do agente quimioterapêutico pode ser efetuada simultaneamente, por exemplo, como uma composição única ou como duas ou mais composições distintas, usando as mesmas ou diferentes vias de administração. Alternativamente, ou adicionalmente, a administração pode ser feita sequencialmente, em qualquer ordem. Alternativamente, ou adicionalmente, as etapas podem ser realizadas como uma combinação tanto de sequencialmente e simultaneamente, em qualquer ordem. Em certas formas de realização, os intervalos que variam de minutos a dias, até de semanas a meses, podem estar presentes entre as administrações de duas ou mais composições. Por exemplo, o agente quimioterapêutico pode ser administrado primeiro, seguido pelo anticorpo anti-EphB4. No entanto, é também

contemplada a administração simultânea ou a administração do anticorpo anti-EphB4 primeiro. Deste modo, num aspeto, a invenção proporciona métodos que compreendem a administração de um anticorpo anti-EphB4, seguido por administração de um agente quimioterapêutico. Em certas formas de realização, os intervalos que variam de minutos a dias, até de semanas a meses, podem estar presentes entre as administrações das duas ou mais composições.

Num aspeto, a invenção proporciona meios de reforço da eficácia de um agente antiangiogénico num sujeito que tem uma condição patológica associada com a angiogénese, que compreende a administração ao sujeito de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 em combinação com o agente antiangiogénico, aumentando deste modo a atividade inibidora do agente antiangiogénico referido.

Num outro aspeto, tal como definido nas reivindicações, a invenção proporciona métodos para a deteção de EphBA, compreendendo os métodos a deteção na amostra do complexo EphB4-anticorpo anti-EphB4. O termo "deteção", tal como é aqui utilizado inclui a deteção qualitativa e/ou quantitativa (medindo os níveis), com ou sem referência a um controlo.

Num outro aspeto, tal como definido nas reivindicações, a invenção proporciona métodos para o diagnóstico de um distúrbio associado à expressão de EphB4 e/ou a atividade, compreendendo os métodos a deteção do complexo EphB4-anticorpo anti-EphB4 numa amostra biológica de um paciente tendo ou com suspeitas de ter o distúrbio. Em algumas formas de realização, a expressão de EphB4 é uma expressão aumentada ou expressão anormal. De acordo com a invenção, o distúrbio é um tumor, cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular.

Num outro aspeto, a invenção proporciona qualquer um dos anticorpos anti-EphB4 aqui descritos, em que o anticorpo anti-EphB4 compreende um marcador detetável.

Num outro aspeto, a invenção proporciona um complexo de qualquer um dos anticorpos anti-EphB4 aqui descritos e EphB4. Em algumas formas de realização, o complexo é *in vivo* ou *in vitro*. Em algumas formas de realização, o complexo compreende uma célula cancerígena. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-EphB4 é marcado de forma detetável.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIGURA 1: sequências de ansa de HVR de cadeia pesada e cadeia leve de anticorpos anti-EphB4. A figura mostra as sequências de HVR de cadeia pesada, H1, H2, e H3, e as sequências de HVR de cadeia leve, L1, L2 e L3. A numeração da sequência é tal como se segue: clone 30.35 (HVR-H1 é a SEQ ID NO: 1; HVR-H2 é a SEQ ID NO: 3; HVR-H3 é a SEQ ID NO: 7; HVR-L1 é a SEQ ID NO: 9; HVR-L2 é a SEQ ID NO: 11; HVR-L3 é a SEQ ID NO: 13); clone 30.35.1D2 (HVR-H1 é a SEQ ID NO: 1; HVR-H2 é a SEQ ID NO: 3; HVR-H3 é a SEQ ID NO: 8; HVR-L1 é a SEQ ID NO: 10; HVR-L2 é a SEQ ID NO: 12; HVR-L3 é a SEQ ID NO: 14); clone 30.35.2D8 (HVR-H1 é a SEQ ID NO: 2; HVR-H2 é a SEQ ID NO: 4; HVR-H3 é a SEQ ID NO: 7; HVR-L1 é a SEQ ID NO: 9; HVR-L2 é a SEQ ID NO: 11; HVR-L3 é a SEQ ID NO: 15); clone 30.35.2D12 (HVR-H1 é a SEQ ID NO: 1; HVR-H2 é a SEQ ID NO: 5; HVR-H3 é a SEQ ID NO: 7; HVR-L1 é a SEQ ID NO: 9; HVR-L2 é a SEQ ID NO: 11; HVR-L3 é a SEQ ID NO: 16); e clone 30.35.2D13 (HVR-H1 é a SEQ ID NO: 1; HVR-H2 é a SEQ ID NO: 6; HVR-H3 é a SEQ ID NO: 7; HVR-L1 é a SEQ ID NO: 9; HVR-L2 é a SEQ ID NO: 11; HVR-L3 é a SEQ ID NO: 17).

As posições dos aminoácidos são numeradas de acordo com o sistema de numeração de Kabat, tal como descrito em seguida.

As FIGURAS 2A e 2B e 3 ilustram as sequências exemplares de estrutura de consenso aceitadoras de humano para a utilização na prática da presente

invenção com identificadores de sequência tal como se segue:

Estruturas de consenso pesadas variáveis (VH) (FIG. 2A e 2B)

estrutura de consenso de VH de humano do subgrupo I menos as CDR de Kabat (SEQ ID NO: 19)

estrutura de consenso de VH de humano do subgrupo I menos as regiões hipervariáveis prolongadas (SEQ ID NO: 20 - 22)

estrutura de consenso de VH de humano do subgrupo II menos as CDR de Kabat (SEQ ID NO: 23)

estrutura de consenso de VH de humano do subgrupo II menos as regiões hipervariáveis prolongadas (SEQ ID NO: 24 - 26)

estrutura de consenso de VH de humano do subgrupo III menos as CDR de Kabat (SEQ ID NO: 27)

estrutura de consenso de VH de humano do subgrupo III menos as regiões hipervariáveis prolongadas (SEQ ID NO: 28 - 30)

estrutura aceitadora de VH de humano menos as CDR de Kabat (SEQ ID NO: 31)

estrutura aceitadora de VH de humano menos as regiões hipervariáveis prolongadas (SEQ ID NO: 32 - 33)

estrutura aceitadora 2 de VH de humano menos as CDR de Kabat (SEQ ID NO: 34)

estrutura aceitadora 2 de VH de humano menos as regiões hipervariáveis prolongadas (SEQ ID NO: 35 - 37)

Estruturas de consenso de leves variáveis (VL) (FIG. 3)

estrutura de consenso de VL kappa de humano do subgrupo I (SEQ ID NO: 38)

estrutura de consenso de VL kappa de humano do subgrupo II (SEQ ID NO: 39)

estrutura de consenso de VL kappa de humano do

subgrupo III (SEQ ID NO: 40)

estrutura de consenso de VL kapa de humano do subgrupo IV (SEQ ID NO: 41)

A FIGURA 4 ilustra as sequências da região de estrutura das cadeias leve e pesada de huMAb4D5-8. Os números em expoente/negrito indicam as posições de aminoácidos de acordo com Kabat.

A FIGURA 5 ilustra as sequências da região de estrutura modificada/variante das cadeias leve e pesada de huMAb4D5-8. Os números em expoente/negrito indicam as posições de aminoácidos de acordo com Kabat.

A FIGURA 6 ilustra as regiões variáveis da cadeia pesada e as regiões variáveis da cadeia leve dos clones de anticorpo 30.35, 30.35.1D2, 30.35.2D8, 30.35.2D12, e 20.25.2D13.

FIGURA 7: Um anticorpo monoclonal anti-EpB4 bloqueou a sinalização do recetor EphB4 num ensaio com base em células.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona anticorpos anti-EphB4, que são úteis para, por exemplo, o tratamento ou a prevenção de estados de doença associados à expressão e/ou a atividade de EphB4, tais como o aumento da expressão e/ou da atividade ou a expressão indesejável e/ou atividade. Em algumas formas de realização, os anticorpos da invenção são utilizados para tratar um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular.

Noutro aspeto, os anticorpos anti-EphB4 da invenção encontram utilidade como reagentes para a deteção e/ou o isolamento de EphB4, tais como a detenção de EphB4 em vários tecidos e tipos de célula.

A invenção proporciona ainda métodos de preparação de anticorpos anti-EphB4, e polinucleótidos que codificam para os anticorpos anti-EphB4.

Técnicas gerais

As técnicas e procedimentos aqui descritos ou referenciados são geralmente bem entendidos e vulgarmente empregues utilizando metodologia convencional pelos peritos na especialidade, tais como, por exemplo, as metodologias amplamente utilizadas descritas em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª edição (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, *et al.*, eds., (2003)); as séries *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M. J. MacPherson, B. D. Hames e G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow e Lane, eds. (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, e *ANIMAL CELL CULTURE* (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definições

Um anticorpo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que iriam interferir com as utilizações de diagnóstico ou terapêuticas para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteínáceos ou não proteínáceos. Em formas de realização preferidas, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% em peso de anticorpo tal como determinado pelo método de Lowry, e mais preferivelmente mais do que 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos da sequência de aminoácidos do terminal-N ou interna por utilização de um sequenciador de copo rotativo, ou (3) até à homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras utilizando azul de Coomassie ou, de preferência, coloração de prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes, uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Vulgarmente, contudo, o anticorpo isolado será preparado por pelo menos um passo de purificação.

Uma molécula de ácido nucleico "isolada" é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante, com a qual está vulgarmente associada na fonte natural do anticorpo ácido nucleico. Uma molécula de ácido nucleico isolada é outra que não na forma ou configuração na qual é encontrada na natureza. As moléculas de ácidos nucleicos isolados distinguem-se portanto da molécula de ácido nucleico tal como existe em células naturais. No entanto, uma molécula de ácido nucleico isolada inclui uma molécula de ácido nucleico contida em células que expressam vulgarmente o anticorpo onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está numa localização cromossômica diferente daquela das células naturais.

O termo "a numeração dos resíduos de domínio variável tal como em Kabat" ou "a numeração da posição de aminoácido tal como em Kabat" e variações dos mesmos, refere-se ao sistema de numeração usado para os domínios variáveis da cadeia pesada ou os domínios variáveis da cadeia leve da compilação de anticorpos em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Usando este sistema de numeração, a sequência de aminoácidos linear real pode conter menos ou mais aminoácidos correspondentes a um encurtamento de, ou inserção em, uma FR ou CDR do domínio variável. Por exemplo, um domínio variável de cadeia pesada pode incluir um inserto único de aminoácido (resíduo 52a de acordo com Kabat) após o resíduo 52 de H2, e os resíduos inseridos (por exemplo, os resíduos 82a, 82b, e 82c, etc. de acordo com Kabat) após o resíduo 82 da FR de cadeia pesada. A numeração de Kabat dos resíduos pode ser determinada para um dado anticorpo por alinhamento das regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência "padrão" numerada de acordo com Kabat.

A frase "substancialmente semelhante" ou "substancialmente o mesmo", tal como é aqui utilizada, denota um grau suficientemente elevado de similaridade entre dois valores numéricos (geralmente um associado a um anticorpo da invenção e o outro associado a um anticorpo de referência/comparador), de tal modo que um perito na especialidade iria considerar a diferença entre os dois valores como sendo de pouca ou nenhuma significância biológica e/ou estatística no contexto da característica biológica medida pelos valores referidos (por exemplo, valores de Kd). A diferença entre os dois valores referidos é de preferência menor do que cerca de 50%, de preferência menos do que cerca de 40%, de preferência menos do que cerca de 30%, de preferência menos do que cerca de 20%, de preferência menos do que cerca de 10% como uma função do valor para o anticorpo de referência/comparador.

A "afinidade de ligação" refere-se geralmente à força da soma total de interações não covalentes entre um único local de ligação de uma molécula (por exemplo, um anticorpo) e do seu parceiro de ligação (por exemplo, um antigénio). A menos que indicado em contrário, tal como aqui utilizada, a "afinidade de ligação" refere-se à afinidade de ligação intrínseca que reflete uma interação de 1:1 entre os membros de um par de ligação (por exemplo, anticorpo e antigénio). A afinidade de uma molécula X pelo seu parceiro Y pode geralmente ser representada pela constante de dissociação (Kd). A afinidade pode ser medida por métodos comuns conhecidos na tecnologia, incluindo aqueles aqui descritos. Os anticorpos de baixa afinidade ligam-se geralmente ao antigénio lentamente e tendem a dissociar-se facilmente, enquanto que anticorpos de elevada afinidade ligam-se geralmente ao antigénio mais rápido e tendem a permanecer ligados por mais tempo. São conhecidos na tecnologia uma variedade de métodos de medição da afinidade de ligação, qualquer um dos quais pode ser

utilizado para os fins da presente invenção. As formas de realização ilustrativas específicas são descritas em seguida.

Numa forma de realização, a "Kd" ou o "valor de Kd" de acordo com a presente invenção é medido por um ensaio de ligação de antigénio radiomarcado (RIA), realizado com a versão Fab de um anticorpo de interesse e o seu antigénio, tal como descrito pelo ensaio que se segue, que mede a afinidade de ligação em solução de Fab ao antigénio, equilibrando Fab com uma concentração mínima de antigénio marcado com (125I), na presença de uma série de titulação de antigénio não marcado, capturando depois o antigénio ligado com uma placa revestida com anticorpo anti-Fab (Chen, *et al.*, (1999) *J. Mol Biol* 293: 865-881). Para estabelecer as condições para o ensaio, as placas de microtitulação (Dynex) são revestidas durante a noite com 5 ug/ml de um anticorpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) em 50 mM de carbonato de sódio (pH 9,6), e subsequentemente são bloqueadas com 2% (p/v) de albumina de soro bovino em PBS durante duas a cinco horas à temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). Numa placa não adsorvente (Nunc n°. 269620), são misturados 100 pM ou 26 pM de antigénio-[125I] com diluições em série de um Fab de interesse (por exemplo, consistente com a avaliação de um anticorpo anti-VEGF, Fab-12, em Presta *et al.*, (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599). O Fab de interesse é então incubado durante a noite; no entanto, a incubação pode continuar por um período mais longo (por exemplo, 65 horas) para assegurar que o equilíbrio seja alcançado. Depois disso, as misturas são transferidas para a placa de captura para a incubação à temperatura ambiente (por exemplo, durante uma hora). A solução é então removida e a placa é lavada oito vezes com 0,1% de Tween-20 em PBS. Quando as placas tiverem secas, são adicionados 150 ul/poço de cintilante (MicroScint-20; Packard), e as placas são contadas num contador gama

Topcount (Packard) durante dez minutos. As concentrações de cada Fab que dão menos do que ou igual a 20% da ligação máxima são escolhidas para a utilização em ensaios de ligação competitivos. De acordo com uma outra forma de realização a K_d ou o valor de K_d é medido por meio de ensaios de ressonância de plasmon de superfície utilizando um BIAcore™-2000 ou um BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C com chips CM5 de antigénio imobilizado a ~10 unidades de resposta (UR). Resumidamente, os chips biossensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) são ativados com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. O antigénio é diluído com 10 mM de acetato de sódio, pH 4,8, para 5 ug/ml (~0,2 uM) antes da injeção a uma taxa de fluxo de 5 ul/minuto para atingir aproximadamente 10 unidades de resposta (UR) de proteína acoplada. Após a injeção de antigénio, é injetado 1 M de etanolamina para bloquear os grupos que não reagiram. Para as medições da cinética, são injetadas duas diluições em série de Fab (0,78 nM até 500 nM) em PBS com 0,05% de Tween 20 (PBST) a 25 °C com uma taxa de fluxo de aproximadamente 25 ul/min. As taxas de associação (k_{on}) e as taxas de dissociação (k_{off}) são calculadas usando um modelo de ligação simples de um para um de Langmuir (BIAcore Evaluation Software versão 3.2), por ajuste simultâneo do sensorgram da associação e dissociação. A constante de equilíbrio de dissociação (K_d) é calculada como o rácio de k_{off}/k_{on} . Veja-se, por exemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293: 865-881. Se a taxa "on" exceder 10^6 M⁻¹ S⁻¹ pelo ensaio de ressonância de plasmon de superfície anterior, então a taxa "on" pode ser determinada utilizando uma técnica de extinção de fluorescência que mede o aumento ou a diminuição da intensidade de emissão de fluorescência (excitação = 295 nm; emissão = 340 nm, 16 nm passagem de

banda), a 25 °C de 20 nM de um anticorpo antiantigénio (forma Fab) em PBS, pH 7,2, na presença de concentrações crescentes de antigénio tal como medido num espectrómetro, tal como um espectrofotómetro equipado com "stop-flow" (Aviv Instruments) ou um espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) com uma tina de agitação vermelha.

Uma "taxa-on" ou "taxa de associação" ou " k_{on} ", de acordo com esta invenção, pode também ser determinada com a mesma técnica de ressonância de plasmon de superfície descrita anteriormente, utilizando um BIAcore™-2000 ou um BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25C com chips CM5 de antigénio imobilizado a ~10 unidades de resposta (UR). Resumidamente, os chips biossensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) são ativados com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. O antigénio é diluído com 10 mM de acetato de sódio, pH 4,8, para 5 ug/ml (~0,2 uM) antes da injeção a uma taxa de fluxo de 5 ul/minuto para atingir aproximadamente 10 unidades de resposta (UR) de proteína acoplada. Após a injeção de antigénio, é injetado 1 M de etanolamina para bloquear os grupos que não reagiram. Para as medições da cinética, são injetadas duas diluições em série de Fab (0,78 nM até 500 nM) em PBS com 0,05% de Tween 20 (PBST) a 25 °C com uma taxa de fluxo de aproximadamente 25 ul/min. As taxas de associação (k_{on}) e as taxas de dissociação (k_{off}) são calculadas usando um modelo de ligação simples de um para um de Langmuir (BIAcore Evaluation Software versão 3.2), por ajuste simultâneo do sensorgram da associação e dissociação. A constante de equilíbrio de dissociação (K_d) é calculada como o rácio de k_{off}/k_{on} . Veja-se, por exemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293: 865-881. No entanto, se a taxa "on" exceder 106 M⁻¹ S⁻¹ pelo ensaio de ressonância de

plasmon de superfície anterior, então a taxa "on" é determinada de preferência utilizando uma técnica de extinção de fluorescência que mede o aumento ou a diminuição da intensidade de emissão de fluorescência (excitação = 295 nm; emissão = 340 nm, 16 nm passagem de banda), a 25 °C de 20 nM de um anticorpo antiantigénio (forma Fab) em PBS, pH 7,2, na presença de concentrações crescentes de antigénio tal como medido num espectrómetro, tal como um espectrofotómetro equipado com "stop-flow" (Aviv Instruments) ou um espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) com uma tina de agitação.

O termo "vetor", tal como é aqui utilizado, pretende referir-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a uma ansa de ADN de cadeia dupla circular à qual podem ser ligados segmentos de ADN adicionais. Outro tipo de vetor é um vetor de fago. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de ADN adicionais podem ser ligados no genoma viral. Determinados vetores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira na qual são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos que possuem uma origem de replicação bacteriana e vetores mamíferos episomais). Outros vetores (por exemplo, vetores de mamíferos não epissómicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira aquando da introdução na célula hospedeira, e assim são replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Para além disso, determinados vetores são capazes de dirigir a expressão de genes aos quais estão ligados operacionalmente. Estes vetores são aqui referidos como "vetores de expressão recombinantes" (ou simplesmente, "vetores recombinantes"). Em geral, os vetores de expressão com utilidade em técnicas de ADN recombinante estão muitas vezes na forma de plasmídeos. Na presente especificação, "plasmídeo" e "vetor" podem ser utilizados

indiferentemente, uma vez que o plasmídeo é a forma mais comumente utilizada de vetor.

"Polinucleótido" ou "ácido nucleico", tal como aqui utilizados indiferentemente, referem-se a polímeros de nucleótidos de qualquer comprimento e incluem ADN e ARN. Os nucleótidos podem ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados ou bases, e/ou os seus análogos, ou qualquer substrato que possa ser incorporado num polímero pela ADN ou ARN polimerase ou por uma reação de síntese. Um polinucleótido pode compreender nucleótidos modificados, tais como nucleótidos metilados e os seus análogos. Se presente, a modificação da estrutura nucleotídica pode ser transmitida antes ou após a montagem do polímero. A sequência de nucleótidos pode ser interrompida por componentes não nucleótidos. Um polinucleótido pode ser adicionalmente modificado após a síntese, tal como por conjugação com um marcador. Outros tipos de modificações incluem, por exemplo, "caps", substituição de um ou mais dos nucleótidos que ocorrem naturalmente por um análogo, modificações internucleótidos tais como, por exemplo, aqueles com ligações não carregadas (por exemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.), e com ligações carregadas (por exemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aqueles que contêm porções pendentes, tais como, por exemplo, proteínas (por exemplo, nucleases, toxinas, anticorpos, péptidos de sinal, ply-L-lisina, etc.), aqueles com intercaladores (por exemplo, acridina, psoraleno, etc.), aqueles que contêm quelantes (por exemplo, metais, metais radioativos, boro, metais oxidativos, etc.), aqueles que contêm alquiladores, aquelas com ligações modificadas (por exemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), assim como formas não modificadas do(s) polinucleótido(s). Para além disso, qualquer um dos grupos hidroxilo presentes normalmente nos açúcares pode ser substituído, por exemplo,

por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protetores padrão, ou ativados para preparar ligações adicionais aos nucleótidos adicionais, ou podem ser conjugados com suportes sólidos ou semissólidos. O OH do terminal 5' e 3' pode ser fosforilado ou substituído com aminas ou porções de grupos orgânicos de capeamento de desde 1 até 20 átomos de carbono. Podem também ser derivatizados outros hidroxilos para grupos de proteção padrão. Os polinucleótidos podem também conter formas análogas de açúcares ribose ou desoxirribose que são geralmente conhecidos na tecnologia, incluindo, por exemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- ou 2'-azido-ribose, análogos de açúcar carbocíclicos, açúcares alfa anoméricos, açúcares epiméricos tais como a arabinose, xiloses ou lixoses, açúcares piranose, açúcares furanose, sedoheptuloses, análogos acíclicos e análogos de nucleósidos básicos, tais como o metil-ribósido. Uma ou mais ligações fosfodiéster podem ser substituídas por grupos de ligação alternativos. Estes grupos de ligação alternativos incluem, mas não estão limitados a, formas de realização em que o fosfato é substituído por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR₂" ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO ou CH₂ ("formacetal"), em que cada R ou R' é independentemente H ou alquilo substituído ou não substituído (1-20 C), contendo opcionalmente uma ligação éter (-O-), arilo, alcenilo, cicloalquilo, cicloalcenilo ou araldilo. Nem todas as ligações num polinucleótido necessitam de ser idênticas. A descrição precedente aplica-se a todos os polinucleótidos aqui referidos, incluindo ARN e ADN.

"Oligonucleótido", tal como é aqui utilizado, refere-se geralmente a polinucleótidos curtos, geralmente de cadeia simples, geralmente sintéticos, que são geralmente, mas não necessariamente, menos do que cerca de 200 nucleótidos de comprimento. Os termos "oligonucleótido" e

"polinucleótido" não são mutuamente exclusivos. A descrição anterior para polinucleótido é igual e completamente aplicável a oligonucleótido.

A "percentagem (%)" de identidade de sequência de aminoácidos" em relação a uma sequência de péptido ou polipéptido é definida como a percentagem de resíduos de aminoácidos numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência de péptido ou de polipéptido específico, após o alinhamento das sequências e a introdução de hiatos, se necessário, para alcançar a percentagem máxima de identidade de sequência, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da sequência de identidade. O alinhamento para fins de determinação da percentagem de identidade de sequência de aminoácidos pode ser conseguido de vários modos que estão dentro da perícia na tecnologia, por exemplo, utilizando programas de computador disponíveis publicamente tais como os programas BLAST, BLAST-2, ALIGN ou o software Megalign (DNASTAR). Os peritos na especialidade podem determinar os parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para conseguir o alinhamento máximo ao longo do comprimento total das sequências a ser comparadas. Para os presentes fins, contudo, os valores de % de identidade de sequência de aminoácidos são gerados usando o programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2, em que o código fonte completo para o programa ALIGN-2 é proporcionado na tabela A que se segue. O programa de computador de comparação de sequência ALIGN-2 é da autoria de Genentech, Inc., e o código de fonte mostrado na tabela A em seguida foi apresentado com a documentação do usuário no Gabinete de Copyright dos EUA, Washington D.C., 20559, onde está registrado sob o Registro de Copyright U.S. nº. TXU510087. O programa ALIGN-2 está disponível publicamente através de Genentech, Inc., South San Francisco, Califórnia. O

programa ALIGN-2 deve ser compilado para o uso num sistema operacional UNIX, de preferência UNIX V4.0D digital. Todos os parâmetros de comparação de sequências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Em situações em que se emprega o ALIGN-2 para as comparações de sequências de aminoácidos, a % de identidade de sequência de aminoácido de uma determinada sequência de aminoácidos A a, com, ou contra uma dada sequência de aminoácidos B (que pode alternativamente ser fraseado como uma determinada sequência de aminoácidos A que tem ou compreende uma determinada % de identidade de sequência de aminoácidos a, com, ou contra uma determinada sequência de aminoácidos B) é calculada tal como se segue:

$$100 \text{ vezes a fração } X/Y$$

em que X é o número de resíduos de aminoácido pontuados como correspondências idênticas pelo programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 nesse alinhamento do programa de A e B, e em que Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Será apreciado que quando o comprimento da sequência de aminoácidos A não é igual ao comprimento da sequência de aminoácidos B, a % de identidade de sequência de aminoácidos de A para B não será igual à % de identidade de sequência de aminoácidos de B para A.

A menos que especificamente indicado em contrário, todos os valores de % de identidade da sequência de aminoácidos aqui utilizados são obtidos como descrito no parágrafo imediatamente a seguir usando o programa informático ALIGN-2.

O termo "EphB4" (indiferentemente denominado "EphB4R"), como aqui utilizado, refere-se, a menos que especificamente ou contextualmente indicado em contrário, a qualquer polipéptido de EphB4 nativo ou variante (quer nativo ou sintético). O termo "sequência nativa" engloba especificamente formas secretadas ou truncadas de

ocorrência natural (por exemplo, uma sequência de domínio extracelular), formas de variantes de ocorrência natural (por exemplo, formas unidas alternativamente) e variantes alélicas de ocorrência natural. O termo "EphB4 tipo selvagem" geralmente refere-se a um polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos de uma proteína EphB4 de ocorrência natural. O termo "sequência de EphB4 tipo selvagem" geralmente refere-se a uma sequência de aminoácidos encontrada numa EphB4 de ocorrência natural.

Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" são indiferentemente utilizados no sentido mais amplo e incluem anticorpos monoclonais (por exemplo, anticorpos monoclonais de comprimento completo ou intactos), anticorpos policlonais, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos desde que exibem a atividade biológica desejada) e podem também incluir determinados fragmentos de anticorpos (como aqui descrito em maior detalhe). Um anticorpo pode ser humano, humanizado e/ou de afinidade maturada.

O termo "variável" refere-se ao facto de que determinadas porções dos domínios variáveis diferem extensivamente na sequência entre anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para o seu antigénio particular. No entanto, a variabilidade não está uniformemente distribuída ao longo dos domínios variáveis de anticorpos. Está concentrada em três segmentos chamados regiões determinantes de complementaridade (CDRs) ou regiões hipervariáveis tanto nos domínios variáveis das cadeias leves como nos das cadeias pesadas. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são chamadas de estruturais (FR). Os domínios variáveis das cadeias nativas pesadas e leves compreendem, cada, quatro regiões FR, adotando largamente uma configuração de folha β , conectadas por três CDRs, que formam ansas conectando com, e em alguns casos formando

parte de, a estrutura de folha β . As CDRs em cada cadeia são mantidas juntas em estreita proximidade pelas regiões FR e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação de anticorpos aos antígenos (ver Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetoras, tais como a participação do anticorpo na toxicidade celular dependente de anticorpos.

A digestão de anticorpos com papaína produz dois fragmentos de ligação ao antígeno idênticos, chamados fragmentos "Fab", cada com um sítio de ligação ao antígeno único, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete a sua capacidade para cristalizar rapidamente. O tratamento com pepsina produz um fragmento $F(ab')_2$ que tem dois sítios de ligação ao antígeno e é ainda capaz de ligação cruzada com o antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de reconhecimento do e ligação ao antígeno completo. Em espécies de Fv de duas cadeias, esta região consiste num dímero de domínio variável de uma cadeia pesada e uma cadeia leve em estreita associação não covalente. Em espécies de Fv de cadeia única, um domínio variável de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve pode ser covalentemente ligado por um linker peptídico flexível, tal como as cadeias leves e pesadas podem associar-se numa estrutura "dimérica" análoga àquela nas espécies de Fv de duas cadeias. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação ao antígeno na superfície do dímero VH-VL. Coletivamente, as seis CDRs conferem ao anticorpo especificidade de ligação ao antígeno. No entanto, mesmo um domínio variável único (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs

específicas para um antigénio) tem a capacidade de reconhecer e ligar-se a um antigénio, embora numa menor afinidade que o sítio de ligação inteiro.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante da (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos na terminação carboxi do domínio CH1 da cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de charneira do anticorpo. Fab'-SH é a designação no presente documento para Fab' no qual o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes possuem um grupo tiol livre. Os fragmentos F(ab')₂ dos anticorpos originalmente foram produzidos como pares de fragmentos Fab' que têm cisteínas da charneira entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos são também conhecidos.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de quaisquer espécies de vertebrados podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, chamados kapa (k) e lambda (λ), baseados nas sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias dessas podem ser ainda divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Os domínios constantes das cadeias pesadas que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são chamados α, β, ε, γ, e μ, respetivamente. As estruturas da subunidade e as configurações tridimensionais das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

"Fragmentos de anticorpos" compreendem apenas uma porção de um anticorpo intacto, em que a porção mantém preferivelmente pelo menos uma, preferivelmente a maioria

ou todas, das funções normalmente associadas a essa porção quando presente num anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpos de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos. Numa forma de realização, um fragmento de anticorpo compreende um sítio de ligação ao antigénio do anticorpo intacto e mantém assim a capacidade para ligar-se ao antigénio. Numa outra forma de realização, um fragmento de anticorpo, por exemplo um que compreenda a região Fc, mantém pelo menos uma das funções biológicas normalmente associadas à região Fc quando presente no anticorpo intacto, tal como ligação a FcRn, modulação da semivida do anticorpo, função ADCC e ligação ao complemento. Numa forma de realização, um fragmento de anticorpo é um anticorpo monovalente que tem uma semivida *in vivo* substancialmente parecida à de um anticorpo intacto. Por exemplo, um tal fragmento de anticorpo pode compreender no braço de ligação ao antigénio ligado uma sequência de Fc capaz de conferir estabilidade *in vivo* ao fragmento.

O termo "região hipervariável", "HVR", ou "HV", quando aqui utilizado, refere-se às regiões de um domínio variável do anticorpo que são hipervariáveis em sequência e/ou formam ansas estruturalmente definidas. Geralmente, os anticorpos compreendem seis regiões hipervariáveis; três no VH (H1, H2, H3), e três no VL (L1, L2, L3). Uma série de delineações das regiões hipervariáveis estão em utilização e são aqui englobadas. As regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de Kabat estão baseadas na variabilidade da sequência e são as mais comumente utilizadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia refere-se, pelo contrário, à localização das ansas

estruturais (Chothia e Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). As regiões hipervariáveis de AcM representam um compromisso entre as CDRs de Kabat e as ansas estruturais de Chothia, e são usadas pelo *software* de modelação de anticorpos AcM da Oxford Molecular. As regiões hipervariáveis de "contacto" são baseadas numa análise das estruturas de cristais complexas disponíveis. Os resíduos de cada uma destas regiões hipervariáveis são indicados abaixo.

Ansa	Kabat	AcM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
		(Numeração de Kabat)		
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
		(Numeração de Chothia)		
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

As regiões hipervariáveis podem compreender "regiões hipervariáveis estendidas" como segue: 24-36 ou 24-34 (L1), 46-56 ou 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no VL e 26-35 (H1), 50-65 ou 49-65 (H2) e 93-102, 94-102 ou 95-102 (H3) no VH. Os resíduos do domínio variável são numerados de acordo com Kabat *et al.*, *supra* para cada uma dessas definições.

Resíduos "estruturais" ou "FR" são aqueles resíduos do domínio variável que não os resíduos da região hipervariável como aqui definido.

Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, de murino) são anticorpos quiméricos que contém uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Para a maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) nas quais resíduos de uma região hipervariável do recipiente são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho,

ratazana, coelho ou primata não humano que tem a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região estrutural (FR) de uma imunoglobulina são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente nem no anticorpo dador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as ansas hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs são aquelas de uma sequência de uma imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado, opcionalmente, também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) de uma imunoglobulina, tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, veja-se Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)). Veja-se também os seguintes artigos de revisão e referências aqui citados: Vaswani e Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle e Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)).

Anticorpos (imunoglobulinas) "quiméricos" têm uma porção da cadeia pesada e/ou da cadeia leve idêntica a ou homóloga de sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencentes a uma classe ou subclasse de anticorpos particular, enquanto o resto da(s) cadeia(s) é idêntico a ou homólogo de sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma outra espécie ou pertencentes a uma outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos de tais

anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (Patente U.S. N.º 4.816.567; e Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Um anticorpo humanizado como aqui utilizados é um subconjunto de anticorpos quiméricos.

Fragments de anticorpos "Fv de cadeia simples" ou "scFv" compreendem os domínios VH e VL de um anticorpo, em que estes domínios estão presentes numa cadeia polipeptídica simples. Geralmente, o polipéptido de scFv compreende ainda um linker polipeptídico entre os domínios VH e VL que possibilita que o scFv forme a estrutura desejada para ligação ao antigénio. Para uma revisão de scFv veja-se Pluckthun, em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nova York, pp. 269-315 (1994).

Um "antigénio" é um antigénio predeterminado ao qual um anticorpo pode ligar-se seletivamente. O antigénio alvo pode ser um composto polipeptídico, de carboidratos, de ácido nucleico, lipídico, de hapteno ou outro de ocorrência natural ou sintético. Preferivelmente, o antigénio alvo é um polipéptido.

O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpos com dois sítios de ligação ao antigénio, fragmentos os quais compreendem um domínio da cadeia pesada (VH) conectado a um domínio da cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (VH-VL). Utilizando um linker que é bastante curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de uma outra cadeia e criam-se dois sítios de ligação ao antigénio. Diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, nos documentos EP 404.097; WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Um "anticorpo humano" é um que possui uma sequência de aminoácidos a qual corresponde à de um anticorpo produzido

por um ser humano e/ou que tenha sido produzido usando qualquer das técnicas para produzir anticorpos humanos como aqui divulgados. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado compreendendo resíduos de ligação ao antigénio não humanos.

Um anticorpo de "afinidade maturada" é um com uma ou mais alterações em uma ou mais CDRs do mesmo, as quais resultam numa melhoria na afinidade do anticorpo para o antigénio, em comparação com um anticorpo de origem que não possui aquela(s) alteração(ões). Os anticorpos de afinidade maturada preferidos terão afinidades nanomolares ou mesmo picomolares para o antigénio alvo. Os anticorpos de afinidade maturadas são produzidos por procedimentos conhecidos a técnica. Marks *et al.* Bio/Technology 10:779-783 (1992) descreve a maturação da afinidade por rearranjo dos domínios VH e VL. A mutagénese aleatória de uma CDR e/ou resíduos estruturais é descrita por: Barbas *et al.* Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* Gene 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); e Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)).

"Funções efetoras" de anticorpos referem-se àquelas atividades biológicas atribuíveis à região Fc (região Fc de sequência nativa ou região Fc variante de sequência de aminoácidos) de um anticorpo, e variam com o isotipo de anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpos incluem: ligação de Clq e citotoxicidade dependente do complemento; ligação a recetores de Fc; citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC); fagocitose; subregulação de recetores da superfície celular (por exemplo, recetor de células B); e ativação de células B.

"Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos" ou "ADCC" refere-se a uma forma de

citotoxicidade na qual uma Ig secretada ligada a recetores de FC (FcRs) presentes em determinadas células citotóxicas (por exemplo, células *Natural Killer* (NK), neutrófilos e macrófagos) possibilitam que estas células efetoras citotóxicas se liguem especificamente a uma célula alvo portadora de antigénio e subseqüentemente matem a célula alvo com citotoxinas. Os anticorpos "armam" as células citotóxicas e são absolutamente necessários para tal morte. As principais células para mediar a ADCC, células NK, expressam apenas Fc γ RIII, ao passo que os monócitos expressam Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII. A expressão de FcR em células hematopoiéticas é sumariada na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para avaliar a atividade ADCC de uma molécula de interesse, um ensaio de ADCC *in vitro*, tal como aquele descrito na Patente U.S. N.º 5.500.362 ou 5.821.337 ou Patente U.S. de Presta N.º 6.737.056 pode ser realizado. As células efetoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células *Natural Killer* (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade ADCC de uma molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, num modelo animal tal como aquele divulgado em Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Células efetoras humanas" são leucócitos que expressam um ou mais FcRs e realizam funções efetoras. Preferivelmente, as células expressam pelo menos Fc γ RIII e realizam a função efetora de ADCC. Os exemplos de leucócitos humanos que medeiam a ADCC incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC), células *Natural Killer* (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; com as PBMCs e células NK sendo preferidas. As células efetoras podem ser isoladas de uma fonte nativa, por exemplo, do sangue.

"Recetor de Fc" ou "FcR" descreve um recetor que se

liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR preferido é um que se ligue a um anticorpo IgG (um recetor gama) e inclui recetores das subclasses FcγRI, FcγRII, e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e, alternativamente, formas unidas destes recetores. Os recetores FcγRII incluem FcγRIIA (um "recetor de ativação") e FcγRIIB (um "recetor de inibição"), que têm sequências de aminoácidos semelhantes que diferem principalmente nos domínios citoplasmáticos destes. O recetor de ativação FcγRIIA contém um motivo de ativação do imunorrecetor baseado em tirosina (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O recetor de ativação FcγRIIB contém um motivo de inibição do imunorrecetor baseado em tirosina (ITAM) no seu domínio citoplasmático. (ver a revisão M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Os FcRs são revistos em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); e de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são aqui englobados pelo termo "FcR". O termo também inclui o recetor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de material de IgGs ao feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) e regula a homeostase de imunoglobulinas. O documento WO 00/42072 (Presta) descreve variantes de anticorpos com ligação melhorada ou diminuída a FcRs. Veja-se, também, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

Os métodos de medição da ligação a FcRn são conhecidos (veja-se, por exemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). A ligação *in vivo* a FcRn humano e a semivida sérica de polipeptidos que se ligam com alta afinidade a FcRn humano podem ser avaliadas, por exemplo, em ratinhos transgênicos ou linhas celulares humanas transfetadas expressando FcRn humano, ou

em primatas administrados com os polipéptidos das variantes de Fc.

"Citotoxicidade dependente do complemento" ou "CDC" refere-se à lise de uma célula alvo na presença de complemento. A ativação da via do complemento clássica é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema do complemento (C1q) a anticorpos (da subclasse apropriada) que estão ligados ao seu antigénio cognato. Para avaliar a ativação do complemento, um ensaio de CDC, por exemplo, como descrito em Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), pode ser realizado.

As variantes polipeptídicas com sequências de aminoácidos das regiões Fc alteradas e capacidade de ligação de C1q aumentada ou diminuída são descritas na patente U.S. N.º 6.194.551B1 e no documento WO 99/51642. Veja-se, também, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000)).

O termo "polipéptido compreendendo uma região Fc" refere-se a um polipéptido, tal como um anticorpo ou imunoadesina (ver definições abaixo), que compreende uma região Fc. A lisina C-terminal (resíduo 447 de acordo com o sistema de numeração EU) da região Fc pode ser removida, por exemplo, durante a purificação do polipéptido ou por engenharia genética recombinante do ácido nucleico que codifica o polipéptido. Consequentemente, uma composição compreendendo um polipéptido que tem uma região Fc de acordo com esta invenção pode compreender polipéptidos com K447, com todo o K447 removido, ou uma mistura de polipéptidos com e sem o resíduo K447.

Um anticorpo "de bloqueio" ou um anticorpo "antagonista" é um que inibe ou reduz a atividade biológica do antigénio a que se liga. Os anticorpos de bloqueio ou anticorpos antagonistas preferidos inibem substancialmente ou completamente a atividade biológica do antigénio.

Um "anticorpo agonista", como aqui utilizado, é um

anticorpo que imita pelo menos uma das atividades funcionais de um polipéptido de interesse.

Uma "estrutura aceitadora humana" para os propósitos do presente documento é uma estrutura que compreende a sequência de aminoácidos de uma estrutura do VL ou VH derivada de uma estrutura de imunoglobulina humana, ou de uma estrutura de consenso humana. Uma estrutura aceitadora humana "derivada de" uma estrutura de imunoglobulina humana ou estrutura de consenso humana pode compreender a sequência de aminoácidos destas, ou pode conter alterações na sequência de aminoácidos pré-existente. Onde estão presentes alterações de aminoácidos pré-existentes, preferivelmente não mais que 5 e preferivelmente 4 ou menos, ou 3 ou menos, alterações de aminoácidos pré-existentes estão presentes. Onde estão presentes alterações de aminoácidos pré-existentes num VH, preferivelmente aquelas alterações estão apenas em três, duas ou uma das posições 71H, 73H e 78H; por exemplo, os resíduos de aminoácidos nessas posições podem ser 71A, 73T e/ou 78A. Numa forma de realização, a estrutura aceitadora humana num VL é idêntica em sequência à sequência da estrutura de imunoglobulina humana num VL ou à sequência da estrutura de consenso humana.

Uma "estrutura de consenso humana" é uma estrutura que representa o resíduo de aminoácido que ocorre mais comumente numa seleção de sequências de estruturas do VL ou VH de imunoglobulinas humanas. Geralmente, a seleção de sequências de VL ou VH de imunoglobulinas humanas é a partir de um subgrupo de sequências de domínios variáveis. Geralmente, o subgrupo de sequências é um subgrupo como em Kabat *et al.* Numa forma de realização, para o VL, o subgrupo é o subgrupo kapa I como em Kabat *et al.* Numa forma de realização, para o VH, o subgrupo é o subgrupo III como em Kabat *et al.*

Uma "estrutura de consenso do subgrupo III para um VH"

compreende a sequência de consenso obtida a partir das sequências de aminoácidos no subgrupo III de um variável pesado de Kabat *et al.* Numa forma de realização, a sequência de aminoácidos da estrutura de consenso do subgrupo III de um VH compreende pelo menos uma porção ou todas de cada das seguintes sequências: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:42)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:43)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:44)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45).

Uma "estrutura de consenso do subgrupo III para um VH" compreende a sequência de consenso obtida a partir das sequências de aminoácidos no subgrupo III para um variável pesado de Kabat *et al.* Numa forma de realização, a sequência de aminoácidos da estrutura de consenso do subgrupo I de um VH compreende pelo menos uma porção ou todas de cada das seguintes sequências: DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (SEQ ID NO:46)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:47)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:48)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:49).

Um "distúrbio" ou "doença" é qualquer condição que beneficiaria de tratamento com uma substância/molécula ou método da invenção. Isto inclui distúrbios ou doenças crônicos e agudos incluindo aquelas condições patológicas que predisõem o mamífero ao distúrbio em questão. Os exemplos não limitantes de distúrbios a serem aqui tratados incluem tumores malignos e benignos; carcinoma, blastoma e sarcoma.

Os termos "distúrbio proliferativo celular" e "distúrbio proliferativo" referem-se a distúrbios que estão associados a algum grau de proliferação celular anormal. Numa forma de realização, o distúrbio proliferativo celular é cancro.

"Tumor", como aqui utilizado, refere-se a todo o crescimento e proliferação celular neoplásticos, quer maligno quer benigno, e a todas as células e tecidos pré-

cancerosos e cancerosos. Os termos "cancro", "canceroso", "distúrbio proliferativo celular", "distúrbio proliferativo" e "tumor" não são mutuamente exclusivos, como aqui referido.

Os termos "cancro" e "canceroso" referem-se ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por proliferação/crescimento celular não regulado. Os exemplos de cancro incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais particulares de tais cancros incluem cancro de células escamosas, cancro de pulmão de células pequenas, cancro do pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão, carcinoma escamoso do pulmão, cancro do peritoneu, cancro hepatocelular, cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro cervical, cancro do ovário, cancro hepático, cancro da bexiga, hepatoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma das glândulas salivares, cancro renal, cancro hepático, cancro protático, cancro da vulva, cancro da tiróide, carcinoma hepático, cancro gástrico, melanoma, e vários tipos de cancro da cabeça e pescoço. A desregulação da angiogénese pode levar a muitos distúrbios que podem ser tratados por composições e métodos da invenção. Estes distúrbios incluem tanto condições não neoplásticas como neoplásticas. As neoplásticas incluem, mas não estão limitadas àquelas descritas acima. Os distúrbios não neoplásticos incluem, mas não estão limitados a, hipertrofia não desejada ou aberrante, artrite, artrite reumatóide (RA), psoríase, placas psoriásicas, sarcoidose, aterosclerose, placas de aterosclerose,, retinopatias proliferativas diabéticas ou outras incluindo retinopatia da prematuridade, fibroplasia retrolenticular, glaucoma neovascular, degeneração macular relacionada com a idade, edema macular diabético, neovascularização corneal, neovascularização em

transplantes de córnea, rejeição de transplantes de córnea, neovascularização retiniana/coroidal, neovascularização do ângulo (rubeose), doença neovascular ocular, reestenose vascular, malformações arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias da tiróide (incluindo doença de Grave), transplantação de tecido da córnea e outros, inflamação crónica, inflamação pulmonar, lesão pulmonar aguda/ARDS, sépsis, hipertensão pulmonar primária, derrames pulmonares malignos, edema cerebral (por exemplo, associado a acidente vascular cerebral agudo/lesão craniana fechada/trauma), inflamação sinovial, formação de *pannus* na RA, miosite ossificante, formação óssea hipertrófica, osteoartrite (OA), ascite refratária, doença do ovário poliquístico, endometriose, doenças do fluído do terceiro compartimento (pancreatite, síndrome compartimental, queimaduras, doença intestinal), miomas uterinos, parto prematuro, inflamação crónica tal como IBD (doença de Crohn e colite ulcerativa), rejeição de aloenxertos renais, doença inflamatória do intestino, síndrome nefrótica, crescimento de massas de tecido não desejadas ou aberrantes (não cancro), articulações hemofílicas, cicatrizes hipertróficas, inibição do crescimento capilar, síndrome de Osler-Weber, fibroplasias retrolenticulares por granuloma piogénico, esclerodermia, tracoma, adesões vasculares, sinovite, dermatite, pré-eclâmpsia, ascite, derrame pericardíaco (tal como aquele associado a pericardite), e derrame pleural.

Como aqui utilizado, "tratamento" refere-se a uma intervenção clínica numa tentativa de alterar o curso natural do indivíduo ou célula a ser tratado, e pode ser realizado ou para profilaxia ou durante o curso da patologia clínica. Os efeitos desejáveis de um tratamento incluem prevenir a ocorrência ou recorrência de uma doença, alívio de sintomas, diminuição de qualquer consequência patológica direta ou indireta da doença, prevenir

metástases, diminuir a taxa de progressão da doença, melhoria ou palição do estado da doença, e remissão ou melhoria do prognóstico. Em algumas formas de realização, os anticorpos da invenção são usados para retardar o desenvolvimento de uma doença ou distúrbio.

Os termos "doença neurodegenerativa" e "distúrbio neurodegenerativo" são usados no sentido mais lato para incluir todos os distúrbios patológicos que envolvem degeneração e/ou disfunção neuronal, incluindo, sem limitação, neuropatias periféricas; distúrbios do neurónio motor, tais como esclerose lateral amiotrófica (ELA, doença de Lou Gehrig), paralisia de Bell, e várias condições envolvendo atrofia ou paralisia muscular espinal; e outras doenças neurodegenerativas humanas, tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, esclerose múltipla, coreia de Huntington, síndrome de Down, surdez nervosa, e doença de Meniere.

"Neuropatia periférica" é um distúrbio neurodegenerativo que afeta os nervos periféricos, mais frequentemente manifestada como uma disfunção ou uma combinação de disfunções motoras, sensoriais, sensorimotoras ou autonómicas. As neuropatias periféricas podem, por exemplo, ser geneticamente adquiridas, podem resultar de uma doença sistémica, ou podem ser induzidas por um agente tóxico, tal como um fármaco neurotóxico, por exemplo, agente antineoplástico, ou poluente industrial ou ambiental. "Neuropatia sensorial periférica" é caracterizada pela degeneração de neurónios sensoriais periféricos, que pode ser idiopática, pode ocorrer, por exemplo, como uma consequência de diabetes (neuropatia diabética), terapia com fármacos citostáticos em cancro (por exemplo, tratamento com agentes quimioterapêuticos tais como vincristina, cisplatina, metotrexato, 3'-azido-3'-desoxitimidina, ou taxanos, por exemplo paclitaxel [TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.] e

doxetaxel [TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França]), alcoolismo, síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), ou predisposição genética. As neuropatias periféricas geneticamente adquiridas incluem, por exemplo, doença de Refsum, doença de Krabbe, leucodistrofia metacromática, doença de Fabry, síndrome de Dejerine-Sottas, abetalipoproteinemia, e doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (também conhecida como atrofia muscular peroneal ou neuropatia motora e sensorial hereditária (HMSN)). A maioria dos tipos de neuropatia periférica desenvolvem-se lentamente, no decurso de vários meses ou anos. Na prática clínica tais neuropatias são chamadas crônicas. Por vezes uma neuropatia periférica desenvolve-se rapidamente, no decurso de alguns dias, e é referida como aguda. Uma neuropatia periférica normalmente afeta nervos sensoriais e motores em conjunto de modo a provocar uma neuropatia sensorial e motora mista, mas neuropatias sensoriais e motoras puras são também conhecidas.

Um "indivíduo" é um vertebrado, preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um ser humano. Os mamíferos incluem, mas não estão limitados a, animais pecuários, (tal como vacas), animais de desporto, animais de companhia (tais como gatos, cães e cavalos), primatas, ratinhos e ratazanas.

"Mamífero" para os propósitos do tratamento refere-se a qualquer animal classificado com um mamífero, incluindo seres humanos, animais domésticos e pecuários, e animais de zoo, desporto ou de companhia, tais como cães, cavalos, gatos, vacas, etc. Preferivelmente, o mamífero é um ser humano.

Uma "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens ou por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado terapêutico ou profilático desejado.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de uma

substância/molécula da invenção, agonista ou antagonista, pode variar de acordo com fatores tais como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade da substância/molécula, agonista ou antagonista, para desencadear uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também uma na qual quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais da substância/molécula, agonista ou antagonista, são compensados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens ou por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente, mas não necessariamente, uma vez que uma dose profilática é utilizada em sujeitos antes de ou numa fase precoce de uma doença, a quantidade profilaticamente eficaz será inferior à quantidade terapeuticamente eficaz.

O termo "agente citotóxico" como aqui utilizado refere-se a uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou provoca a destruição de células. O termo pretende incluir isótopos radioativos (por exemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterapêuticos, por exemplo, metotrexato, adriamicina, alcalóides vinca (vincristina, vinblastina, etoposido), doxorubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina ou outros agentes de intercalantes, enzimas e fragmentos destas tais como enzimas nucleolíticas, antibióticos, e toxinas tais como toxinas de moléculas pequenas ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes destes, e os vários agentes anti-tumorais ou anti-cancerígenos divulgados abaixo. Outros agentes citotóxicos são descritos abaixo. Um agente tumoricida provoca destruição de células tumorais.

Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento de cancro. Os exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes tais como tiotepa e ciclosfosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopoletina, e 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo os seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de azoto tais como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mustarda de uracilo; nitrosoureias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, e ranimustina; antibióticos tais como os antibióticos de enedina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama 1I e caliqueamicina ómega 1I (veja-se, por exemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluindo dinemicina A; uma esperamicina; bem como cromóforo neocarzinostatina e cromóforos cromoproteínas de antibióticos de enedina

relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tais como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tais como metotrexato e 5-fluorouracilo (5-FU); análogos do ácido fólico tais como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; androgénios tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenais tais como aminoglutetimid, mitotano, trilostano; repositores de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinina; uma epotilona; etoglúcido; nitrato de gálio; hidroxíureia; lentinano; lonidainina; maitansinóides tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguanina; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complexo polissacárido PSK®(JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rhizoxina; sizofirano; espirogermânio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina;

tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxóides, por exemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ livre de Cremophor, formulação de paclitaxel em nanopartículas de albuminas manipuladas geneticamente (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), e doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina (VELBAN®); platina; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatina; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inibidor da topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinóides tais como ácido retinóico; capecitabina (XELODA®); sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer dos acima; bem como combinações de dois ou mais dos acima tais como CHOP, uma abreviatura para uma terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, e prednisolona, e FOLFOX, uma abreviatura para um regime de tratamento com oxaliplatina (ELOXATIN™) combinado com 5-FU e leucovovina.

Também incluídos nesta definição estão agentes anti-hormonais que atuam para regular, reduzir, bloquear ou inibir os efeitos de hormonas que podem promover o crescimento de cancro, e estão frequentemente na forma de tratamento sistémico, ou por todo o corpo. Estes podem ser, eles próprios, hormonas. Os exemplos incluem anti-estrogénios e moduladores seletivos do recetor de estrogénios (SERMs), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno,

LY117018, onapristona, e toremifeno FARESTON®; anti-progesteronas; subreguladores do recetor de estrogénio (ERDs); agentes que funcionam para suprimir ou inativar os ovários, por exemplo, hormona de libertação da hormona luteinizante (LHRH) agonistas tais como acetato de leuprolina LUPRON® e ELIGARD®, acetato de goserrelina, acetato de busserrelina e tripterreline; outros anti-androgénios tais como flutamida, nilutamida e bicalutamida; e inibidores da aromatase que inibem a enzima aromatase, que regula a produção de estrogénio nas glândulas adrenais, tais como, por exemplo, 4(5)-imidazóis, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, e anastrozol ARIMIDEX®. Em adição, tal definição de agentes quimioterapêuticos inclui bisfosfonatos tais como clodronato (por exemplo, BONEFOS® ou OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID®, ou risendronato ACTONEL®; bem como troxacitabina (um análogo do 1,3-dioxolano do nucleósido de cilosina); oligonucleótidos anti-sentido, particularmente aqueles que inibem a expressão de genes em vias de sinalização implicadas na proliferação celular aberrante, tais como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, e recetor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R); vacinas tais como vacina THERATOPE® e vacinas de terapia génica, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN®, e vacina VAXID®; inibidor da topoisomerase 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditossilato de lapatinib (um inibidor duplo de baixa massa molecular das tirosinas cinases ErbB-2 e EGFR também conhecido como GW572016); e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer dos acima.

Um "agente de inibição do crescimento" quando aqui utilizado refere-se a um composto ou composição que inibe o crescimento de uma célula (tal como uma célula expressando

EphB4) quer *in vitro* quer *in vivo*. Assim, o agente de inibição do crescimento pode ser um que reduza significativamente a percentagem de células (tal como uma célula expressando EphB4) na fase S. Exemplos de agentes de inibição do crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (num local diferente da fase S), tal com agentes que induzem a detenção em G1 e detenção na fase M. Os bloqueadores da fase M clássicos incluem os vincas (vincristina e vinblastina), taxanos, e inibidores da topoisomerase II, tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposido, e bleomicina. Aqueles agentes que detêm G1 também se alastram para a detenção da fase S, por exemplo, agentes alquilantes de ADN tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo, e ara-C. Informação adicional pode ser encontrada em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadélfia, 1995), especialmente pág. 13. Os taxanos (paclitaxel e docetaxel) são fármacos anti-cancerígenos, ambos derivados do teixo. O docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado do teixo, é um análogo semissintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). O paclitaxel e docetaxel promovem a montagem de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina e estabilizam os microtúbulos prevenindo a despolimerização, que resulta na inibição da mitose em células.

"Doxorubicina" é um antibiótico de antraciclinas. O nome químico completo de doxorubicina é (8*S*-*cis*)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

O termo "composição anti-neoplástica" refere-se a uma composição útil no tratamento de cancro que compreende pelo

menos um agente terapêutico ativo, por exemplo, "agente anti-cancerígeno". Exemplos de agentes terapêuticos (agentes anti-cancerígenos, aqui também denominados "agente anti-neoplástico") incluem, mas não estão limitados a, por exemplo, agentes quimioterapêuticos, agentes citotóxicos, agentes usados em terapia de radiação, agentes anti-angiogênese, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina, toxinas, e outros agentes para tratar cancro, por exemplo, anticorpo neutralizante anti-VEGF, antagonista de VEGF, anti-HER-2, anti-CD20, um antagonista do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (por exemplo, um inibidor da tirosina cinase), inibidor HER1/EGFR, erlotinib, um inibidor da COX-2 (por exemplo, celecoxib), interferões, citoquinas, antagonistas (por exemplo, anticorpos neutralizantes) que se ligam a um ou mais dos recetores de ErbB2, ErbB3, ErbB4, ou VEGF, inibidores para tirosina cinases do recetor para o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e/ou fator de células-tronco (SCF) (por exemplo, mesilato de imatinib (Gleevec® Novartis)), TRAIL/Apo2, e outros agentes químicos bioativos e orgânicos, etc.

O termo "pró-fármaco" como utilizado neste pedido refere-se a uma forma de precursor ou derivado de uma substância farmacologicamente ativa que é menos citotóxica para células tumorais em comparação com o fármaco de origem e é capaz de ser enzimaticamente ativada ou convertida na forma de origem mais ativa. Veja-se, por exemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) e Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Os pró-fármacos desta invenção incluem, mas não estão limitados a, pró-fármacos contendo fosfato, pró-fármacos contendo tiofosfato, pró-fármacos contendo sulfato, pró-fármacos

contendo péptidos, pró-fármacos modificados com D-aminoácido, pró-fármacos glicosilados, pró-fármacos contendo beta-lactamas, pró-fármacos contendo fenoxiacetamida opcionalmente substituída ou pró-fármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituída, 5-fluorocitosina e outros pró-fármacos de 5-fluorouridina que podem ser convertidos nos fármacos livres de citotóxicos mais ativos. Os exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivados numa forma de pró-fármaco para utilização nesta invenção incluem, mas não estão limitados a, aqueles agentes quimioterapêuticos descritos acima.

Um "agente anti-angiogénese" ou "inibidor da angiogénese" refere-se a uma substância de baixa massa molecular, um polinucleótido, um polipéptido, uma proteína isolada, uma proteína recombinante, um anticorpo, ou proteínas conjugadas ou de fusão destes, que inibe a angiogénese, vasculogénese, ou permeabilidade vascular indesejável, quer direta quer indiretamente. Por exemplo, um agente anti-angiogénese é um anticorpo ou outro antagonista contra um agente angiogénico como definido acima, por exemplo, anticorpos contra VEGF, anticorpos contra recetores de VEGF, moléculas pequenas que bloqueiam a sinalização do recetor de VEGF (por exemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT/SU11248 (sunitinib malato), AMG706). Os agentes anti-angiogénese incluem também inibidores da angiogénese nativos, por exemplo, angiostatina, endostatina, etc. Veja-se, por exemplo, Klagsbrun e D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit e Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por exemplo, Tabela 3 que lista a terapia anti-angiogénica em melanoma maligno); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por exemplo, Tabela 2 que lista fatores anti-angiogénicos); e, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (por exemplo, a Tabela 1 lista agentes anti-

angiogênicos utilizados em ensaios clínicos).

Composições da invenção e métodos de fazer as mesmas

Esta invenção engloba composições, incluindo composições farmacêuticas, compreendendo um anticorpo anti-EphB4; e polinucleótidos compreendendo sequências que codificam um anticorpo anti-EphB4. Como aqui utilizado, as composições compreendem um ou mais anticorpos que se ligam a EphB4, e/ou um ou mais polinucleótidos que compreendem sequências que codificam um ou mais anticorpos que se ligam a EphB4. Estas composições podem compreender ainda veículos adequados, tais como excipientes farmacêuticamente aceitáveis incluindo tampões, que são bem conhecidos na técnica.

A invenção engloba também formas de realização de anticorpos e polinucleótidos isolados. A invenção engloba também formas de realização de anticorpos e polinucleótidos substancialmente puros.

Os anticorpos anti-EphB4 da invenção são preferivelmente monoclonais. Também englobados dentro do âmbito da invenção estão os fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH e F(ab')₂ dos anticorpos anti-EphB4 aqui proporcionados. Estes fragmentos de anticorpos podem ser criados por meios tradicionais, tais como digestão enzimática, ou podem ser gerados por técnicas recombinantes. Tais fragmentos de anticorpos podem ser quiméricos ou humanizados. Estes fragmentos são úteis para os propósitos de diagnóstico e terapêutica estabelecidos abaixo.

Anticorpos monoclonais são obtidos a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais que compreende a população são idênticos exceto para possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em menores quantidades. Assim, o modificador "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos discretos.

Os anticorpos monoclonais anti-EphB4 da invenção podem ser feitos usando o método do hibridoma primeiro descrito por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), ou podem ser feitos por métodos de ADN recombinante (Patente U.S. N.º 4.816.567).

No método do hibridoma, um ratinho ou outro animal hospedeiro, tal como um hamster, é imunizado para induzir linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente à proteína usada para imunização. Os anticorpos contra EphB4 são geralmente criados em animais através de múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoniais (ip) de EphB4 e um adjuvante. EphB4 pode ser preparado usando métodos bem conhecidos na técnica, alguns dos quais são ainda aqui descritos. Por exemplo, a produção recombinante de EphB4 é descrita abaixo. Numa forma de realização, animais são imunizados com um derivado de EphB4 que contém o domínio extracelular (ECD) de EphB4 fusionado à porção Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Numa forma de realização preferida, animais são imunizados com uma proteína de fusão EphB4-IgG1. Os animais são vulgarmente imunizados contra conjugados ou derivados imunogénicos de EphB4 com lípido A monofosforilo (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) e a solução é injetada por via intradérmica em múltiplos locais. Duas semanas mais tarde os animais recebem um reforço. 7 a 14 dias mais tarde os animais são sangrados e o soro é analisado para o título de anti-EphB4. Os animais são reforçados até estabilizar o título.

Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são, em seguida, fusionados com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e crescidas num meio de cultura adequado que contém preferivelmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma originais, não fusionadas. Por exemplo, se as células de mieloma originárias carecem da enzima hipoxantina-guanina fosforribosilo transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias as quais evitam o crescimento de células deficientes em HGPRT.

As células de mieloma preferidas são aquelas que fusionam eficazmente, suportam a produção estável de alto nível de anticorpo pelas células de produção de anticorpos selecionadas, e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. entre estas, as linhas de células de mieloma preferidas são linhas de mieloma murino, tais como aquelas derivadas de tumores de ratinhos MOPC-21 e MPC-11 disponíveis a parte do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia, EUA, e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis a partir da American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EUA. Linhas de células de mieloma humano e de heteromieloma de ratinho-humano foram também descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova York, 1987)).

O meio de cultura no qual as células de hibridoma crescem é analisado para a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra EphB4. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioensaio (RIA) ou ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode,

por exemplo, ser determinada pela análise de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Após a identificação das células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados limitando os procedimentos de diluição e crescidos por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de cultura para este propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Em adição, as células de hibridoma podem ser crescidas *in vivo* como tumores ascíticos num animal.

Os anticorpos monoclonais secretados pelo subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido ascítico ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulinas convencionais, tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia em hidróxiapatita, eletroforese em gel, diálise, ou cromatografia de afinidade.

Os anticorpos anti-EphB4 da invenção podem ser feitos usando bibliotecas combinatórias para rastrear clones de anticorpos sintéticos com a atividade ou atividades desejadas. Em princípio, os clones de anticorpos sintéticos são selecionados por rastreio de bibliotecas de fagos contendo fagos que exibem vários fragmentos da região variável do anticorpo (Fv) fusionados à proteína de revestimento do fago. Tais bibliotecas de fagos são conseguidas por cromatografias de afinidade contra o antígeno desejado. Clones expressando fragmentos Fv capazes de se ligarem ao antígeno desejado são absorvidos ao antígeno e assim separados dos clones de não ligação na biblioteca. Os clones de ligação são então eluídos a partir do antígeno, e podem ser ainda enriquecidos por ciclos adicionais de adsorção/eluição do antígeno. Qualquer dos anticorpos anti-EphB4 da invenção pode ser obtido

concebendo um procedimento de rastreio de antigénios adequado para selecionar o clone do fago de interesse seguido por construção de um clone do anticorpo anti-EphB4 de comprimento completo usando as sequências de Fv do clone do fago de interesse e sequências das regiões constantes (Fc) descritas em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, NIH Publication

O domínio de ligação ao antigénio de um anticorpo é formado por duas regiões variáveis (V) de cerca de 110 aminoácidos, uma de cada das cadeias leves (VL) e pesadas (VH), ambas apresentando três ansas hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Os domínios variáveis podem ser exibidos funcionalmente num fago, ou como fragmentos Fv de cadeia simples (scFv), nos quais VH e VL estão covalentemente ligadas através de um péptido flexível, curto, ou como fragmentos Fab, nos quais estes estão cada um fusionados a um domínio constante e interagem não covalentemente, como descrito em Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como aqui utilizado, clones de fagos codificando scFv e clones de fagos codificando Fab são coletivamente referidos como "clones de fagos Fv" ou "clones Fv".

Os repertórios de genes das VH e VL podem ser separadamente clonados por reação de polimerização em cadeia (PCR) e recombinados aleatoriamente em bibliotecas de fagos, as quais podem ser então pesquisadas para clones de ligação ao antigénio como descrito em Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). As bibliotecas de fontes imunizadas proporcionam anticorpos de alta afinidade ao imunogénio sem a necessidade de construção de hibridomas. Alternativamente, os repertórios virgens podem ser clonados para proporcionar uma fonte única de anticorpos humanos para um amplo intervalo de antigénios não próprios e também próprios sem qualquer imunização como descrito por Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993).

Finalmente, as bibliotecas virgens podem também ser feitas sinteticamente por clonagem de segmentos de gene V não rearranjados a partir de células estaminais, e utilizando iniciadores de PCR contendo uma sequência aleatória para codificar as regiões altamente variáveis CDR3 e para alcançar o rearranjo *in vitro* como descrito por Hoogenboom e Winter, *J. mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Um fago filamentosos é utilizado para exibir fragmentos de anticorpos por fusão à menor proteína de revestimento pIII. Os fragmentos de anticorpos podem ser exibidos como fragmentos Fv de cadeia única, nos quais os domínios VH e VL estão conectados na mesma cadeia polipeptídica por um espaçador polipeptídico flexível, por exemplo, como descrito por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), ou como fragmentos Fab, nos quais uma cadeia é fusionada a pIII e a outra é secretada no periplasma da célula hospedeira bacteriana onde a montagem de uma estrutura Fab-proteína de revestimento que é exibida na superfície do fago por deslocamento de algumas das proteínas de revestimento de tipo selvagem, por exemplo, como descrito em Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

Em geral, os ácidos nucleicos codificando fragmentos de genes de anticorpos são obtidos a partir de células imunes colhidas de seres humanos ou animais. Se uma biblioteca a favor de clones anti-EphB4 é desejada, o sujeito é imunizado com EphB4 para gerar uma resposta de anticorpos, e células do baço e/ou células B circulantes ou outros linfócitos do sangue periférico (PBLs) são recuperadas para a construção da biblioteca. Numa forma de realização preferida, uma biblioteca de fragmentos de genes de anticorpos humanos a favor de clones anti-EphB4 é obtida gerando uma resposta de anticorpos anti-EphB4 em ratinhos transgênicos que transportam uma coleção de genes de imunoglobulinas humanas (e sem um sistema de produção de

anticorpos endógeno funcional) de tal modo que a imunização com EphB4 dá origem a células B que produzem anticorpos humanos contra EphB4. A geração de ratinhos transgênicos de produção de anticorpos humanos é descrita abaixo.

O enriquecimento adicional para populações de células reativas anti-EphB4 pode ser obtido usando um procedimento de rastreio adequado para isolar células B que expressem anticorpo ligado à membrana específico de EphB4, por exemplo, por separação celular com cromatografia de afinidade de EphB4 ou adsorção de células a EphB4 marcada com fluorocromo seguida de separação de células ativada por fluxo (FACS).

Alternativamente, a utilização de células de baço e/ou células C ou outros PBLs de um dador não imunizado proporciona uma melhor representação do possível repertório de anticorpos, e também permite a construção de uma biblioteca de anticorpos usando qualquer espécie animal (humano ou não humano) na qual EphB4 não é antigênico. Para bibliotecas que incorporam a construção de genes de anticorpos *in vivo*, células estaminais são colhidas a partir do sujeito para proporcionar ácidos nucleicos que codificam segmentos gênicos de anticorpos não rearranjados. As células imunes de interesse podem ser obtidas a partir de uma variedade de espécies animais, tais como ser humana, ratinho, ratazana, espécies de lagomorfos, lobos, caninas, felinas, suínas, bovinas, de equinos e aviárias, etc.

Os segmentos gênicos variáveis de anticorpos codificando ácidos nucleicos (incluindo os segmentos VH e VL) são recuperados a partir das células de interesse e amplificados. No caso de bibliotecas de genes VH e VL rearranjados, o ADN desejado pode ser obtido por isolamento de ADN genômico ou mRNA de linfócitos seguido por reação de polimerização em cadeia (PCR) com iniciadores correspondentes às extremidades 5' e 3' de genes VH e VL rearranjados como descrito em Orlandi *et al.*, Proc. Natl.

Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), fazendo deste modo diversos repertórios de gene V para expressão. Os genes V podem ser amplificados a partir de cADN e ADN genómico, com iniciadores inversos na extremidade 5' do exão que codifica o domínio V maduro e iniciadores diretos com base dentro do segmento J como descrito em Orlandi *et al.* (1989) e em Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). No entanto, para amplificação de cADN, iniciadores inversos podem também ser baseados no exão líder como descrito em Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), e iniciadores diretos dentro da região constante como descrito em Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar a complementaridade, a degenerescência pode ser incorporada nos iniciadores como descrito em Orlandi *et al.* (1989) ou Sastry *et al.* (1989). Preferivelmente, a diversidade da biblioteca é maximizada usando iniciadores de PCR direcionados a cada família do gene V de modo a amplificar todos os arranjos de VH e VL disponíveis presentes na amostra de ácido nucleico da célula imune, por exemplo, como descrito no método de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) ou como descrito no método de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para a clonagem do ADN amplificado em vetores de expressão, sítios de restrição raros podem ser introduzidos dentro do iniciador de PCR como uma etiqueta em uma extremidade como descrito em Orlandi *et al.* (1989), ou por amplificação adicional por PCR com um iniciador etiquetado como descrito em Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Os repertórios de genes V rearranjados sinteticamente podem ser derivados de segmentos de genes V *in vitro*. A maioria dos segmentos de genes VH humanos foram clonados e sequenciados (reportado em Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), e mapeados (reportado em Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993); estes segmentos clonados (incluindo todas as conformações principais da

ansa H1 e H2) podem ser usados para gerar diversos repertórios de genes VH com iniciadores de PCR codificando ansas H3 de sequência e comprimento diversos como descrito em Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Os repertórios de VH podem também ser feitos com toda a diversidade de sequências enfocados num longa ansa H3 de um comprimento único como descrito em Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Os segmentos V κ e V λ humanos foram clonados e sequenciados (reportado em Williams e Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) e podem ser usados para fazer repertórios de cadeias leves sintéticas. Repertórios de genes V sintéticos, baseados num intervalo de dobras de VH e VL, e comprimentos de L3 e H3, codificarão anticorpos de considerável diversidade estrutural Na sequência da amplificação de ADNs de codificação de genes V, segmentos de gene V germinais podem ser rearranjados *in vitro* de acordo com os métodos de Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Os repertórios de fragmentos de anticorpos podem ser construídos por combinação dos repertórios dos genes VH e VL em conjunto de diversas maneiras. Cada repertório pode ser criado em diferentes vetores, e os vetores recombinados *in vitro*, por exemplo, como descrito em Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993), ou *in vivo* por infecção combinatória, por exemplo, o sistema loxP descrito em Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). A abordagem de recombinação *in vivo* explora a natureza de duas cadeias de fragmentos Fab para superar o limite do tamanho da biblioteca imposto pela eficácia de transformação de *E. coli*. Repertórios VH e VL virgens são clonados em separado, um num fagomídeo e o outro num vetor fago. As duas bibliotecas são então combinadas por infecção do fago de bactérias contendo fagomídeo de modo que cada célula contém uma combinação diferente e o tamanho da biblioteca é limitado apenas pelo número de células

presentes (cerca de 10^{12} clones). Ambos os vetores contêm sinais de recombinação *in vivo* de modo que os genes VH e VL são recombinados numa replicação única e são co-empacotados em viriões do fago. Estas bibliotecas enormes proporcionam grandes números de diversos anticorpos de boa afinidade (K_d^{-1} de cerca de 10^{-8} M).

Alternativamente, os repertórios podem ser clonados sequencialmente no mesmo vetor, por exemplo, como descrito em Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), ou montados em conjunto por PCR e depois clonados, por exemplo, como descrito em Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). A montagem por PCR pode também ser usada para juntar ADNs de VH e VL com ADN codificando um espaçador peptídico flexível para formar repertórios de Fv de cadeia simples. Ainda numa outra técnica, "em montagem por PCR celular" é usada para combinar genes VH e VL dentro de linfócitos por PCR e depois repertórios de clones de genes ligados, como descrito em Embleton *et al.*, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Os anticorpos produzidos por bibliotecas virgens (quer naturais quer sintéticas) podem ser de afinidade moderada (K_d^{-1} de cerca de 10^6 a 10^7 M⁻¹), mas a maturação da afinidade pode também ser mimetizada *in vitro* por construção e re-seleção de bibliotecas secundárias, como descrito em Winter *et al.* (1994), *supra*. Por exemplo, uma mutação pode ser introduzida em aleatório *in vitro* usando uma polimerase propensa a erros (reportado em Leung *et al.*, Technique, 1: 11-15 (1989)) no método de Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) ou no método de Gram *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, a maturação da afinidade pode ser realizada por mutação aleatória de uma ou mais CDRs, por exemplo, usando PCR com iniciadores que transportam uma sequência aleatória que abarca a CDR de interesse, em clones de Fv individuais selecionados e rastreando para clones de maior afinidade. O

documento WO 9607754 (publicado a 14 de março de 1996) descreveu um método para induzir mutagenese numa região determinante de complementaridade de uma cadeia leve de uma imunoglobulina para criar uma biblioteca de genes de cadeias leves. Uma outra abordagem eficaz é a recombinação dos domínios VH ou VL selecionados por expressão em fagos com repertórios de variantes do domínio V de ocorrência natural obtidas a partir de dadores não imunizados e rastreio para maior afinidade em várias rondas de remodelação das cadeias, como descrito em Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpos com afinidades na gama de 10^{-9} M.

Os ácido nucleico e sequências de aminoácidos de EphB4 são conhecidos na técnica. A sequência de ácido nucleico codificando a EphB4 pode ser concebida usando a sequência de aminoácidos da região desejada de EphB4. Alternativamente, a sequência de cADN (ou fragmentos deste) de N.º de Adesão ao GenBank NM_004444, ou divulgada na Patente U.S. N.o 5.635.177, pode ser usada. ADNs codificando EphB4 podem ser preparados por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não estão limitados a, síntese química por qualquer dos métodos descritos em Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989), tal como os métodos de triéster, fosfito, fosforamidito e H-fosfonato. Numa forma de realização, os codões preferidos pela expressão em células hospedeiras são usados na conceção de ADN de codificação de EphB4. Alternativamente, o ADN de codificação de EphB4 pode ser isolado a partir de uma biblioteca de cADN ou genómica.

Na sequência da construção da molécula de ADN codificando a EphB4, a molécula de ADN é operacionalmente ligada a uma sequência controlo de expressão num vetor de expressão, tal como um plasmídeo, em que a sequência controlo é reconhecida por uma célula hospedeira

transformada com o vetor. Em geral, os vetores de plasmídeos contêm sequências de replicação e controle as quais são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira. O vetor vulgarmente transporta um sítio de replicação, bem como sequências que codificam proteínas que são capazes de proporcionar seleção fenotípica em células transformadas. Os vetores adequados para expressão em células hospedeiras procarióticas e eucarióticas são conhecidos na técnica e alguns são ainda aqui descritos. Organismos eucarióticas, tais como, leveduras, ou células derivadas de organismos multicelulares, tais como mamíferos, podem ser utilizados.

Opcionalmente, o ADN codificando a EphB4 é operacionalmente ligado a uma sequência líder de secreção resultando na secreção do produto de expressão pela célula hospedeira no meio de cultura. Os exemplos de sequências líder de secreção incluem stII, ecotin, IamB, herpes GD, Ipp, fosfatase alcalina, invertase, e fator alfa. Também adequada para utilização aqui é a sequência líder de 36 aminoácidos de proteína A (Abrahmsen *et al.*, EMBO J., 4: 3901 (1985)).

As células hospedeiras são transfetadas e preferivelmente transformadas com os vetores de expressão ou clonagem descritos acima desta invenção e cultivadas em meios nutritivos convencionais modificados como apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes, ou amplificar os genes codificando as sequências desejadas.

Transfeção refere-se à tomada de um vetor de expressão por uma célula hospedeira quer sejam ou não expressas, de facto, quaisquer sequências de codificação. Numerosos métodos de transfeção são conhecidos para os peritos na especialidade, por exemplo, precipitação de CaPO_4 e eletroporação. Uma transfeção bem sucedida é geralmente reconhecida quando qualquer indicação da operação deste vetor ocorre dentro da célula hospedeira. Os métodos para

transfeção são bem conhecidos na técnica, e alguns são ainda aqui descritos.

Transformação significa introduzir ADN num organismo de modo a que o ADN seja replicável, tanto como um elemento extracromossomal como por integrante cromossomal. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é feita usando técnicas padrão apropriadas a tais células. Os métodos para transformação são bem conhecidos na técnica, e alguns são ainda aqui descritos.

As células procarióticas usadas para produzir a EphB4 podem ser cultivadas como descrito geralmente em Sambrook *et al.*, *supra*.

As células hospedeiras de mamíferas usadas para produzir a EphB4 podem ser cultivadas num variedade de meios, que são bem conhecidos na técnicas e alguns dos quais são aqui descritos.

As células hospedeiras referidas nesta divulgação englobam células em cultura *in vitro*, bem como células que estão dentro de um animal hospedeiro.

A purificação de EphB4 pode ser conseguida utilizando métodos reconhecidos na técnica, alguns dos quais são aqui descritos.

A EphB4 purificada pode ser ligada a uma matriz adequada tal como esferas de agarose, esferas de acrilamida, esferas de vidro, celulose, vários copolímeros acrílicos, géis de metacrilato de hidroxilo, copolímeros poliacrílicos e polimetacrílicos, nylon, veículos neutros e iónicos e semelhantes, para utilização na separação cromatográfica por afinidade de clones de expressão em fagos. A ligação da proteína EphB4 à matriz pode ser conseguida pelos métodos descritos em *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Uma técnica comumente empregue para unir ligandos proteicos a matrizes polissacarídeas, por exemplo, agarose, dextrano ou celulose, envolve a ativação do veículo com halogenetos de cianogénio e

subsequente acoplamento das amins primárias alifática ou aromáticas do ligando peptídico à matriz ativada.

Alternativamente, a EphB4 pode ser usada para revestir os poços de placas de adsorção, expressa em células hospedeiras fixas às placas de adsorção ou utilizadas na separação celular, ou conjugada com biotina para captura com esferas revestidas com estreptavidina, ou utilizada em qualquer outro método conhecido na técnica para seleção das bibliotecas de expressão em fagos.

As amostras de bibliotecas de fagos são contactadas com EphB4 imobilizada sob condições adequadas para a ligação de pelo menos uma porção das partículas do fago com o adsorvente. Normalmente, as condições, incluindo pH, força iónica, temperatura e semelhantes, são selecionadas para mimetizar as condições fisiológicas. Os fagos ligados à fase sólida são lavados e em seguida eluídos por ácido, por exemplo, como descrito em Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), ou por alcalinos, por exemplo, como descrito em Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), ou por competição antigénica de EphB4, por exemplo, num procedimento semelhante ao método de competição antigénica de Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). Os fagos podem ser enriquecidos 20-1000 vezes numa ronda única de seleção. Além disso, os fagos enriquecidos podem crescer em culturas bacterianas e submeterem-se a rondas adicionais de seleção.

A eficácia da seleção depende de muitos fatores, incluindo as cinéticas de dissociação durante as lavagens, e se múltiplos fragmentos de anticorpos num fago único podem vincular-se em simultâneo ao antigénio. Os anticorpos com cinéticas de dissociação rápidas (e fracas afinidades de ligação) podem ser retidos pela utilização de lavagens curtas, expressão em fagos multivalentes e elevadas densidades de revestimento de antigénio em fase sólida. A elevada densidade não só estabiliza o fago através de

interações multivalentes, como também favorece a re-ligação do fago que tem dissociado. A seleção de anticorpos com cinéticas de dissociação lentas (e boas afinidades de ligação) pode ser promovida pela utilização de lavagens longas e expressão em fagos monovalentes, como descrito em Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) e no documento WO 92/09690, e uma baixa densidade de revestimento de antigénio, como descrito em Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

É possível selecionar entre anticorpos de fagos de diferentes afinidades, mesmo com afinidades que diferem ligeiramente, para EphB4. No entanto, a mutação aleatória num anticorpo selecionado (por exemplo, como realizado em algumas das técnicas de maturação de afinidade descritas acima) é suscetível de dar origem a muitos mutantes, a maioria de ligação ao antigénio, e uns quantos com maior afinidade. Com EphB4 limitada, um fago de alta afinidade raro poderia ser descartado. Para manter todos os mutantes de maior afinidade, os fagos podem ser incubados com excesso de EphB4 biotinilada, mas com a EphB4 biotinilada numa concentração de molaridade inferior que a constante de afinidade molar alvo para EphB4. Os fagos de ligação de alta afinidade podem então ser capturados por esferas paramagnéticas revestidas com estreptavidina. Tal "captura em equilíbrio" permite que os anticorpos sejam selecionados de acordo com as suas afinidades de ligação, com uma sensibilidade que permite o isolamento de clones mutantes com tão pouco como duas vezes maior afinidade a partir de um grande excesso de fagos com menor afinidade. As condições utilizadas na lavagem de fagos ligados a uma fase sólida podem também ser manipuladas para discriminação com base nas cinéticas de dissociação.

Cones anti-EphB4 podem ser ativamente selecionados. A invenção proporciona anticorpos anti-EphB4 que bloqueiam a ligação entre um ligando EphB4 (nomeadamente, efrina-B2) e

EphB4, mas não bloqueiam a ligação entre um ligando EphB4 e EphB1, EphB3, EphB4, EphB5 ou EphB6. Os clones Fv correspondentes a tais anticorpos anti-EphB4 podem ser selecionados por (1) isolamento de clones anti-EphB4 a partir de uma biblioteca de fagos como descrito acima, e, opcionalmente, amplificação da população isolada de clones de fagos por crescimento da população num hospedeiro bacteriano adequado; (2) seleção de EphB4 e de uma segunda proteína contra a qual a atividade de bloqueio e de não-bloqueio, respetivamente, é desejada; (3) adsorção dos clones de fagos anti-EphB4 a EphB4 imobilizada; (4) utilização de um excesso da segunda proteína para eluir quaisquer clones não desejados que reconhecem determinantes de ligação da EphB4 que se sobrepõem ou são partilhados com os determinantes de ligação da segunda proteína; e (5) eluição dos clones que permanecem adsorvidos na sequência da etapa (4). Opcionalmente, os clones com as propriedades de bloqueio/não bloqueio desejadas podem ser ainda enriquecido por repetição dos procedimentos de seleção aqui descritos uma ou mais vezes.

O ADN codificando os anticorpos monoclonais derivados de hibridoma ou os clones Fv de expressão em fagos da invenção é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, utilizando iniciadores oligonucleotídicos concebidos para amplificar especificamente as regiões de codificação das cadeias pesadas e leves de interesse a partir de um hibridoma ou modelo de ADN de fago) . Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vetores de expressão, que são depois transfetados para células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem proteína imunoglobulínica de outra forma, para obter a síntese dos anticorpos monoclonais desejados nas células hospedeiras recombinantes. Os artigos de revisão sobre a

expressão recombinante em bactérias de ADN codificando anticorpos incluem Skerra *et al.*, Curry Opinion on Immunol., 5: 256 (1993) e Pluckthun, Immunol Revs, 130: 151 (1992).

O ADN que codifica os clones Fv da invenção pode ser combinado com sequências de ADN conhecidas que codificam as regiões constantes das cadeias pesadas e/ou cadeias leves (por exemplo, as sequências de ADN apropriadas podem ser obtidas a partir de Kabat *et al.*, *supra*) para formar clones que codificam as cadeias pesadas e/ou leves de comprimento total ou parcial. Será apreciado que as regiões constantes de qualquer isótipo podem ser usadas para este propósito, incluindo as regiões constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, e que tais regiões constantes podem ser obtidas a partir de qualquer ser humano ou espécie animal. Um clone Fv derivado do ADN do domínio variável de uma espécie animal (tal como ser humano) e, em seguida, fusionado a ADN da região constante de uma outra espécie animal para formar uma sequência(s) de codificação para "híbrido", a cadeia pesada e/ou cadeia leve de comprimento total está incluída na definição de anticorpo "quimérico" e "híbrido", tal como aqui utilizada. Numa forma de realização preferida, um clone Fv derivado de ADN variável humano é fusionado a ADN da região constante humano para formar uma sequência(s) de codificação para todas as cadeias pesadas e/ou leves de comprimento total ou parcial, humanas.

O ADN codificando anticorpo anti-EphB4 derivado de um hibridoma da invenção pode também ser modificado, por exemplo, por substituição da sequência de codificação para os domínios constantes das cadeias pesadas e leves em vez de sequências de murino homólogas derivadas do clone de hibridoma (por exemplo, como no método de Morrison *et al.*, Proc . Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). ADN codificando um hibridoma ou anticorpo ou fragmento derivados do clone Fv pode ser ainda modificado juntando

covalentemente à sequência de codificação da imunoglobulina toda ou parte da sequência de codificação para um polipéptido não imunoglobulínico. Desta forma, anticorpos "quiméricos" ou "híbridos" são preparados tendo a especificidade de ligação dos anticorpos derivados de clones Fv ou de clones de hibridoma da invenção.

Fragmentos de anticorpos

A presente invenção engloba fragmentos de anticorpos. Em determinadas circunstâncias, existem vantagens em utilizar fragmentos de anticorpos, em vez de anticorpos inteiros. O menor tamanho dos fragmentos permite rápida eliminação, e pode levar a acesso melhorado a tumores sólidos.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados por digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja-se, por exemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); e Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Contudo, estes fragmentos podem agora ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos de anticorpos Fab, Fv e ScFv podem ser todos expressos em e secretados de *E. coli*, o que permite assim a fácil produção de grandes quantidades destes fragmentos. Os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir das bibliotecas de anticorpos em fagos aqui discutidas. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados a partir de *E. coli* e quimicamente acoplados para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acordo com uma outra abordagem, os fragmentos F(ab')₂ podem ser diretamente isolados a partir de cultura de células hospedeiras recombinantes. Fragmentos Fab e F(ab')₂ com semivida *in vivo* aumentada compreendendo um recetor de salvamento que se liga a resíduos de epitopos são descritos na Patente U.S. N.º 5.869.046. Outras

técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para o perito. Noutras formas de realização, o anticorpo de elição é um fragmento Fv de cadeia simples (scFv). Veja-se o documento WO 93/16185; Patentes U.S. N.º 5.571.894; e 5.587.458. Fv e sFv são as únicas espécies com sítios de combinação intactos que estão desprovidos de regiões constantes; assim, estes são adequados para ligação não específica reduzida durante a utilização *in vivo*. As proteínas de fusão em sFv podem ser construídas para obter a fusão de uma proteína efetora quer na terminação amino quer na carboxi de um sFv. Veja-se *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. Os fragmentos de anticorpos podem também ser um "anticorpo linear", por exemplo, como descrito na Patente U.S. N.º 5.641.870, por exemplo. Tais fragmentos de anticorpos podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

Anticorpos humanizados

A presente invenção engloba anticorpos humanizados. Vários métodos para a humanização de anticorpos não humanos são conhecidos na técnica. Por exemplo, um anticorpo humanizado pode ter um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos nele de uma fonte que é não humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente referidos como resíduos "de importação", os quais são tipicamente tomados a partir de um domínio variável "de importação". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), substituindo as sequências das regiões hipervariáveis pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Deste modo, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente U.S. N.º 4.816.567) em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de

uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos das regiões hipervariáveis e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

A escolha de domínios variáveis humanos, tanto leves como pesados, para serem utilizados na obtenção dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o assim chamado método do "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é rastreada contra toda a biblioteca de sequências de domínios variáveis humanas conhecidas. A sequência humana que está mais próxima daquela do roedor é então aceita como a estrutura humana para o anticorpo humanizado (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Outro método utiliza uma estrutura particular derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser usada para diversos anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol*, 151:2623.

É ainda importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para alcançar este objetivo, de acordo com um método, os anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências de origem e vários produtos humanizados conceituais utilizando modelos tridimensionais das sequências de origem e humanizadas. Os modelos de imunoglobulinas tridimensionais estão comumente disponíveis e são familiares àqueles peritos na especialidade. Programas informáticos estão disponíveis, os quais ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulinas

candidatas selecionadas. A inspeção destas exibições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência da imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata se ligar ao seu antigénio. Deste modo, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências recipientes e de importação, de modo que a característica do anticorpo desejada, tal como afinidade aumentada para o(s) antigénio(s) alvo, é alcançada. Em geral, os resíduos das regiões hipervariáveis estão directamente e muito substancialmente envolvidos na influência da ligação ao antigénio.

Anticorpos humanos

Os anticorpos anti-EphB4 humanos da invenção podem ser construídos por combinação de sequência(s) do domínio variável de clones Fv selecionadas a partir de bibliotecas de expressão em fagos de origem humana com sequências de domínios constantes humanos conhecidas, como descrito acima. Alternativamente, os anticorpos anti-EphB4 monoclonais humanos da invenção podem ser obtidos pelo método do hibridoma. Linhas de células de mieloma humano e de heteromieloma de ratinho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos foram descritas, por exemplo, por Kozbor, J. Immunol, 133.: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova York, 1987); e Boerner *et al.*, J. Immunol., 147: 86 (1991).

Agora é possível produzir animais transgênicos (por exemplo, ratinhos) que são capazes, após imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulinas endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de junção (JH) da cadeia pesada de um anticorpo em ratinhos mutantes quiméricos e de linha germinal resulta na

inibição completa da produção de anticorpos endógena. A transferência da coleção de genes de imunoglobulinas germinais humanos em tais ratinhos mutantes germinais resultará na produção de anticorpos humanos após desafio antigénico. Veja-se, por exemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immunol., 7: 33 (1993).

O rearranjo génico pode também ser usado para derivar anticorpos humanos a partir de anticorpos não humanos, por exemplo, de roedores, onde o anticorpo humano tem afinidades e especificidades semelhantes ao anticorpo não humano de partida. De acordo com este método, que é também chamado "*imprinting* de epitopos", quer a região variável da cadeia pesada quer a da leve de um fragmento de anticorpo não humano obtido por técnicas de expressão em fagos como descrito acima é substituída com um repertório de genes do domínio V humano, criando uma população de quimeras scFv ou Fab com cadeia humana/cadeia não humana. A seleção com antigénio resulta no isolamento de scFv ou Fab quiméricos de cadeia não humana/cadeia humana, em que a cadeia humana restaura o sítio de ligação ao antigénio destruído aquando da remoção da cadeia não humana correspondente no clone de expressão em fagos primário, isto é, o epitopo governa (imprime) a escolha do parceiro da cadeia humana. Quando o processo é repetido de modo a substituir a cadeia não humana remanescente, um anticorpo humano é obtido (veja-se o documento de PCT WO 93/06213 publicado a 1 de abril de 1993). Ao contrário da humanização tradicional de anticorpos não humanos por enxerto de CDRs, esta técnica proporciona anticorpos completamente humanos, que não têm resíduos de FR ou CDR de origem não humana.

Anticorpos biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, preferivelmente humanos ou humanizados, que

têm especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação é para EphB4 e a outra é para qualquer outro antígeno. Os anticorpos biespecíficos exemplificativos podem ligar-se a dois epitopos diferentes da proteína EphB4. Os anticorpos biespecíficos podem também ser usados para localizar agentes citotóxicos em células que expressam EphB4. Estes anticorpos possuem um braço de ligação a EphB4 e um braço que se liga ao agente citotóxico (por exemplo, saporina, anti-interferão- α , alcalóide de vinca, cadeia A de ricina, metotrexato ou hapteno de isótopos radioativos). Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento completo ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, anticorpos biespecíficos $F(ab')_2$).

Os métodos para obter anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos baseia-se na co-expressão de dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulinas, onde as duas cadeias pesadas têm especificidades diferentes (Milstein e Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Devido ao arranjo aleatório das cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas de anticorpo diferentes, das quais apenas uma tem a estrutura biespecífica correcta. A purificação da molécula correcta, que é normalmente feita por etapas de cromatografia de afinidade, é bastante trabalhosa e os rendimentos do produto são baixos. Procedimentos semelhantes são divulgados no documento WO 93/08829 publicado a 13 de maio de 1993, e em Traunecker *et al*, *EMBOJ.*, 10: 3655 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente e mais preferida, os domínios variáveis do anticorpo com especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação

anticorpo-antigénio) são fusionados a sequências do domínio constante da imunoglobulina. A fusão é preferivelmente a um domínio constante da cadeia pesada da imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões de charneira, CH2 e CH3. Prefere-se ter a primeira região constante da cadeia pesada (CH1), contendo o sítio necessário para ligação da cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. Os ADNs codificando as fusões da cadeia pesada da imunoglobulina e, se desejado, da cadeia leve da imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados, e são co-transfetados para um organismo hospedeiro adequado. Isto prevê grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos polipeptídicos em formas de realização quando rácios desiguais das três cadeias polipeptídicas utilizadas na construção proporcionam os rendimentos óptimos. É, contudo, possível inserir as sequências de codificação para duas ou para todas as três cadeias polipeptídicas num vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias polipeptídicas em rácios iguais resulta em rendimentos elevados ou quando os rácios não têm significado particular.

Numa forma de realização preferida desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos por uma cadeia pesada da imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação num braço, e um par de cadeia pesada-cadeia leve da imunoglobulina híbrida (proporcionando uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Verificou-se que esta estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações de cadeias da imunoglobulina não desejadas, uma vez que a presença de uma cadeia leve da imunoglobulina em apenas metade da molécula biespecífica prevê um modo fácil de separação. Esta abordagem é divulgada no documento WO 94/04690. Para mais detalhes da geração de anticorpos

biespecíficos veja-se, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acordo com uma outra abordagem, a interface entre um par de moléculas de anticorpos pode ser manipulada para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura celular recombinante. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio CH3 de um domínio constante do anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos pequenas da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou semelhante à(s) cadeia(s) lateral(ais) grande(s) são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo substituindo as cadeias laterais de aminoácidos grandes por umas mais pequenas (por exemplo, alanina ou treonina). Isto proporciona um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais não desejados, tais como homodímeros.

Os anticorpos biespecíficos incluem anticorpos de ligações cruzadas ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado a avidina, o outro a biotina. Tais anticorpos foram, por exemplo, propostos para direcionar células do sistema imunitário contra células não desejadas (Patente U.S. N.º 4.676.980), e para o tratamento de infeção por HIV (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 e EP 03089). Os anticorpos em heteroconjugados podem ser obtidos usando quaisquer métodos de ligação cruzada convenientes. Agentes de ligação cruzada adequados são bem conhecidos na técnica, e são divulgados na Patente U.S. 4.676.980, juntamente com uma série de técnicas de ligação cruzada.

As técnicas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos foram também descritas na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem

ser preparados utilizando ligação química. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) descreve um procedimento em que anticorpos intactos são clivados de forma proteolítica para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente de complexação de ditiol arsenito de sódio para estabilizar ditióis vicinais e prevenir a formação de dissulfureto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são, em seguida, convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab'-TNB é, em seguida, reconvertido no Fab'-tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Progressos recentes têm facilitado a recuperação directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, os quais podem ser quimicamente acoplados para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) descreve a produção de uma molécula de $F(ab')_2$ de um anticorpo biespecífico humanizado. Cada fragmento Fab' foi secretado separadamente a partir de *E. coli* e sujeito a acoplamento químico direto *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de se ligar a células sobreexpressando o recetor HER2 e a células T humanas normais, bem como de desencadear a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor da mama humano.

Várias técnicas para obter e isolar fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente a partir de cultura de células recombinantes foram também descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos foram produzidos utilizando fechos de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Os péptidos dos fechos de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos

diferentes por fusão de genes. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região de charneira para formar monómeros e, de seguida, re-oxidados para formar os heterodímeros de anticorpo. Este método também pode ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de "diacorpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) proporcionou um mecanismo alternativo para obter fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável da cadeia pesada (VH) ligado a um domínio variável da cadeia leve (VL) por um linker que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Deste modo, os domínios VH e VL de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios VL e VH complementários de um outro fragmento, formando, assim, dois sítios de ligação ao antigénio. Uma outra estratégia para obter fragmentos de anticorpos biespecíficos pela utilização de dímeros Fv de cadeia simples (sFv) foi reportada. Veja-se Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

Anticorpos com mais de duas valências são contemplados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

Anticorpos multivalentes

Um anticorpo multivalente pode ser internalizado (e/ou catabolizado) mais rapidamente que um anticorpo bivalente por uma célula expressando um antigénio ao qual os anticorpos se ligam. Os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos multivalentes (os quais são de outra classe que não a IgM) com três ou mais sítios de ligação ao antigénio (por exemplo, anticorpos tetraivalentes), que podem ser prontamente produzidos por expressão recombinante de ácido nucleico codificando as cadeias polipeptídicas do anticorpo. O anticorpo multivalente pode compreender um domínio de dimerização e três ou mais sítios de ligação ao

antigénio. O domínio de dimerização preferido compreende (ou consiste em) uma região Fc ou uma região de charneira. Neste cenário, o anticorpo compreenderá uma região Fc e três ou mais sítios de ligação ao antigénio amino-terminais para a região Fc. O anticorpo multivalente preferido compreende aqui (ou consiste em) três a cerca de oito, mas preferivelmente quatro, sítios de ligação ao antigénio. O anticorpo multivalente compreende pelo menos uma cadeia polipeptídica (e preferivelmente duas cadeias polipeptídicas), em que a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) compreende(m) dois ou mais domínios variáveis. Por exemplo, a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) pode(m) compreender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, em que VD1 é um primeiro domínio variável, VD2 é um segundo domínio variável, Fc é uma cadeia polipeptídica de uma região Fc, X1 e X2 representam um aminoácido ou polipéptido, e n é 0 ou 1. Por exemplo, a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) pode compreender: cadeia VH-CH1-linker flexível-VH-CH1-região Fc; ou cadeia VH-CH1-VH-CH1-região Fc. O anticorpo multivalente compreende aqui ainda, preferivelmente, pelo menos dois (e preferivelmente quatro) polipéptidos do domínio variável da cadeia leve. O anticorpo multivalente pode, por exemplo, compreender aqui desde cerca de dois a cerca de oito polipéptidos do domínio variável da cadeia leve. Os polipéptidos do domínio variável da cadeia leve aqui contemplados compreendem um domínio variável da cadeia leve e, opcionalmente, compreendem ainda um domínio CL.

Variantes de anticorpos

Em algumas formas de realização, modificação(ões) das sequências de aminoácidos dos anticorpos aqui descritos são contempladas. Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. As variantes da sequência de aminoácidos do anticorpo são preparadas pela introdução de alterações nucleotídicas apropriadas no ácido nucleico do anticorpo,

ou por síntese peptídica. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções de, e/ou inserções em e/ou substituições de, resíduos dentro das sequências de aminoácidos do anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição é feita para chegar à construção final, desde que a construção final possua as características desejadas. As alterações de aminoácidos podem ser introduzidas na sequência de aminoácidos do anticorpo sujeito no momento em que é obtida a sequência.

Um método útil para a identificação de determinados resíduos ou regiões do anticorpo que são localizações preferidas para mutagênese é chamado "mutagênese dirigida com alanina" como descrito por Cunningham e Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo são identificados (por exemplo, resíduos carregados tais como arg, asp, his, lys e glu) e substituídos por um aminoácido neutro ou carregado negativamente (mais preferivelmente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com o antigénio. Aquelas localizações de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são, então, refinadas por introdução de mais ou outras variantes nos, ou para os, sítios de substituição. Assim, embora o sítio para a introdução de uma variação na sequência de aminoácidos seja predeterminado, a natureza da mutação *per se* não necessita ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação num dado sítio, mutagênese dirigida com alanina ou aleatória é realizada no codão ou região alvo e as imunoglobulinas expressas são rastreadas para a atividade desejada.

As inserções em sequências de aminoácidos incluem fusões no terminal amino e/ou carboxilo que variam em comprimento desde um resíduo até polipéptidos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-sequências de resíduos de aminoácido únicos ou múltiplos. Exemplos de

inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionilo N-terminal ou o anticorpo fusionado a um polipéptido citotóxico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão à terminação N ou C do anticorpo de uma enzima (por exemplo, para ADEPT) ou um polipéptido que aumenta a semivida sérica do anticorpo.

A glicosilação de polipéptidos é tipicamente ou N-ligada ou O-ligada. N-ligada refere-se à ligação da fração de carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática da fração de carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Assim, a presença de qualquer destas sequências tripeptídicas num polipéptido cria um potencial sítio de glicosilação. A glicosilação O-ligada refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose, ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina possam também ser utilizados.

A adição de sítios de glicosilação ao anticorpo é convenientemente conseguida alterando a sequência de aminoácidos de tal modo que contenha uma ou mais das sequências tripeptídicas acima descritas (para sítios de glicosilação N-ligados). A alteração pode também ser feita pela adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original (para sítios de glicosilação O-ligados).

Onde o anticorpo compreende uma região Fc, o carboidrato ligado a este pode ser alterado. Por exemplo, os anticorpos com uma estrutura de carboidrato madura que carecem de fucose ligada a uma região Fc do anticorpo estão descritos no Pedido de Patente U.S. N.º 2003/0157108 (Presta, L.). Veja-se também o documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Os anticorpos com uma N-

acetilglucosamina de bissecção (GlcNAc) no carboidrato ligado a uma região Fc do anticorpo são referenciados no documento WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* e Patente U.S. N.º 6.602.684, Umana *et al.* Os anticorpos com pelo menos um resíduo de galactose no oligossacárido ligado a uma região Fc do anticorpo são reportados no documento WO 1997/30087, Patel *et al.* Veja-se, também, os documentos WO 1998/58964 (Raju, S.) e WO 1999/22764 (Raju, S.) a respeito de anticorpos com carboidrato alterado ligado à região Fc do mesmo. Veja-se também o documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*) sobre moléculas de ligação a antigénios com glicosilação modificada.

A variante da glicosilação preferida compreende aqui uma região Fc, em que uma estrutura de carboidrato ligada à região Fc carece de fucose. Tais variantes têm função ADCC melhorada. Opcionalmente, a região Fc compreende ainda uma ou mais substituições de aminoácidos nesta que melhoram ainda mais a ADCC, por exemplo, substituições nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc (numeração de resíduos de Eu). Exemplos de publicações relacionadas com anticorpos "desfucosilados" ou "deficientes em fucose" incluem os documentos: U.S. 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; U.S. 2003/0115614; U.S. 2002/0164328; U.S. 2004/0093621; U.S. 2004/0132140; U.S. 2004/0110704; U.S. 2004/0110282; U.S. 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; Okazaki *et al.* J. Alol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Exemplos de linhas celulares de produção de anticorpos desfucosilados incluem células de CHO Lec13 deficientes em fucosilação proteica (Ripka *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Pedido de Patente U.S. N.º 2003/0157108 A1, Presta, L; e documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente no Exemplo 11), e linhas celulares *knockout*, tais como gene da alfa-1,6-

fucosiltransferase, *FUT8*, células de CHO *knockout* (Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

Um outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácidos. Estas variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo substituído por um resíduo diferente.

Os sítios de maior interesse para mutagénese substitutiva incluem as regiões hipervariáveis, mas as alterações nas FR também são contempladas. As substituições conservativas são mostradas na Tabela 1 sob o título de "substituições preferidas". Se tais substituições resultam numa alteração da atividade biológica, então alterações mais substanciais, denominadas na Tabela 1 "substituições exemplificativas", ou como adicionalmente descrito abaixo em referência a classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos rastreados.

Tabela 1

Resíduos original	Substituições exemplificativas	Substituições preferidas
Ala (A)	Val; Leu; He	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr

Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são conseguidas selecionando substituições que diferem significativamente no seu efeito na manutenção (a) da estrutura da cadeia principal do polipéptido na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou (c) do volume da cadeia lateral. Resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos baseados nas propriedades comuns das cadeias laterais:

- (1)hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2)hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3)ácidos: asp, glu;
- (4)básicos: his, lys, arg;
- (5)resíduos que influenciam a orientação da cadeia: gly, pro; e
- (6)aromáticos: trp, tyr, phe.

As substituições não conservativas implicarão a troca de um membro de uma destas classes para um outra classe.

Um tipo de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo de origem (por exemplo, um anticorpo humanizado ou humano). Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) selecionadas para posterior desenvolvimento terão propriedades biológicas melhoradas relativamente ao anticorpo de origem a partir do qual são geradas. Uma forma conveniente de gerar tais variantes de substituição envolve a maturação da afinidade utilizando expressão em fagos. Resumidamente, diversos sítios da região hipervariável (por exemplo, 6-7 sítios) são mutados para gerar todas as possíveis substituições de aminoácidos em cada sítio. Os anticorpos assim gerados são exibidos a partir de partículas de fagos filamentosas como fusões ao produto de

M13 do gene III empacotado dentro de cada partícula. As variantes expressas em fagos são então rastreadas para a sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação), como aqui divulgado. De modo a identificar os sítios das regiões hipervariáveis candidatos a modificação, mutagênese dirigida por alanina pode ser realizada para identificar os resíduos das regiões hipervariáveis que contribuem significativamente para a ligação ao antígeno. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristalina do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contacto entre o anticorpo e o antígeno. Tais resíduos de contacto e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas aqui elaboradas. Uma vez geradas tais variantes, o painel de variantes é submetido a rastreio como aqui descrito e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para posterior desenvolvimento.

As moléculas de ácido nucleico codificando variantes da sequência de aminoácidos do anticorpo são preparadas por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não estão limitados a, isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes da sequência de aminoácidos de ocorrência natural) ou preparação por mutagênese mediada por oligonucleótidos (ou sítio-direcionada), mutagênese por PCR, e mutagênese por cassetes de uma variante preparada precocemente ou uma versão não variante do anticorpo.

Pode ser desejável introduzir uma ou mais modificações de aminoácidos numa região Fc dos polipéptidos da imunoglobulina da invenção, gerando, deste modo, uma variante da região Fc. A variante da região Fc pode compreender uma sequência de uma região Fc humana (por exemplo, uma região Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) que compreende uma modificação nos aminoácidos (por exemplo,

uma substituição) em uma ou mais posições dos aminoácidos incluindo aquela de uma cisteína da charneira. De acordo com esta descrição e ensinamentos da técnica, é contemplado que em algumas formas de realização, um anticorpo utilizado nos métodos da invenção pode compreender uma ou mais alterações, em comparação com o anticorpo homólogo do tipo selvagem, por exemplo, na região Fc. Estes anticorpos, no entanto, deveriam reter substancialmente as mesmas características requeridas para utilidade terapêutica em comparação com o seu homólogo do tipo selvagem. Por exemplo, pensa-se que determinadas alterações podem ser feitas na região Fc, resultando em ligação de Clq e/ou citotoxicidade dependente do complemento (CDC) alteradas (isto é, quer melhoradas quer diminuídas), por exemplo, como descrito no documento WO 99/51642. Veja também Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); Patente U.S. N.º 5.648.260; Patente U.S. N.º 5.624.821; e documento WO 94/29351 relativos a outros exemplos de variantes da região Fc. Os documentos WO 00/42072 (Presta) e WO 2004/056312 (Lowman) descrevem variantes de anticorpos com ligação a FcRs melhorada ou diminuída. Veja-se, também, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Anticorpos com semividas aumentadas e ligação melhorada ao recetor Fc neonatal (FcRn), que é responsável pela transferência de IgG maternas para o feto (Guyeret *al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), são descritos no documento U.S. 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estes anticorpos compreendem uma região Fc com uma ou mais substituições na mesma que melhoram a ligação da região Fc ao FcRn. As variantes polipeptídicas com sequências de aminoácidos das regiões Fc alteradas e capacidade de ligação de Clq aumentada ou diminuída são descritas na patente U.S. N.º 6.194.551B1 e no documento WO 99/51642. Veja-se, também, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Derivados de anticorpos

Os anticorpos da presente invenção podem ainda ser modificados para conter frações não proteínicas adicionais que são conhecidas na técnica e estão prontamente disponíveis. Preferivelmente, as frações adequadas para derivatização do anticorpo são polímeros solúveis em água. Os exemplos não limitantes de polímeros solúveis em água incluem, mas não estão limitados a, polietilenoglicol (PEG), copolímeros de etilenoglicol/propilenoglicol, carboximetilcelulose, dextrano, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anidrido maleico, poliaminoácidos (quer homopolímeros quer copolímeros aleatórios), e dextrano ou poli(n-vinilpirrolidona)polietilenoglicol, homopolímeros de propilenoglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polióis polioxiethylados (por exemplo, glicerol), álcool polivinílico, e misturas destes. O propionaldeído de polietilenoglicol pode ter vantagens no fabrico devido à sua estabilidade em água. O polímero pode ser de qualquer massa molecular e pode ser ramificado ou não ramificado. O número de polímeros ligados ao anticorpo pode variar, e se mais do que um polímero está ligado, estes podem ser as mesmas moléculas ou diferentes. Em geral, o número e/ou tipo de polímeros utilizados para a derivatização pode ser determinada com base em considerações, incluindo, mas não limitadas a, as propriedades ou funções particulares do anticorpo a ser melhorado, se o derivado de anticorpo será usado numa terapia sob condições definidas, etc.

Rastreamento para anticorpos com propriedades desejadas

Os anticorpos da presente invenção podem ser caracterizados pelas suas propriedades físicas/químicas e funções biológicas por vários ensaios conhecidos na técnica. Em algumas formas de realização, os anticorpos são

caracterizados por qualquer um ou mais de redução ou bloqueio da ativação de EphB4, redução ou bloqueio da sinalização molecular a jusante de EphB4, redução ou bloqueio da ativação do ligando de EphB4, redução ou bloqueio da sinalização molecular a jusante do ligando de EphB4, interrupção ou bloqueio da ligação do ligando (por exemplo, efrina-B1, efrina-B2 e/ou efrina-B3) a EphB4, fosforilação de EphB4 e/ou multimerização de EphB4, e/ou fosforilação do ligando de EphB4, e/ou tratamento e/ou prevenção de um tumor, distúrbio proliferativo celular ou um cancro; e/ou tratamento ou prevenção de um distúrbio associado à expressão e/ou atividade de EphB4 (tal como expressão e/ou atividade de EphB4 aumentadas) de EphB4.

Os anticorpos purificados podem ser ainda caracterizados por uma série de ensaios incluindo, mas não limitados a, sequenciação N-terminal, análise de aminoácidos, cromatografia líquida de alta pressão de exclusão por tamanhos não desnaturante (HPLC), espectrometria de massa, cromatografia de troca iónica e digestão com papaína.

Em determinadas formas de realização da invenção, os anticorpos aqui produzidos são analisados quanto à sua atividade biológica. Em algumas formas de realização, os anticorpos da presente invenção são testados quanto à sua atividade de ligação ao antigénio. Os ensaios de ligação ao antigénio que são conhecidos na técnica e podem ser aqui utilizados incluem, sem limitação, quaisquer ensaios de ligação direta ou competitiva utilizando técnicas tais como western blots, radioimunoensaios, ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), imunoensaios tipo "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, imunoensaios fluorescente, e imunoensaios de proteína A. Ensaios de ligação ao antigénio ilustrativos são proporcionados abaixo na seção Exemplos.

Ainda numa outra forma de realização, a invenção proporciona anticorpos monoclonais anti-EphB4 que competem

com o anticorpos 30.35, 30.35.1D2 e/ou 30.35.2D8 para a ligação a EphB4. Tais anticorpos competidores incluem anticorpos que reconhecem um epítipo de EphB4 que é o mesmo ou se sobrepõe ao epítipo de EphB4 reconhecido pelo anticorpo 30.35, 30.35.1D2 e/ou 30.35.2D8. Tais anticorpos competidores podem ser obtidos por rastreamento dos sobrenadantes de hibridoma anti-EphB4 para ligação a EphB4 imobilizada em competição com anticorpo 30.35, 30.35.1D2 e/ou 30.35.2D8 marcado. Um sobrenadante de hibridoma contendo um anticorpo competidor reduzirá a quantidade de anticorpo marcado ligado detectada na mistura de ligação de competição sujeita, em comparação com a quantidade de anticorpo marcado ligado detectada numa mistura de ligação de controlo contendo anticorpo irrelevante (ou não). Qualquer dos ensaios de ligação de competição aqui descritos são adequados para utilização no procedimento anterior.

Num outro aspeto, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal anti-EphB4 que compreende uma ou mais HVRs (tal como 2, 3, 4, 5 e/ou 6) do anticorpo 30.35, 30.35.1D2 ou 30.35.2D8. Um anticorpo monoclonal anti-EphB4 que compreende uma ou mais HVRs de 30.35, 30.35.1D2 e/ou 30.35.2D8 pode ser construído por enxerto de uma ou mais HVRs de 30.35, 30.35.1D2 e/ou 30.35.2D8 numa sequência de anticorpo modelo, por exemplo, uma sequência de anticorpo humano que está mais próxima da correspondente sequência murina do anticorpo de origem, ou uma sequência de consenso de todos os anticorpos humanos no subgrupo particular da cadeia leve ou pesada do anticorpo de origem, e expressando a(s) sequência(s) quimérica(s) resultante(s) da região variável da cadeia leve e/ou da pesada, com ou sem sequência(s) da região constante acompanhante(s), em células hospedeiras recombinantes, como aqui descrito.

Os anticorpos anti-EphB4 da invenção que possuem as propriedades únicas aqui descritas podem ser obtidos por rastreamento de clones de hibridoma anti-EphB4 para as

propriedades desejadas através de qualquer método conveniente. Por exemplo, se um anticorpo monoclonal anti-EphB4 que bloqueia ou não bloqueia a ligação de ligandos de EphB4 a EphB4 é desejado, o anticorpo candidato pode ser testado num ensaio de competição de ligação, tal como um ELISA de ligação competitiva, em que os poços das placas são revestidos com EphB4, e uma solução de anticorpo num excesso do ligando Eph de interesse é colocada em camadas sobre as placas revestidas, e o anticorpo ligado é detetado enzimaticamente, por exemplo, contactando o anticorpo ligado com anticorpo anti-Ig conjugado com HRP ou anticorpo anti-Ig biotinilado e desenvolvendo a reação cromática com HRP, por exemplo, desenvolvendo placas com estreptavidina-HRP e/ou peróxido de hidrogénio e detetando a reação cromática com HRP por espectrofotometria a 490 nm com um leitor de placas de ELISA.

Se um anticorpo anti-EphB4 que inibe ou ativa a ativação de EphB4 é desejado, o anticorpo candidato pode ser testado num ensaio de fosforilação de EphB4. Tais ensaios são conhecidos na técnica e um tal ensaio é descrito na secção Exemplos.

Se um anticorpo anti-EphB4 que inibe o crescimento celular é desejado, o anticorpo candidato pode ser testado em ensaios *in vitro* e/ou *in vivo* que medem a inibição do crescimento celular. Tais ensaios são conhecidos na técnica e ainda aqui descritos e exemplificados.

Numa forma de realização, a presente invenção contempla um anticorpo alterado que possui algumas, mas não todas, as funções efetoras, as quais o tornam um candidato desejado para muitas aplicações nas quais a semivida do anticorpo *in vivo* é importante, contudo determinadas funções efetoras (tais como de complemento e ADCC) são desnecessárias ou deletérias. Em determinadas formas de realização, as atividades da Fc da imunoglobulina produzida são medidas para assegurar que apenas as propriedades

desejadas são mantidas. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* e/ou *in vivo* podem ser realizados para confirmar a redução/depleção das atividades de CDC e/ou ADCC. Por exemplo, ensaios de ligação ao recetor Fc (FcR) podem ser realizados para assegurar que o anticorpo carece de ligação a FcγR (daí, a provável falta de atividade ADCC), mas retém a capacidade de ligação ao FcRn. As principais células para mediar a ADCC, células NK, expressam apenas FcγRIII, ao passo que os monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR em células hematopoiéticas é resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Um exemplo de um ensaio *in vitro* para avaliar a atividade ADCC de uma molécula de interesse é descrito na Patente U.S. N.º 5.500.362 ou 5.821.337. As células efectoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células *Natural Killer* (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade ADCC de uma molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, num modelo animal tal como aquele divulgado em Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). Os ensaios de ligação de Clq também podem ser levados a cabo para confirmar que o anticorpo é incapaz de se ligar a Clq e, portanto, carece de atividade CDC. Para avaliar a ativação do complemento, um ensaio de CDC, por exemplo, como descrito em Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), pode ser realizado. Determinações da ligação a FcRn e eliminação/semivida *in vivo* também podem ser realizada utilizando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, aqueles descritos na secção Exemplos.

Vetores, células hospedeiras e métodos recombinantes

Para produção recombinante de um anticorpo da invenção, o ácido nucleico que o codifica é isolado e inserido num vetor replicável para clonagem adicional (amplificação do ADN) ou para expressão. O ADN codificando

o anticorpo é prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleótidos que são capazes de se ligarem especificamente a genes que codificam as cadeias pesadas e leves do anticorpo). Muitos vetores estão disponíveis. A escolha do vetor depende, em parte, da célula hospedeira a ser utilizada. Geralmente, as células hospedeiras preferidas são quer de origem procariótica quer eucariótica (geralmente de mamífero). Será apreciado que as regiões constantes de qualquer isótipo podem ser usadas para este propósito, incluindo as regiões constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, e que tais regiões constantes podem ser obtidas a partir de qualquer ser humano ou espécie animal.

a. Geração de anticorpos usando células hospedeiras procarióticas:

i. Construção do vetor

As sequências polinucleotídicas codificando os componentes polipeptídicos do anticorpo da invenção podem ser obtidas utilizando técnicas de recombinação padrão. As sequências polinucleotídicas desejadas podem ser isoladas e sequenciadas a partir de células produtoras de anticorpos, tais como células de hibridoma. Alternativamente, os polinucleótidos podem ser sintetizados utilizando um sintetizador de nucleótidos ou de técnicas de PCR. Uma vez obtidas, as sequências codificando os polipéptidos são inseridas num vetor recombinante capaz de replicar e expressar polinucleótidos heterólogos em hospedeiros procarióticos. Muitos vetores que estão disponíveis e são conhecidos na técnica podem ser usados para o propósito da presente invenção. A seleção de um vetor apropriado dependerá, principalmente, do tamanho dos ácidos nucleicos a serem inseridos no vetor e da célula hospedeira particular a ser transformada com o vetor. Cada vetor contém vários componentes, dependendo da sua função (amplificação ou expressão do polinucleótido heterólogo, ou

ambas) e da sua compatibilidade com a célula hospedeira particular na qual reside. Os componentes do vetor geralmente incluem, mas não estão limitados a: uma origem de replicação, um gene marcador de seleção, um promotor, um sítio de ligação ao ribossoma (RBS), uma sequência de sinal, o inserto de ácido nucleico heterólogo e uma sequência de terminação da transcrição.

Em geral, vetores plasmídeos contendo sequências de replicação e controlo as quais são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira são usados em conexão com estes hospedeiros. O vetor vulgarmente transporta um sítio de replicação, bem como sequências de marcação as quais são capazes de proporcionar seleção fenotípica em células transformadas. Por exemplo, *E. coli* é tipicamente transformada utilizando pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie de *E. coli*. O pBR322 contém genes que codificam a resistência à ampicilina (Amp) e à tetraciclina (Tet) e proporcionam assim meios fáceis para a identificação de células transformadas. O pBR322, seus derivados, ou outros plasmídeos microbianos ou bacteriófago podem também conter, ou serem modificados para conter, promotores que podem ser usados pelo organismo microbiano para a expressão de proteínas endógenas. Exemplos de derivados de pBR322 usados para expressão de anticorpos específicos são descritos em detalhe em Carter *et al.*, Patente dos U.S. N.º 5.648.237.

Em adição, vetores fagos contendo sequências de replicação e de controlo que são compatíveis com o microrganismo hospedeiro podem ser utilizados como vetores de transformação em conexão a estes hospedeiros. Por exemplo, um bacteriófago tal como λ GEM.TM.-11 pode ser utilizado para fazer um vetor recombinante que pode ser usado para transformar células hospedeiras susceptíveis, tais como LE392 de *E. coli*.

O vetor de expressão da invenção pode compreender dois ou mais pares promotor-cístron codificando cada um dos

componentes polipeptídicos. Um promotor é uma sequência reguladora não traduzida localizado a montante (5') de um cístron que modula a sua expressão. Os promotores procarióticos tipicamente caem dentro de duas classes, induzíveis e constitutivos. Promotor induzível é um promotor que inicia níveis aumentados de transcrição do cístron sob o seu controlo em resposta a alterações nas condições de cultura, por exemplo, a presença ou ausência de um nutriente ou uma alteração na temperatura.

Um grande número de promotores reconhecidos por uma variedade de potenciais células hospedeiras são bem conhecidos. O promotor selecionado pode ser operativamente ligado ao ADN do cístron que codifica a cadeia leve ou pesada por remoção do promotor do ADN fonte através da digestão com enzimas de restrição e inserindo a sequência do promotor isolada no vetor da invenção. Tanto a sequência do promotor nativa como muitos promotores heterólogos podem ser usados para dirigir a amplificação e/ou expressão dos genes alvo. Em algumas formas de realização, promotores heterólogos são utilizados, pois estes geralmente permitem uma maior transcrição e maiores rendimentos do gene alvo expresso em comparação ao promotor do polipéptido alvo nativo.

Os promotores adequados para utilização com hospedeiros procariotas incluem o promotor PhoA, os sistemas de promotores de β -galactamase e lactose, um sistema de promotor de triptofano (*trp*) e promotores híbridos tais como o promotor *tac* ou o *trc*. No entanto, outros promotores que são funcionais em bactérias (tais como outros promotores bacterianos ou de fagos conhecidos) são também adequados. As suas sequências de nucleótidos foram publicadas, possibilitando assim a um perito ligá-los operativamente a cístrons que codificam as cadeias leves e pesadas alvo (Siebenlist *et al.* (1980) *Cell* 20: 269) usando linkers ou adaptadores para fornecer qualquer sítio de

restrição necessário.

Num aspeto da invenção, cada cístron dentro do vetor recombinante compreende um componente da sequência sinal de secreção que dirige a translocação dos polipéptidos expressos através de uma membrana. Em geral, a sequência sinal pode ser um componente do vetor, ou pode ser uma parte do ADN do polipéptido alvo que é inserida no vetor. A sequência sinal selecionada para o propósito desta invenção deveria ser uma que seja reconhecida e processada (isto é, clivada por uma peptidase sinal) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procariotas que não reconhecem e processam as sequências sinal nativas para os polipéptidos heterólogos, a sequência sinal é substituída por uma sequência sinal procariótica selecionada, por exemplo, a partir do grupo que consiste na fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp, ou líderes de enterotoxina termoestável II (STII) , LamB, PhoE, PelB, OmpA e MBP. Numa forma de realização da invenção, as sequências sinal usadas em ambos os cístrons do sistema de expressão são sequências sinal de STII ou variantes destas.

Num outro aspeto, a produção das imunoglobulinas de acordo com a invenção pode ocorrer no citoplasma da célula hospedeira, e, deste modo, não requer a presença de sequências sinal de secreção dentro de cada cístron. A este respeito, as cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas são expressas, dobradas e montadas para formar imunoglobulinas funcionais dentro do citoplasma. Determinadas estirpes hospedeiras (por exemplo, as estirpes de *E. coli* *trxB*) fornecem condições citoplasmáticas que são favoráveis para a formação de ligações dissulfureto, permitindo, deste modo, a dobragem e montagem corretas de subunidades de proteínas expressas. Proba e Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

As células hospedeiras procarióticas adequadas para expressar os anticorpos da invenção incluem arqueobactérias

e eubactérias, tais como organismos gram-negativos ou gram-positivos. Os exemplos de bactérias úteis incluem *Escherichia* (por exemplo, *E. coli*), Bacilli (por exemplo, *B. subtilis*), enterobactérias, espécies de pseudomonas (por exemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, ou *Paracoccus*. Numa forma de realização, células gram-negativas são usadas. Numa forma de realização, as células de *E. coli* são usadas como hospedeiros para a invenção. Os exemplos de estirpes de *E. coli* incluem a estirpe W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; Depósito na ATCC No. 27 325) e derivados desta, incluindo a estirpe 33D3 que tem o genótipo de W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompTA(nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente U.S. N°. 5.639.635). Outras estirpes e derivados destas, tais como *E. coli* 294 (ATCC 31 446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31 537) e *E. coli* RV308(ATCC 31 608) são também adequadas. Estes exemplos são ilustrativos, em vez de limitantes. Os métodos para a construção de derivados de qualquer das bactérias acima mencionadas tendo genótipos definidos são conhecidos na técnica e descritos em, por exemplo, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). É geralmente necessário selecionar as bactérias apropriadas tendo em consideração a replicabilidade do replicação nas células de uma bactéria. Por exemplo, espécies de *E. coli*, *Serratia*, ou *Salmonella* podem ser adequadamente usadas como o hospedeiro quando plasmídeos bem conhecidos, tais como pBR322, pBR325, pACYC177 ou pKN410, são usados para fornecer o replicação. Tipicamente, a célula hospedeira deveria secretar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inibidores de proteases adicionais podem ser desejavelmente incorporados na cultura de células.

ii. Produção de anticorpos

As células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão descritos acima e cultivadas em meios nutritivos convencionais modificados como apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes, ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas.

Transformação significa introduzir ADN no hospedeiro procariota de modo a que o ADN seja replicável, tanto como um elemento extracromossomal como por integrante cromossomal. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é feita usando técnicas padrão apropriadas a tais células. O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio é geralmente usado para células bacterianas que contêm barreiras da parede celular substanciais. Um outro método para a transformação emprega polietilenoglicol/DMSO. Ainda um outra técnica usada é a eletroporação.

As células procariotas usadas para produzir os polipéptidos da invenção crescem em meios conhecidos na técnica e adequados para cultura das células hospedeiras selecionadas. Os exemplos de meios adequados incluem caldo Luria (LB) suplementado com nutrientes necessários. Em algumas formas de realização, o meio também contém um agente de seleção, escolhido com base na construção do vetor de expressão, para permitir seletivamente o crescimento de células procariotas contendo o vetor de expressão. Por exemplo, ampicilina é adicionada ao meio para o crescimento de células que expressam o gene de resistência à ampicilina.

Quaisquer suplementos necessários para além de carbono, nitrogénio e fontes de fosfato inorgânicas podem também ser incluídos em concentrações apropriadas, introduzidos isolados ou como uma mistura com um outro suplemento ou meio, tal como uma fonte de nitrogénio complexa. Opcionalmente, o meio de cultura pode conter um ou mais agentes redutores selecionados a partir do grupo

que consiste em glutationa, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol e ditiotreititol.

As células hospedeiras procariotas são cultivadas a temperaturas adequadas. Para o crescimento de *E. coli*, por exemplo, a temperatura preferida varia de cerca de 20 °C a cerca de 39 °C, mais preferivelmente de cerca de 25 °C a cerca de 37 °C, ainda mais preferivelmente a cerca de 30 °C. O pH do meio pode ser qualquer pH variando de cerca de 5 a cerca de 9, dependendo, principalmente, do organismo hospedeiro. Para *E. coli*, o pH é de preferivelmente de cerca de 6,8 a cerca de 7,4, e mais preferivelmente cerca de 7,0.

Se um promotor induzível é usado no vetor de expressão da invenção, a expressão proteica é induzida sob condições adequadas para a ativação do promotor. Num aspeto da invenção, promotores PhoA são usados para controlar a transcrição dos polipéptidos. Deste modo, as células hospedeiras transformadas são cultivadas num meio limitado em fosfato para indução. Preferivelmente, o meio limitado em fosfato é o meio CRAP (veja-se, por exemplo, Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Uma variedade de outros indutores pode ser utilizada de acordo com o constructo do vetor empregue, conforme é conhecido na técnica.

Numa forma de realização, os polipéptidos expressos da presente invenção são secretados no e recuperados a partir do periplasma das células hospedeiras. A recuperação de proteínas tipicamente envolve o fracionamento do microrganismo, geralmente por meios tais como choque osmótico, ultra-sons ou lise. Uma vez fracionadas as células, detritos celulares ou células completas podem ser removidos por centrifugação ou filtração. As proteínas podem ser ainda purificadas, por exemplo, por cromatografia de afinidade em resina. Alternativamente, as proteínas podem ser transportadas para o meio de cultura e nele

isoladas. As células podem ser removidas da cultura e o sobrenadante de cultura ser filtrado e concentrado para posterior purificação das proteínas produzidas. Os polipéptidos expressos podem ainda ser isolado e identificado usando métodos comumente conhecidos, tais como eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e ensaio Western blot.

Num aspeto da invenção, a produção de anticorpos é realizada em grande quantidade por um processo de fermentação. Vários procedimentos de fermentação descontínua alimentada em larga escala estão disponíveis para a produção de proteínas recombinantes. As fermentações a larga escala têm pelo menos 1000 litros de capacidade, preferivelmente cerca de 1 000 a 100 000 litros de capacidade. Estes fermentadores usam impulsores de agitador para distribuir oxigénio e nutrientes, especialmente glucose (a fonte de carbono/energia preferida). A fermentação a pequena escala refere-se, geralmente, à fermentação num fermentador que não tem mais de aproximadamente 100 litros de capacidade volumétrica, e pode variar de cerca de 1 litro a cerca de 100 litros.

Num processo de fermentação, a indução da expressão proteica é tipicamente iniciada depois das células terem crescido sob condições adequadas até uma densidade desejada, por exemplo, um OD550 de cerca de 180-220, fase na qual as células estão na fase estacionária inicial. Uma variedade de indutores pode ser utilizada de acordo com o constructo do vetor empregue, conforme é conhecido na técnica e descrito acima. As células podem crescer por períodos mais curtos antes da indução. As células são normalmente induzidas durante cerca de 12-50 horas, embora mais tempos de indução mais longos ou mais curtos podem ser usados.

Para melhorar o rendimento e qualidade da produção dos polipéptidos da invenção, várias condições de fermentação

podem ser modificadas. Por exemplo, para melhorar a montagem e dobragem corretas dos polipéptidos de anticorpos secretados, vetores adicionais sobreexpressando proteínas chaperonas, tais como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD e ou DsbG) ou FkpA (uma peptidilprolilil *cis*, *trans*-isomerase com atividade de chaperona) podem ser usados para co-transformar as células procariotas hospedeiras. As proteínas chaperonas têm demonstrado facilitar a dobragem e solubilidade corretas de proteínas heterólogas produzidas em células hospedeiras bacterianas. Chen *et al.* (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, Patente U.S. N.º 6.083.715; Georgiou *et al.*, Patente U.S. N.º 6.027.888; Bothmann e Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm e Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie *et al.* (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Para minimizar a proteólise de proteínas heterólogas expressas (especialmente aquelas que são proteoliticamente sensíveis), determinadas estirpes hospedeiras deficientes em enzimas proteolíticas podem ser usadas para a presente invenção. Por exemplo, as estirpes de células hospedeiras podem ser modificadas para efetuar uma mutação(ões) genética(s) nos genes que codificam proteases bacterianas conhecidas, tais como Protease III, OmpT, DegP, Tsp, Protease I, Protease Mi, Protease V, Protease VI e combinações destas. Algumas estirpes de *E. coli* deficientes em proteases estão disponíveis e descritas em, por exemplo, Joly *et al.* (1998), *supra*; Georgiou *et al.*, Patente U.S. N.º 5.264.365; Georgiou *et al.*, Patente U.S. N.º 5.508.192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

Numa forma de realização, estirpes de *E. coli* deficientes em enzimas proteolíticas e transformadas com plasmídeos sobreexpressando uma ou mais proteínas chaperonas são usadas como células hospedeiras no sistema de expressão da invenção.

iii. Purificação de anticorpos

Métodos padrão de purificação proteica conhecidos na técnica podem ser empregues. Os seguintes procedimentos são exemplificativos de procedimentos de purificação adequados: fracionamento em colunas de imunoafinidade ou troca iónica, precipitação com etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica ou numa resina de troca catiónica tal como DEAE, cromatofocagem, SDS-PAGE, precipitação com sulfato de amónio, e filtração em gel usando, por exemplo, Sephadex G-75.

Num aspeto, Proteína A imobilizada numa fase sólida é usada para a purificação de imunoafinidade dos produtos de anticorpo de comprimento completo da invenção. A Proteína A é uma proteína da parede celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se liga com uma elevada afinidade à região Fc de anticorpos. Lindmark *et al.* (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. A fase sólida à qual a Proteína A está imobilizada é preferivelmente uma coluna que compreende uma superfície de vidro ou sílica, mais preferivelmente uma coluna de vidro de porosidade controlada ou uma coluna de ácido silícico. Em algumas aplicações, a coluna foi revestida com um reagente, tal como glicerol, numa tentativa de impedir a aderência não específica de contaminantes.

Como primeiro passo de purificação, a preparação derivada da cultura celular conforme descrita acima, é aplicada sobre a Proteína A imobilizada na fase sólida para permitir a ligação específica do anticorpo de interesse à Proteína A. A fase sólida é, em seguida, lavada para remover os contaminantes não especificamente ligados à fase sólida. Finalmente, o anticorpo de interesse é recuperado da fase sólida por eluição.

b. Geração de anticorpos usando células hospedeiras eucariotas:

Os componentes do vetor geralmente incluem, mas não estão limitados a, um ou mais dos seguintes: uma sequência

sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento potencializador, um promotor, e uma sequência de terminação da transcrição.

(i) Componente da sequência sinal

Um vetor para utilização numa célula hospedeira eucariota podem também conter uma sequência sinal ou outro polipéptido com um sítio de clivagem específico na terminação N da proteína madura ou polipéptido de interesse. A sequência sinal heteróloga selecionada é preferivelmente uma que é reconhecida e processada (isto é, clivada por uma peptidase sinal) pela célula hospedeira. Na expressão em células de mamífero, as sequências sinal de mamífero bem como as líderes de secreção virais, por exemplo, o sinal gD de herpes simplex, estão disponíveis.

O ADN para tal região precursora é ligado num quadro de leitura ao ADN que codifica o anticorpo.

(ii) Origem de replicação

Geralmente, um componente da origem de replicação não é necessário para vetores de expressão em mamíferos. Por exemplo, a origem SV40 pode ser tipicamente usada apenas porque contém o promotor inicial.

(iii) Componente do gene de seleção

Os vetores de expressão e clonagem podem conter um gene de seleção, também chamado um marcador selecionável. Os genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, onde relevante, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos.

Um exemplo de um esquema de seleção utiliza um fármaco para deter o crescimento de uma célula hospedeira. Aquelas células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem uma proteína que confere resistência a fármacos e assim sobrevivem ao regime de seleção. Os

exemplos de tal seleção dominante usam os fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Um outro exemplo de marcadores selecionáveis adequados para células de mamífero são aqueles que possibilitam a identificação de células competentes para incorporar o ácido nucleico do anticorpo, tais como DHFR, timidina quinase, metalotioneína-I e -II, preferivelmente genes de metalotioneína de primata, adenosina desaminase, ornitina descarboxilase, etc.

Por exemplo, as células transformadas com o gene de seleção DHFR são, primeiro, identificadas por cultura de todos os transformantes num meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada aquando da utilização de DHFR de tipo selvagem é a linha de células de ovário de hamster chinês (CHO) deficiente em atividade de DHFR (por exemplo, CRL-9096 da ATCC).

Alternativamente, células hospedeiras (particularmente hospedeiras de tipo selvagem que contêm DHFR endógena) transformadas ou co-transformadas com sequências de ADN que codificam um anticorpo, proteína DHFR do tipo selvagem, e um outro marcador selecionável, tal como aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase (APH), podem ser selecionadas por crescimento celular em meio contendo um agente de seleção para o marcador selecionável, tal como um antibiótico aminoglicosídico, por exemplo, canamicina, neomicina, ou G418. Veja-se a Patente U.S. N.º 4.965.199.

(iv) Componente do promotor

Os vetores de expressão e clonagem contêm normalmente um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operativamente ligado ao ácido nucleico do polipéptido do anticorpo. Sequências de promotores são conhecidas para eucariotas. Virtualmente, todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases a montante do sítio onde a transcrição é iniciada.

Uma outra sequência encontrada 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT onde N pode ser qualquer nucleótido. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucarióticos está uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para a adição da cauda poli-A à extremidade 3' da sequência de codificação. Todas estas sequências são adequadamente inseridas em vetores de expressão eucarióticos.

A transcrição do polipéptido do anticorpo a partir de vetores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir dos genomas de vírus tais como o poliomavírus, vírus da varíola aviar, adenovírus (tal como Adenovírus 2), papilomavírus bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e vírus símio 40 (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, por exemplo, o promotor da actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, desde que estes promotores sejam compatíveis com os sistemas da célula hospedeira.

Os promotores de início e final do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição de SV40 que também contém a origem de replicação viral de SV40. O promotor inicial imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição E de HindIII. Um sistema para expressar ADN em hospedeiros mamíferos usando o papilomavírus bovino como um vetor é divulgado na Patente U.S. N.º 4.419.446. Uma modificação deste sistema é descrita na Patente U.S. N.º 4.601.978. Alternativamente, a repetição terminal longa do vírus do sarcoma de Rous pode ser usada como o promotor.

(v) Componente do elemento potencializador

A transcrição de ADN codificando o polipéptido do anticorpo desta invenção por eucariotas superiores é frequentemente aumentada inserindo uma sequência potencializadora no vetor. Muitas sequências

potencializadoras são agora conhecidas de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina). Tipicamente, contudo, um utilizará um potencializador de um vírus de células eucarióticas. Os exemplos incluem o potencializador do SV40 na última parte da origem de replicação (100-270 pb), o potencializador do promotor inicial de citomegalovírus, o potencializador de polioma na última parte da origem de replicação, e potencializadores de adenovírus. Veja-se também Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos potencializadores para ativação de promotores eucarióticos. O potencializador pode ser unido no vetor numa posição a 5' ou 3' à sequência de codificação do polipéptido do anticorpo, mas está preferivelmente localizado num sítio 5' do promotor.

(vi) Componente de terminação da transcrição

Os vetores de expressão usados em células hospedeiras eucarióticas também conterão tipicamente sequências necessárias para a terminação da transcrição e para a estabilização do mRNA. Tais sequências estão comumente disponíveis a partir de regiões não traduzidas 5' e, ocasionalmente, 3', de ADNs ou cADNs eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do mRNA que codifica o anticorpo.

Um componente de terminação da transcrição útil é a região de poliadenilação da hormona de crescimento bovina. Um componente de terminação da transcrição útil é a região de poliadenilação da hormona de crescimento bovina. Veja-se o documento WO 94/11026 e o vetor de expressão divulgado neste.

(vii) Eleição e transformação de células hospedeiras

As células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão do ADN nos vetores incluem aqui células eucarióticas superiores aqui descritas, incluindo células hospedeiras de vertebrados. A propagação de células de

vertebrado em cultura (cultura de tecidos) tornou-se um procedimento de rotina. Os exemplos de linhas de células hospedeiras mamíferas úteis são a linha CV1 de rim de macaco transformadas por SV40 (COS-7, CRL 1651 na ATCC); a linha de rim embrionário humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de rim de hamster bebé (BHK, CCL 10 na ATCC); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratinho (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1, CCL 70 na ATCC); células de rim de macaco-verde africano (VERO-76, CRL-1587 na ATCC); células de carcinoma cervical humano (HELA, CCL 2 na ATCC); células de rim canino (MDCK, CCL 34 na ATCC); células de fígado de ratazana (BRL 3A, CRL 1442 na ATCC); células de pulmão humano (W138, CCL 75 na ATCC); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de ratinho (MMT 060562, CCL51 na ATCC); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; uma linha de hepatoma humano (Hep G2).

As células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão ou clonagem para a produção de anticorpos descritos acima, e cultivadas em meios nutritivos convencionais modificados como apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes, ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas.

(viii) Cultura das células hospedeiras

As células hospedeiras usadas para produzir um anticorpo desta invenção podem ser cultivadas numa variedade de meios. Os meios comercialmente disponíveis, tais como F10 de Ham (Sigma), Meio Essencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma), são adequados para a cultura das células hospedeiras. Em adição, qualquer dos meios

descritos em Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem.102:255 (1980), Patentes U.S. N.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; ou 5,122,469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; ou Patente U.S. reeditada 30.985 pode ser usado como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormonas e/ou outros fatores de crescimento (tais como insulina, transferrina, ou fator de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleótidos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como o fármaco GENTAMYCIN™), elementos traçadores (definidos como compostos inorgânicos normalmente presentes em concentrações finais na gama micromolar), e glucose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos em concentrações apropriadas que seriam conhecidas pelos peritos na especialidade. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e semelhantes, são aquelas previamente usadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e serão evidentes para o perito na especialidade.

(ix) Purificação de anticorpo

Ao utilizar técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, ou diretamente secretado para o meio. Se o anticorpo é produzido intracelularmente, como primeira etapa, os detritos particulados, quer células hospedeiras quer fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Quando o anticorpo é secretado para o meio, os sobrenadantes de tais sistemas de expressão são geralmente, primeiro, concentrados usando um filtro de concentração de proteínas comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de proteases, tal como PMSF, pode ser incluído em qualquer das

etapas anteriores para inibir a proteólise e podem ser incluídos antibióticos para prevenir o crescimento de contaminantes adventícios.

A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada usando, por exemplo, cromatografia de hidroxapatita, eletroforese em gel, diálise e cromatografia de afinidade, com a cromatografia de afinidade sendo a técnica de purificação preferida. A adequabilidade da Proteína A como ligando de afinidade depende da espécie e isotipo de qualquer domínio Fc de imunoglobulina que está presente no anticorpo. A Proteína A pode ser utilizada para purificar anticorpos que estão baseados nas cadeias pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, ou $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). A Proteína G é recomendada para todos os isotipos de ratinho e para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligando de afinidade é ligado é, muito frequentemente, agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis, tais como vidro de porosidade controlada ou poli(estireno-divinil)benzeno, permitem taxas de fluxo mais rápidas e tempos de processamento mais curtos que os que podem ser alcançados com agarose. Quando o anticorpo compreende um domínio CH3, a resina Bakerbond ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, NJ) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação proteica, tais como fracionamento numa coluna de troca iônica, precipitação com etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina-SEPHAROSE™, cromatografia numa resina de troca aniônica ou catiônica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatofocagem, SDS-PAGE, e precipitação com sulfato de amônio, estão também disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado.

Na sequência de qualquer etapa(s) de purificação preliminar(es), a mistura compreendendo o anticorpo de

interesse e contaminantes pode ser submetida a cromatografia de interação hidrofóbica a pH baixo usando um tampão de eluição a um pH entre cerca de 2,5-4,5, preferivelmente realizada a baixas concentrações de sal (por exemplo, de cerca de 0-0,25 M de sal).

Imunoconjugados

A invenção também proporciona imunoconjugados (indiferentemente denominados "conjugados anticorpo-fármaco" ou "ADC"), que compreendem qualquer dos anticorpos anti-OX40L aqui descrito conjugados com um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, um fármaco, um agente de inibição do crescimento, uma toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos desta), ou um isótopo radioativo (isto é, um radioconjugado).

A utilização de conjugados anticorpo-fármaco para a administração local de agentes citotóxicos ou citostáticos, isto é, fármacos que matam ou inibem as células tumorais no tratamento de cancro (Syrigos e Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz e Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; Patente U.S. 4.975.278) permite a administração direcionada da fração de fármaco a tumores, e acumulação intracelular nestes, onde a administração sistémica destes agentes de fármacos não conjugados pode resultar em níveis inaceitáveis de toxicidade para as células normais, bem como para as células tumorais que se pretendem eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* pp (15 de março de 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," em *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (ed.s), pág. 475-506). Eficácia máxima com toxicidade mínima é, deste modo, pretendida. Tanto os anticorpos policlonais como os anticorpos monoclonais têm sido reportados como úteis

nestas estratégias (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Os fármacos utilizados nestes métodos incluem daunomicina, doxorubicina, metotrexato e vindesina (Rowland *et al.*, (1986) *supra*). As toxinas usadas em conjugados anticorpo-toxina incluem toxinas bacterianas, tais como a toxina da difteria, toxinas vegetais, tal como ricina, toxinas de moléculas pequenas, tais como geldanamicina (Mandler *et al.* (2000) *Jour. Do Nat. Câncer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler *et al.* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler *et al.* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinóides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), e caliqueamicina (Lode *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53; 3336-3342.) As toxinas podem efetuar os seus efeitos citotóxicos e citostáticos por mecanismos incluindo ligação a tubulina, ligação a ADN ou inibição de topoisomerasas. Alguns fármacos citotóxicos tendem a ser inativos ou menos ativos quando conjugados com anticorpos grandes ou ligandos de recetores proteicos.

ZEVALIN® (tiuxetano de ibritumomab, Biogen/Idec) é um conjugado anticorpo-radioisótopo composto por um anticorpo monoclonal IgG1 kapa de murino dirigido contra o antigénio CD20 encontrado na superfície de linfócitos B normais e malignos e radioisótopo ¹¹¹In ou ⁹⁰Y ligado por um quelante do linker de tioureia (Wiseman *et al.* (2000) *Eur Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman *et al.* (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig *et al.* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig *et al.* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Embora ZEVALIN tenha atividade contra linfoma não Hodgkin (NHL) de células B, a administração resulta em citopenias graves e prolongadas na maioria dos pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), um conjugado de anticorpo e fármaco composto por um anticorpo huCD33 ligado a caliqueamicina,

foi aprovado em 2000 para o tratamento de leucemia mielóide aguda por injeção (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; Patente U.S. N.º s 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), um conjugado de anticorpo e fármaco composto por anticorpo huC242 ligado através do linker de dissulfureto SPP à fração de fármaco maitansinóide, DM1, está a progredir para ensaios de Fase II para o tratamento de cancros que expressam CanAg, tal como do cólon, pancreático, gástrico e outros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), um conjugado de anticorpo e fármaco composto pelo anticorpo monoclonal anti-antigénio de membrana específico da próstata (PSMA) ligado à fração de fármaco maitansinóide, DM1, está sob desenvolvimento para o tratamento potencial de tumores protáticos. Os péptidos de auristatina, auristatina E (AE) e monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, foram conjugados com anticorpos monoclonais quiméricos cBR96 (específico para Lewis Y em carcinomas) e cAC10 (específico para CD30 em malignidades hematológicas) (Doronina *et al.* (2003) Nature Biotechnology, 21(7):778-784) e estão sob desenvolvimento terapêutico.

Os agentes quimioterapêuticos úteis na geração de imunoconjugados são aqui descritos (por exemplo, acima). As toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos destas que podem ser usados incluem cadeia de A da diftérica, fragmentos ativos não ligantes da toxina diftérica, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAPS), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Veja-se, por exemplo, o documento WO 93/21232 publicado a

28 de outubro de 1993. Uma variedade de radionuclídeos está disponível para a produção de anticorpos radioconjugados. Os exemplos incluem ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , e ^{186}Re . Os conjugados do anticorpo de agente citotóxico são obtido usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais, tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como HCl de dimetiladipimidato), ésteres ativos (tais como disuccinimidilsuberato), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos de *bis*-azido (tais como *bis*(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de *bis*-diazônio (tais como *bis*-(*p*-diazônio-benzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos de flúor *bis*-ativos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, a imunotoxina ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentacético (MX-DTPA) marcado com carbono 14 é um agente quelante exemplificativo para a conjugação de radionuclídeos com o anticorpo. Veja-se o documento WO 94/11026.

Os conjugados de um anticorpo com uma ou mais toxinas de moléculas pequenas, tais como uma caliqueamicina, maitansinóides, dolastatinas, aurostatins, um tricoteceno, e CC1065, e os derivados destas toxinas que têm atividade tóxica, estão também aqui contemplados.

i. Maitansina e maitansinóides

Em algumas formas de realização, o imunoconjugado compreende um anticorpo (de comprimento completo ou fragmentos) da invenção conjugado com uma ou mais moléculas de maitansinóides.

Os maitansinóides são inibidores mitóticos que atuam inibindo a polimerização da tubulina. A maitansina foi primeiramente isolada a partir do arbusto do este africano

Maytenus serrata (Patente U.S. N.º 3.896.111). Subsequentemente, descobriu-se que determinados micróbios também produzem maitansinóides, tal como maitansinol e ésteres de maitansinol de C-3 (Patente U.S. N.º 4.151.042). Maitansinol sintético e derivados e análogos deste são divulgados, por exemplo, nas Patentes U.S. N.ºs 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; e 4.371.533.

Frações de fármacos maitansinóides são frações de fármacos atrativas em conjugados de anticorpo e fármaco porque são: (i) relativamente acessíveis para preparar por fermentação ou modificação química, a derivatização de produtos de fermentação, (ii) passíveis de derivatização com grupos funcionais adequados para conjugação através dos linkers não-dissulfuretos a anticorpos, (iii) estáveis no plasma, e (iv) eficazes contra uma variedade de linhas celulares tumorais.

Os imunoconjugados contendo maitansinóides, métodos de obter os mesmos, e sua utilização terapêutica são divulgados, por exemplo, nas Patentes U.S. N.º 5.208.020, 5.416.064 e Patente Europeia EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 93:8618-8623 (1996) descreveram imunoconjugados compreendendo maitansinóide designado DM 1 ligado ao anticorpo monoclonal C242 dirigido contra cancro colorretal humano. O conjugado verificou-se ser altamente citotóxico para células do cancro do cólon cultivadas e mostrou atividade anti-tumoral num ensaio de crescimento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research. 52:127-131 (1992) descrevem imunoconjugados nos quais um maitansinóide foi conjugado através de um linker de dissulfureto ao anticorpo murino A7 que se liga a um antigénio nas linhas celulares de cancro do cólon humano, ou a outro anticorpo monoclonal murino TA.1 que se liga ao oncogene HER-2/neu. A

citotoxicidade do conjugado TA.1-maitansinóide foi testada *in vitro* na linha celular de cancro da mama humano SK-BR-3, a qual expressa 3×10^5 antigénios de superfície HER-2 por células. O conjugado de fármaco alcançou um grau de citotoxicidade semelhante à do fármaco maitansinóide livre, a qual poderia ser aumentada através do aumento do número de moléculas de maitansinóides por molécula de anticorpo. O conjugado A7-maitansinóide mostrou baixa citotoxicidade sistémica em ratinhos.

Os conjugados anticorpo-maitansinóide são preparados através da ligação química de um anticorpo a uma molécula de maitansinóide sem diminuir significativamente a atividade biológica quer do anticorpo quer da molécula de maitansinóide. Veja-se, por exemplo, a Patente U.S. N.º 5.208.020. Uma média de 3-4 moléculas de maitansinóide conjugadas por molécula de anticorpo tem mostrado eficácia em potenciar a citotoxicidade de células alvo sem afetar negativamente a função ou solubilidade do anticorpo, embora fosse de esperar que até mesmo uma molécula de toxina/anticorpo potenciase a citotoxicidade através da utilização de um anticorpo nu. Os maitansinóides são bem conhecidos na técnica e podem ser sintetizados por técnicas conhecidas ou isolados a partir de fontes naturais. Os maitansinóides adequados são divulgados, por exemplo, na Patente U.S. N.º 5.208.020 e noutras patentes e publicações de não patentes aqui acima referidas. Os maitansinóides preferidos são maitansinol e análogos de maitansinol modificados no anel aromático ou noutras posições da molécula de maitansinol, tais como vários ésteres de maitansinol.

Existem muitos grupos de ligação conhecidos na técnica para fazer conjugados anticorpo-maitansinóide, incluindo, por exemplo, aqueles divulgados na Patente U.S. N.º 5.208.020 ou na Patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, *Câncer Research* 52:127-131 (1992), e Pedido de Patente U.S.

N.º 10/960.602, depositado em 8 de outubro de 2004. Os conjugados anticorpo-maitansinóide compreendendo o componente do linker de SMCC podem ser preparados como divulgado no Pedido de Patente U.S. N.º 10/960.602, depositado em 8 de outubro de 2004. Os grupos de ligação incluem grupos dissulfureto, grupos tioéter, grupos lábeis de ácido, grupos fotolábeis, grupos lábeis de peptidases, ou grupos lábeis de esterases, como divulgado nas patentes acima identificadas, sendo os grupos dissulfureto e tioéter os preferidos. Os grupos de ligação adicionais são descritos e exemplificados aqui.

Os conjugados de anticorpo e maitansinóide podem ser obtidos usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais, tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como HCl de dimetiladipimidato), ésteres ativos (tais como disuccinimidilsuberato), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos de *bis*-azido (tais como *bis*(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de *bis*-diazônio (tais como *bis*-(*p*-diazóniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos de flúor *bis*-ativos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Os agentes de acoplamento particularmente preferidos incluem N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)) e N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar uma ligação dissulfureto.

O linker pode ser ligado à molécula de maitansinóide em várias posições, dependendo do tipo de linker. Por exemplo, uma ligação éster pode ser formada por reação com um grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamento convencionais. A reação pode ocorrer na posição C-3 que tem

um grupo hidroxilo, na posição C-14 modificada com hidroximetilo, na posição C-15 modificada com um grupo hidroxilo, e na posição C-20 que tem um grupo hidroxilo. Numa forma de realização preferida, a ligação é formada na posição C-3 de maitansinol ou de um análogo de maitansinol.

ii. Auristatinas e dolastatinas

Em algumas formas de realização, o imunoc conjugado compreende um anticorpo da invenção conjugado com dolastatinas ou análogos peptídicos de dolostatina e derivados, as auristatinas (Patentes U.S. N.º 5635483; 5780588). Dolastatinas e auristatinas mostraram interferir com as dinâmicas de microtúbulos, hidrólise de GTP, e divisão nuclear e celular (Woyke *et al.* (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) e têm atividade anti-cancerígena (documento U.S. 5663149) e anti-fúngica (Pettit *et al.* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42; 2961-2965.) A fração de fármaco de dolastatina ou auristatina pode ser ligada ao anticorpo através da terminação N (amino) ou da terminação C (carboxilo) da fração de fármaco peptídica (documento WO 02/088172).

Formas de realização de auristatina exemplificativas incluem as frações de fármaco de monometilauristatina DE e DF ligadas à terminação N, divulgadas em "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento U.S. N.º de Série 10/983.340, depositada em 5 de novembro de 2004.

Tipicamente, as frações de fármacos baseadas em péptidos podem ser preparadas por formação de uma ligação peptídica entre dois ou mais aminoácidos e/ou fragmentos peptídicos. Tais ligações peptídicas podem ser preparadas, por exemplo, de acordo com o método de síntese em fase líquida (veja-se E. Schröder e K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pág. 76-136, 1965, Academic Press) que é bem conhecido no campo da química de péptidos. As frações de fármacos de auristatina/dolastatina podem ser preparadas de

acordo como os métodos de: documento U.S. 5635483; documento U.S. 5780588; Pettit *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit *et al.* (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., *et al.* *Synthesis*, 1996, 719-725; e Pettit *et al.* (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863. Veja-se também Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento U.S. N.º de Série 10/983.340, depositado em 5 de novembro de 2004, (divulgando, por exemplo, linkers e métodos de preparação de compostos de monometilvalina tais como MMAE e MMAF conjugadas a linkers).

iii. Caliqueamicina

Noutras formas de realização, o imunocjugado compreende um anticorpo da invenção conjugado com uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família de antibióticos das caliqueamicinas é capaz de produzir quebras no ADN de cadeia dupla a concentrações sub-picomolares. Para a preparação de conjugados da família das caliqueamicinas, veja-se as Patentes U.S. N.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todos de American Cyanamid Company). Análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser usados incluem, mas não estão limitados a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG e θ'_1 (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode *et al.*, *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) e as patentes U.S. anteriormente mencionadas de American Cyanamid). Um outro fármaco anti-tumoral com que o anticorpo pode ser conjugado é QFA, que é um antifolato. Tanto a caliqueamicina como o QFA têm sítios de ação intracelulares e não atravessam facilmente a membrana plasmática. Deste modo, a captação celular destes agentes através de internalização mediada por anticorpo potencia grandemente os seus efeitos citotóxicos.

iv. Outros agentes citotóxicos

Outros agentes anti-tumorais que podem ser conjugados com os anticorpos da invenção incluem BCNU, estreptozoicina, vincristina e 5-fluorouracilo, a família de agentes conhecidos coletivamente por complexo LL-E33288 descrita nas Patentes U.S. 5.053.394, 5.770.710, bem como esperamicinas (Patente U.S. 5.877.296).

As toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos destas que podem ser usados incluem cadeia de A da diftérica, fragmentos ativos não ligantes da toxina diftérica, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAPS), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Veja-se, por exemplo, o documento WO 93/21232 publicado a 28 de outubro de 1993.

A presente invenção contempla ainda um imunoc conjugado formado entre um anticorpo e um composto com atividade nucleolítica (por exemplo, uma ribonuclease ou uma ADN endonuclease, tal como uma desoxirribonuclease; DNase).

Para a destruição seletiva do tumor, o anticorpo pode compreender um átomo altamente radioativo. Uma variedade de isótopos radioativos estão disponíveis para a produção de anticorpos radioconjugados. Os exemplos incluem At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioativos de Lu. Quando o conjugado é usado para detecção, este pode compreender um átomo radioativo para estudos de cintilografia, por exemplo, tc^{99m} ou I¹²³, ou um marcador de spin para ressonância magnética nuclear (NMR) (também conhecida como imagem por ressonância magnética, IRM), tal como novamente iodo-123, iodo-131, índio-111, flúor-19, carbono-13, azoto-15, oxigênio-17, gadolínio, manganês ou

ferro.

Os radiomarcadores ou outros podem ser incorporados no conjugado de formas conhecidas. Por exemplo, o péptido pode ser biossintetizado ou pode ser sintetizado por síntese química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adequados envolvendo, por exemplo, flúor-19 em vez de hidrogénio. Marcadores tais como Tc^{99m} ou I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} podem ser ligados através de um resíduo de cisteína no péptido. Ítrio-90 pode ser ligado através de um resíduo de lisina. O método de Iodogen (Fraker *et al.* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) pode ser utilizado para incorporar iodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) descreve outros métodos em detalhe.

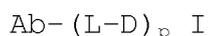
Os conjugados de anticorpo e agente citotóxico podem ser obtidos usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais, tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como HCl de dimetiladipimidato), ésteres ativos (tais como disuccinimidilsuberato), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos de *bis*-azido (tais como *bis*(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de *bis*-diazónio (tais como *bis*-(*p*-diazóniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos de flúor *bis*-ativos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, a imunotoxina ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentacético (MX-DTPA) marcado com carbono 14 é um agente quelante exemplificativo para a conjugação de radionuclídeos com o anticorpo. Veja-se o documento WO 94/11026. O linker pode ser um "linker clivável" que facilita a libertação do fármaco citotóxico na célula. Por

exemplo, um linker lábil de ácido, linker sensível a peptidase, linker fotolábil, linker dimetílico ou linker contendo dissulfureto (Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992); Patente U.S. N.º 5.208.020) pode ser usado.

Os compostos da invenção contemplam expressamente, mas não estão limitados a, ADC preparado com reagentes de ligação cruzada: 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, em Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., E.U.A). Veja-se as páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

v. Preparação de conjugados de anticorpo e fármaco

Nos conjugados de anticorpo e fármaco (ADC) da invenção, um anticorpo (Ab) é conjugado com uma ou mais frações de fármaco (D), por exemplo, cerca de 1 a cerca de 20 frações de fármaco por anticorpo, por meio de um linker (L). O ADC de Fórmula I pode ser preparado por várias vias, empregando reações de química orgânica, condições e reagentes conhecidos para aqueles peritos na especialidade, incluindo: (1) reação de um grupo nucleofílico de um anticorpo com um reagente de linker bivalente, para formar Ab-L, através de uma ligação covalente, seguida por reação com uma fração de fármaco D; e (2) reação de um grupo nucleofílico de uma fração de fármaco com um reagente de linker bivalente, para formar D-L, através de uma ligação covalente, seguida por reação com o grupo nucleofílico de um anticorpo. Métodos adicionais para preparar o ADC são aqui descritos.



O linker pode ser composto por um ou mais componentes do linker. Os componentes do linker exemplificativos

incluem 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenziloxicarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1 carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC"), e (4-iodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). Componentes adicionais do linker são bem conhecidos na técnica e alguns são aqui descritos. Veja-se também "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento U.S. N.º de Série 10/983.340, depositado em 5 de novembro de 2004.

Em algumas formas de realização, o linker compreende resíduos de aminoácidos. Componentes aminoácidos do linker exemplificativos incluem um dipéptido, um tripéptido, um tetrapéptido ou um pentapéptido. Os dipéptidos exemplificativos incluem: valina-citrulina (vc ou val-cit), alanina-fenilalanina (af ou ala-phe). Os tripéptidos exemplificativos incluem: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) e glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Os resíduos de aminoácidos que compreendem um componente aminoácido do linker incluem aqueles que ocorrem naturalmente, bem como aminoácidos menores e análogos de aminoácido que não ocorrem naturalmente, tais como citrulina. Os componentes aminoácidos do linker podem ser concebidos e otimizados na sua seletividade para clivagem enzimática por enzimas particulares, por exemplo, uma protease associada a tumor, catepsina B, C e D, ou uma plasmina protease.

Os grupos nucleófilos em anticorpos incluem, mas não estão limitados a: (i) grupos amina N-terminais, (ii) grupos amina de cadeia lateral, por exemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadeia lateral, por exemplo, cisteína, e (iv) grupos hidroxilo com açúcar ou amina, onde o anticorpo é glicosilado. Os grupos amina, tiol e hidroxilo são nucleofílicos e capazes de reagir para formar ligações

covalentes com grupos eletrofílicos em frações de linker e reagentes de linker incluindo: (i) ésteres ativos tais como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos, e halogenetos ácidos; (ii) halogenetos de alquilo e benzilo, tais como haloacetamidas; (iii) aldeídos, cetonas, grupos carboxilo e maleimida. Determinados anticorpos têm dissulfuretos intercadeias redutíveis, isto é, pontes de cisteína. Os anticorpos podem ser obtidos reativos para a conjugação com reagentes de linker por tratamento com um agente de redução, tal como DTT (ditiotreitól). Cada ponte de cisteína formará, então, teoricamente, dois nucleófilos tiol reativos. Grupos nucleofílicos adicionais podem ser introduzidos em anticorpos através da reação de lisinas com 2-iminotiolano (reagente de Traut) resultando na conversão de uma amina num tiol. Grupos tiol reativos podem ser introduzidos no anticorpo (ou fragmento deste) por introdução de um, dois, três, quatro, ou mais resíduos de cisteína (por exemplo, preparando anticorpos mutantes que compreendem um ou mais resíduos do aminoácido cisteína não nativo).

Os conjugados de anticorpo e fármaco da invenção podem também ser produzidos por modificação do anticorpo para introduzir frações eletrofílicas, que podem reagir com substituintes nucleofílicos no reagente de linker ou fármaco. Os açúcares de anticorpos glicosilados podem ser oxidados, por exemplo, com reagentes de oxidação de periodato, para formar grupos aldeído ou cetona que podem reagir com o grupo amina de reagentes de linker ou frações de fármaco. Os grupos base de Schiff de imina resultantes podem formar uma ligação estável, ou podem ser reduzidos, por exemplo, por reagentes de boroidreto para formar ligações de amina estáveis. Numa forma de realização, a reação da porção de carboidrato de um anticorpo glicosilado quer com galactose oxidase quer com meta-periodato de sódio pode produzir grupos carbonilo (aldeído e cetona) na

proteína que podem reagir com grupos apropriados no fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). Numa outra forma de realização, proteínas contendo resíduos de serina ou treonina N-terminais podem reagir com meta-periodato de sódio, resultando na produção de um aldeído no lugar do primeiro aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Tal aldeído pode reagir com a fração do fármaco ou nucleófilo do linker.

Da mesma forma, os grupos nucleofílicos numa fração do fármaco incluem, mas não estão limitados a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina e arilhidrazida capazes de reagir para formar ligações covalentes com os grupos eletrofílicos nas frações do linker ou reagentes do linker incluindo: (i) ésteres ativos tais como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos, e halogenetos ácidos; (ii) halogenetos de alquilo e benzilo, tais como haloacetamidas; (iii) aldeídos, cetonas, grupos carboxilo e maleimida.

Alternativamente, uma proteína de fusão compreendendo o anticorpo e agente citotóxico podem ser obtida, por exemplo, por meio de técnicas recombinantes ou síntese peptídica. O comprimento do ADN pode compreender as respectivas regiões de codificação das duas porções do conjugado, quer adjacentes uma à outra quer separadas por uma região que codifica um péptido do linker que não destrói as propriedades desejadas do conjugado.

Ainda numa outra forma de realização, o anticorpo pode ser conjugado com um "recetor" (tal como estreptavidina) para utilização num tratamento pré-dirigido ao tumor em que o conjugado anticorpo-recetor é administrado ao paciente, seguindo-se a remoção de conjugado não ligado da circulação utilizando um agente de limpeza e, em seguida, a administração de um "ligando" (por exemplo, avidina) que está conjugado com um agente citotóxico (por exemplo, um

radionucleótido).

Formulações farmacêuticas

Formulações terapêuticas compreendendo um anticorpo da invenção são preparadas para armazenamento, misturando o anticorpo que tem o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes opcionais fisiologicamente aceitáveis (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a edição (2000)), na forma de soluções aquosas, liofilizados ou outras formulações secas. Veículos, excipientes, ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os recetores nas dosagens e concentrações empregues, e incluem tampões tal como fosfato, citrato, histidina e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio; fenol, butilo ou álcool benzílico; alquilparabenos tais como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixa massa molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros carboidratos incluindo glucose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos Zn-proteína); e/ou tensioativos não iónicos tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietilenoglicol (PEG).

A formulação no presente documento pode também conter mais do que um composto ativo conforme necessário para a indicação particular a ser tratada, preferivelmente aqueles com atividades complementares que não se afetam

adversamente uns aos outros. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido.

Os princípios ativos podem também ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsula de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsula de poli(metilmetacrilato), respetivamente, em sistemas de administração de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nano-cápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a edição (2000).

As formulações a serem usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente conseguido por filtração através de membranas de filtração estéreis.

Preparações de libertação sustentada podem ser preparadas. Os exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo a imunoglobulina da invenção, matrizes as quais estão na forma de artigos moldados, por exemplo, películas, ou microcápsula. Exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(álcool vinílico)), poliácido láctico (Patente N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ -etil-L-glutamato, etileno vinilo acetato não degradável, copolímeros degradáveis de ácido glicólico-ácido láctico tais como o LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Enquanto polímeros tais como etileno vinilo acetato e ácido láctico-ácido glicólico possibilitam a libertação de moléculas durante mais de 100 dias, determinados hidrogéis libertam proteínas durante períodos

de tempo mais curtos. Quando imunoglobulinas encapsuladas permanecem no corpo durante muito tempo, estas podem desnaturar ou agregar-se como resultado de exposição a humidade a 37 °C, resultando numa perda de atividade biológica e possíveis alterações na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser concebidas para a estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação é descoberto ser intermolecular por formação de ligações S-S através da troca tio-dissulfureto, a estabilização pode ser alcançada por modificação de resíduos de sulfidrilo, liofilização de soluções ácidas, controlo do teor de humidade, utilização de aditivos apropriados, e desenvolvimento de composições de matriz polimérica específicas.

Utilizações

Um anticorpo da presente invenção pode ser usado em, por exemplo, métodos terapêuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Num aspeto, a invenção proporciona métodos para o tratamento ou prevenção de um tumor, um cancro, e/ou distúrbio proliferativo celular associados à expressão e/ou atividade aumentadas de EphB4, os métodos compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 a um sujeito em necessidade de tal tratamento.

Num aspeto, a invenção proporciona métodos para reduzir, inibir ou prevenir o crescimento de um tumor ou cancro, os métodos compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 a um sujeito em necessidade de tal tratamento.

A EphB4 tem sido implicada na orientação motora axonal e migração de células de crista neural no embrião em desenvolvimento. Deste modo, os anticorpos da invenção também são úteis no tratamento (incluindo a prevenção) de distúrbios, a patologia dos quais envolve a degeneração ou disfunção celular, tal como tratamento de vários (crónicos) distúrbios neurodegenerativos e lesões de células nervosas

agudas. Tais distúrbios neurodegenerativos incluem, sem limitação, neuropatias periféricas; distúrbios do neurónio motor, tais como esclerose lateral amiotrófica (ALS, doença de Lou Gehrig), paralisia de Bell, e várias condições envolvendo atrofia ou parálise muscular espinal; e outras doenças neurodegenerativas humanas, tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, esclerose múltipla, coreia de Huntington, síndrome de Down, surdez nervosa, e doença de Meniere, e lesões das células nervosas agudas, por exemplo, devido a trauma ou lesão da medula espinal.

Os anticorpos da invenção são também úteis para a inibição da angiogénese. Em algumas formas de realização, o local da angiogénese é um tumor ou cancro.

Num aspeto, a invenção proporciona métodos para a inibição da angiogénese que compreendem administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 a um sujeito em necessidade de tal tratamento.

Num aspeto, a invenção proporciona métodos para o tratamento de uma condição patológica associada à angiogénese que compreendem administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-EphB4 a um sujeito em necessidade de tal tratamento. Em algumas formas de realização, a condição patológica associada à angiogénese é um tumor, um cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular. Em algumas formas de realização, a condição patológica associada à angiogénese é uma doença neovascular intraocular.

Além disso, pelo menos alguns dos anticorpos da invenção podem ligar-se a antigénio de outras espécies. Consequentemente, os anticorpos da invenção podem ser usados para se ligarem com atividade específica ao antigénio, por exemplo, numa cultura celular contendo o antigénio, em sujeitos humanos ou noutros sujeitos mamíferos que têm o antigénio com o qual um anticorpo da

invenção realiza reação cruzada (por exemplo, chimpanzé, babuíno, sagüi, cinomólogos e rhesus, porco ou ratinho). Numa forma de realização, o anticorpo da invenção pode ser utilizado para inibir as atividades do antigénio, contactando o anticorpo com o antigénio de tal modo que a atividade do antigénio é inibida. Preferivelmente, o antigénio é uma molécula proteica humana.

Numa forma de realização, um anticorpo da invenção pode ser usado num método para se ligar a um antigénio num sujeito que sofre de um distúrbio associado à expressão e/ou atividade antigénica aumentada, compreendendo administrar ao sujeito um anticorpo da invenção de tal modo que o antigénio no sujeito é ligado. Preferivelmente, o antigénio é uma molécula proteica humana e o sujeito é um sujeito humano. Alternativamente, o sujeito pode ser um mamífero que expressa o antigénio ao qual um anticorpo da invenção se liga. Adicionalmente, o sujeito pode ser ainda um mamífero no qual o antigénio tenha sido introduzido (por exemplo, por administração do antigénio, ou por expressão de um transgene do antigénio). Um anticorpo da invenção pode ser administrado a um sujeito humano para propósitos terapêuticos. Além disso, um anticorpo da invenção pode ser administrado a um mamífero não humano que expressa um antigénio com o qual a imunoglobulina realiza reação cruzada (por exemplo, um primata, porco ou ratinho) para propósitos veterinários, ou como um modelo animal de uma doença humana. Em relação a este último, tais modelos animais podem ser úteis para avaliar a eficácia terapêutica dos anticorpos da invenção (por exemplo, testar as dosagens e cursos de tempo de administração).

Os anticorpos da invenção podem ser utilizados para tratar, inibir, retardar a progressão de, prevenir/retardar a recorrência de, melhorar ou prevenir doenças, distúrbios ou condições associados à expressão e/ou atividade de uma ou mais moléculas antigénicas.

Os distúrbios exemplificativos incluem carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia ou malignidades linfóides. Exemplos mais particulares de tais câncros incluem cancro de células escamosas (por exemplo, cancro de células escamosas epiteliais), cancro do pulmão incluindo cancro do pulmão de células pequenas, cancro do pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão, cancro do peritôneo, cancro hepatocelular, cancro gástrico ou do estômago incluindo cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro cervical, cancro do ovário, cancro hepático, cancro da bexiga, cancro do trato urinário, hepatoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro retal, cancro colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma das glândulas salivares, cancro do rim ou renal, cancro protático, cancro da vulva, cancro da tireóide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, melanoma, mieloma múltiplo e linfoma de células B, cancro cerebral bem como da cabeça e pescoço, e metástases associadas. Em algumas formas de realização, o cancro é selecionado a partir do grupo que consiste em cancro do pulmão de células pequenas, neuroblastomas, melanoma, carcinoma da mama, cancro gástrico, cancro colorretal (CRC), e carcinoma hepatocelular.

Em determinadas formas de realização, um imunoconjugado compreendendo um anticorpo conjugado a um ou mais agente citotóxicos é administrado ao paciente. Em algumas formas de realização, o imunoconjugado e/ou antigénio ao qual este está ligado é/são internalizado(s) pela célula, resultando em eficácia terapêutica aumentada do imunoconjugado para matar a célula alvo à qual se liga. Numa forma de realização, o agente citotóxico direciona-se ao ou interfere com o ácido nucleico na célula alvo. Numa forma de realização, o agente citotóxico direciona-se à ou interfere com a polimerização microtubular. Os exemplos de

tais agentes citotóxicos incluem qualquer dos agentes quimioterapêuticos aqui indicados (tal como um maitansinóide, auristatina, dolastatina, ou uma caliqueamicina), um isótopo radioativo, ou uma ribonuclease ou uma ADN endonuclease..

Os anticorpos da invenção podem ser usados quer isolados quer em combinação com outras composições numa terapia. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode ser co-administrado com um outro anticorpo, agente(s) quimioterapêutico(s) (incluindo *cocktails* de agentes quimioterapêuticos), outro(s) agente(s) citotóxico(s), agente(s) anti-angiogénico(s), citoquinas, e/ou agente(s) de inibição do crescimento. Na situação em que um anticorpo da invenção inibe o crescimento tumoral, pode ser particularmente desejável combiná-lo com um ou mais de outros agentes terapêuticos que também inibam o crescimento tumoral. Alternativamente, ou adicionalmente, o paciente pode receber terapia de radiação combinada (por exemplo, irradiação com feixe externo ou terapia com um agente radioativo marcado, tal como um anticorpo). Tais terapias combinadas indicadas acima incluem a administração combinada (onde os dois ou mais agentes são incluídos nas mesmas ou em diferentes formulações), e a administração separada, em cujo caso, a administração do anticorpo da invenção pode ocorrer antes, e/ou na sequência da administração da terapia ou terapias adjuvantes.

Terapias de combinação

Como indicado acima, a invenção proporciona terapias combinadas nas quais um anticorpo anti-EphB4 é administrado com uma outra terapia. Por exemplo, os anticorpos anti-EphB4 são usados em combinações com agentes terapêuticos anti-cancerígenos ou com um agente terapêutico anti-neovascularização para tratar várias condições neoplásticas ou não neoplásticas. Numa forma de realização, a condição neoplástica ou não-neoplástica é caracterizada por ser um

distúrbio patológico associado a angiogénese aberrante ou não desejada. O anticorpo anti-EphB4 pode ser administrado de forma seriada ou em combinação com um outro agente que é eficaz para aqueles propósitos, quer na mesma composição ou como composições separadas. Alternativamente, ou adicionalmente, múltiplos inibidores de EphB4 podem ser administrados.

A administração do anticorpo anti-EphB4 pode ser feita simultaneamente, por exemplo, como uma composição única ou como duas ou mais composições distintas, utilizando as mesmas ou diferentes vias de administração. Alternativamente, ou adicionalmente, a administração pode ser feita sequencialmente, em qualquer ordem. Em determinadas formas de realização, intervalos que variam de minutos a dias, ou semanas a meses, podem estar presentes entre as administrações das duas ou mais composições. Por exemplo, o agente anti-cancerígeno pode ser administrado primeiro, seguido pelo inibidor de EphB4. No entanto, a administração simultânea ou a administração do anticorpo anti-EphB4 primeiro é também contemplada.

As quantidades eficazes dos agentes terapêuticos administrados em combinação com um anticorpo anti-EphB4 estarão ao critério do médico ou veterinário. A administração e ajuste da dosagem são feitos para alcançar uma gestão máxima das condições a serem tratadas. A dose, adicionalmente, dependerá de fatores tais como o tipo de agente terapêutico a ser utilizado e o paciente específico a ser tratado. As dosagens adequadas para o agente anti-cancerígeno são aquelas atualmente utilizadas e podem ser diminuídas devido à ação combinada (sinergia) do agente anti-cancerígeno e anticorpo anti-EphB4. Em determinadas formas de realização, a combinação dos inibidores potencia a eficácia de um único inibidor. O termo "potenciar" refere-se a uma melhoria na eficácia de um agente terapêutico na sua dose comum ou aprovada.

Tipicamente, os anticorpos anti-EphB4 e agentes anti-cancerígenos são adequados para as mesmas ou semelhantes doenças para bloquear ou reduzir um distúrbio patológico, tal como crescimento tumoral ou crescimento de uma célula cancerígena. Numa forma de realização o agente anti-cancerígeno é um agente anti-angiogénese.

A terapia anti-angiogénica em relação a cancro é uma estratégia de tratamento de cancro com o objetivo de inibir o desenvolvimento de vasos sanguíneos tumorais necessários para providenciar nutrientes de suporte ao crescimento tumoral. Porque a angiogénese está envolvida tanto no crescimento tumoral primário como metastático, o tratamento anti-angiogénico proporcionado pela invenção é capaz de inibir o crescimento neoplástico do tumor no local primário, bem como prevenir a metastização de tumores nos locais secundários, permitindo, assim, o ataque dos tumores por outros agentes terapêuticos.

Muitos agentes anti-angiogénicos têm sido identificados e são conhecidos nas técnicas, incluindo aqueles aqui listado, por exemplo, listado em Definições, e por, por exemplo, Carmeliet e Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara *et al.*, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3:391-400 (2004); e Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003). Veja-se também o Pedido de Patente U.S. 20030055006. Numa forma de realização, um anticorpo anti-EphB4 é usado em combinação com um anticorpo (ou fragmento) neutralizante anti-VEGF e/ou um outro antagonista de VEGF ou um antagonista do recetor VEGF, incluindo, mas não limitado a, por exemplo, recetor VEGF solúvel (por exemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilinas (por exemplo, NRP1, NRP2)) fragmentos, aptâmeros capazes de bloquear o VEGF ou VEGFR, anticorpos anti-VEGFR neutralizantes, inibidores de baixa massa molecular de tirosina cinases de VEGFR (RTK), estratégias anti-sentido para o VEGF, ribozimas contra VEGF ou recetores VEGF, variantes

antagonistas de VEGF; e quaisquer combinações dos mesmos. Alternativamente, ou adicionalmente, dois ou mais inibidores da angiogénese podem opcionalmente ser co-administrados ao paciente, em adição a um antagonista de VEGF e outro agente. Em determinadas formas de realização, um ou mais agentes terapêuticos adicionais, por exemplo, agentes anti-cancerígenos, podem ser administrados em combinação com o anticorpo anti-EphB4, o antagonista de VEGF, e um agente anti-angiogénese.

Em determinados aspetos da invenção, outros agentes terapêuticos úteis para terapia tumoral de combinação com um anticorpo anti-EphB4 incluem outras terapias de cancro, (por exemplo, cirurgia, tratamentos radiológicos (por exemplo, envolvendo irradiação ou administração de substâncias radioativas), quimioterapia, tratamento com agentes anti-cancerígenos listados aqui e conhecidos na técnica, ou combinações destes). Alternativamente, ou adicionalmente, dois ou mais anticorpos ligando-se ao mesmo ou a dois ou mais antigénios diferentes aqui divulgados podem ser co-administrados ao paciente. Por vezes, pode ser benéfico administrar também uma ou mais citocinas ao paciente.

Agentes quimioterapêuticos

Em determinados aspetos, a invenção proporciona um método para bloquear ou reduzir o crescimento tumoral ou crescimento de uma célula cancerígena, por administração de quantidades eficazes de um antagonista de EphB4 e/ou inibidor(s) da angiogénese e um ou mais agentes quimioterapêuticos a um paciente susceptível a, ou diagnosticado com, cancro. Uma variedade de agentes quimioterapêuticos podem ser utilizados nos métodos de tratamentos combinados da invenção. Uma lista exemplificativa e não limitante de agentes quimioterapêuticos contemplados é aqui proporcionada em "Definições".

Como será entendido por aqueles peritos na especialidade, as doses apropriadas de agentes quimioterapêuticos estarão, geralmente, em torno daquelas já empregues em terapias clínicas em que os quimioterapêuticos são administrados isolados ou em combinação com outros quimioterapêuticos. Uma variação na dosagem provavelmente ocorrerá dependendo da condição a ser tratada. O médico que administra o tratamento será capaz de determinar a dose apropriada para o sujeito individual.

Recidiva de crescimento tumoral

A invenção também proporciona métodos e composições para a inibição ou prevenção da recidiva de crescimento tumoral ou recidiva de crescimento de células cancerígenas. A recidiva de crescimento tumoral ou recidiva de crescimento de células cancerígenas é usada para descrever uma condição na qual pacientes submetidos ou tratados com uma ou mais terapias atualmente disponíveis (por exemplo, terapias de cancro, tais como quimioterapia, terapia de radiação, cirurgia, terapia hormonal e/ou terapia biológica/imunoterapia, terapia com anticorpo anti-VEGF, particularmente um regime terapêutico padrão para o cancro particular) que não é clinicamente adequada para tratar os pacientes ou os pacientes já não estão recebendo qualquer efeito benéfico da terapia de tal modo que estes pacientes necessitam de uma terapia eficaz adicional. Como aqui utilizada, a frase que também pode referir-se a uma condição de paciente "não responsivo/refratário", por exemplo, descreve que pacientes que respondem à terapia ainda sofrem de efeitos secundários, desenvolvem resistência, não respondem à terapia, não respondem satisfatoriamente à terapia, etc. Em várias formas de realização, um cancro é recidivo no crescimento tumoral ou recidivo no crescimento de células cancerígenas no caso em que o número de células cancerígenas não foi significativamente reduzido, ou aumentou, ou o tamanho

tumoral não foi significativamente reduzido, ou aumentou, ou qualquer redução adicional no tamanho ou no número de células cancerígenas falha. A determinação de se as células cancerígenas são recidivas no crescimento tumoral ou recidivas no crescimento de células cancerígenas pode ser feita *in vivo* ou *in vitro* por qualquer método conhecido na técnica para avaliar a eficácia do tratamento sobre as células cancerígenas, utilizando os significados aceitos na técnica de "recidiva" ou "refratário" ou "não responsivo" neste contexto. Um tumor resistente ao tratamento com anti-VEGF é um exemplo de uma recidiva de crescimento tumoral.

A invenção proporciona métodos para bloquear ou reduzir a recidiva de crescimento tumoral ou recidiva de crescimento de células cancerígenas num sujeito por administração de um ou mais anticorpos anti-EphB4 para bloquear ou reduzir a recidiva de crescimento tumoral ou recidiva de crescimento de células cancerígenas no sujeito. Em determinadas formas de realização, o antagonista pode ser administrado subsequentemente à terapêutica de cancro. Em determinadas formas de realização, os anticorpos anti-EphB4 são administrados simultaneamente com a terapia de cancro. Alternativamente, ou adicionalmente, a terapia com anticorpo anti-EphB4 alterna com uma outra terapia de cancro, que podem ser realizadas em qualquer ordem. A invenção também engloba métodos para a administração de um ou mais anticorpos de inibição para prevenir o aparecimento ou recorrência de cancro em pacientes predispostos a ter cancro. Geralmente, o sujeito era ou é concorrentemente submetido a terapia de cancro. Numa forma de realização, a terapia de cancro é o tratamento com um agente anti-angiogénese, por exemplo, um antagonista de VEGF. O agente anti-angiogénese inclui aqueles conhecidos na técnica e aqueles encontrados aqui nas Definições. Numa forma de realização, o agente anti-angiogénese é um anticorpo ou fragmento neutralizante anti-VEGF (por exemplo, A4.6.1

humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Veja-se, por exemplo, as Patentes U.S. 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; documento WO 98/45332; documento WO 96/30046; documento WO 94/10202; documento EP 0666868B1; Pedidos de Patentes U.S. 20030206899, 20030190317, 20030203409, e 20050112126; Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004); e documento WO 2005012359. Agentes adicionais podem ser administrados em combinação com um antagonista de VEGF e um anticorpo anti-EphB4 para bloquear ou reduzir a recidiva de crescimento tumoral ou recidiva de crescimento de células cancerígenas, por exemplo, veja-se a secção aqui intitulada Terapias de Combinação.

O anticorpo da invenção (e agente terapêutico adjunto) é/são administrado(s) por qualquer meio adequado, incluindo administração parentérica, subcutânea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, e, se desejado para tratamento local, intralesional. Infusões parentéricas incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. Em adição, o anticorpo é adequadamente administrado por infusão pulsátil, particularmente com doses decrescentes do anticorpo. A dosagem pode ser por qualquer via adequada, por exemplo, através de injeções, tais como injeções intravenosas ou subcutâneas, dependendo, em parte, de se a administração é breve ou crónica.

A composição do anticorpo da invenção será formulada, doseada e administrada de um modo consistente com a boa prática médica. Os fatores de consideração neste contexto incluem o distúrbio particular a ser tratado, o mamífero particular a ser tratado, a condição clínica do paciente individual, a causa do distúrbio, o local de administração do agente, o método de administração, o programa de administração, e outros fatores conhecidos dos praticantes de medicina. O anticorpo não necessita ser, mas é

opcionalmente formulado com um ou mais agentes atualmente utilizados para prevenir ou tratar o distúrbio em questão. A quantidade eficaz dos tais outros agentes depende da quantidade de anticorpos da invenção presentes na formulação, do tipo de distúrbio ou tratamento, e de outros fatores discutidos acima. Estes são geralmente usados nas mesmas dosagens e vias de administração como acima utilizados ou cerca de 1 a 99% das dosagens empregues até então.

Para a prevenção ou tratamento de uma doença, a dosagem apropriada de uma anticorpo da invenção (quando usado isolado ou em combinação com outros agentes, tais como agente quimioterapêuticos) dependerá do tipo de doença a ser tratada, do tipo de anticorpo, da gravidade e curso da doença, se o fármaco é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, historial clínico do paciente e resposta ao anticorpo, e do critério do médico assistente. A anticorpo é adequadamente administrado ao paciente numa vez ou durante uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e gravidade da doença, cerca de 1 mg/kg a 15 mg/kg (por exemplo, 0,1 mg/kg - 10 mg/kg) de anticorpo é uma dosagem inicial candidata para administração ao paciente, quer, por exemplo, em uma ou mais administrações separadas, ou por infusão contínua. Uma dosagem diária típica pode variar de cerca de 1 mg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Para administrações repetidas durante vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até ocorrer uma supressão desejada dos sintomas da doença. Uma dose exemplificativa do anticorpo estaria no intervalo de cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. Assim, uma ou mais doses de cerca de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg ou 10 mg/kg (ou qualquer combinação destas) podem ser administrados ao paciente. Tais doses podem ser administradas intermitentemente, por exemplo, a cada semana ou a cada

três semanas (por exemplo, de tal modo que o doente recebe desde cerca de duas a cerca de vinte, por exemplo, cerca de seis doses do anticorpo). Uma dose de carga superior inicial, seguida por uma ou mais doses inferiores podem ser administradas. Um regime de dosagem exemplificativo compreende a administração de uma dose de carga inicial de cerca de 4 mg/kg, seguida por uma dose de manutenção semanal de cerca de 2 mg/kg do anticorpo. Contudo, outros regimes de dosagem podem ser úteis. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado por técnicas e ensaios convencionais.

Os anticorpos anti-EphB4 da invenção são úteis em ensaios de deteção de expressão de EphB4 (tais como ensaios de diagnóstico ou prognóstico) em células ou tecidos específicos, em que os anticorpos são marcados conforme descrito abaixo e/ou são imobilizados numa matriz insolúvel.

Num outro aspeto, a invenção proporciona métodos para deteção de EphB4, os métodos compreendendo a deteção do complexo EphB4-anticorpo anti-EphB4 na amostra. O termo "deteção" como aqui utilizado, inclui a deteção qualitativa e/ou quantitativa (medindo níveis) com ou sem referência a um controlo.

Num outro aspeto, a invenção proporciona métodos para o diagnóstico de um distúrbio associado à expressão e/ou atividade de EphB4, os métodos compreendendo detetar um complexo EphB4-anticorpo anti-EphB4 numa amostra biológica de um paciente que tem ou suspeita-se ter o distúrbio. Em algumas formas de realização, a expressão de EphB4 é uma expressão aumentada ou expressão anormal (não desejada). Em algumas formas de realização, o distúrbio é um tumor, cancro, e/ou um distúrbio proliferativo celular.

Num outro aspeto, a invenção proporciona qualquer dos anticorpos anti-EphB4 aqui descritos, em que o anticorpo anti-EphB4 compreende um marcador detetável.

Num outro aspeto, a invenção proporciona um complexo de qualquer dos anticorpos anti-EphB4 aqui descritos e EphB4. Em algumas formas de realização, o complexo está *in vivo* ou *in vitro*. Em algumas formas de realização, o complexo compreende uma célula cancerígena. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-EphB4 é marcado de forma detetável.

Os anticorpos anti-EphB4 podem ser usados para a deteção de EphB4 em qualquer um de uma série de métodos de ensaio de deteção bem conhecidos. Por exemplo, uma amostra biológica pode ser analisada para EphB4 através da obtenção da amostra a partir de uma fonte desejada, mistura da amostra com anticorpo anti-EphB4 para permitir que o anticorpo forme um complexo anticorpo/EphB4 com qualquer EphB4 presente na mistura, e deteção de qualquer complexo anticorpo/EphB4 presente na mistura. A amostra biológica pode ser preparada para ensaio por métodos conhecidos na técnica que são adequados para a amostra particular. Os métodos de mistura da amostra com anticorpos e os métodos de deteção do complexos anticorpo/EphB4 são escolhidos de acordo com o tipo de ensaio utilizado. Tais ensaios incluem imunohistoquímica, ensaios competitivos e tipo sanduíche, e ensaios de inibição estéricos.

Os métodos analíticos para EphB4 utilizam todos um ou mais dos seguintes reagentes: análogo de EphB4 marcado, análogo de EphB4 imobilizado, anticorpo anti-EphB4 marcado, anticorpo anti-EphB4 imobilizado e conjugados estéricos. Os reagentes marcados também são conhecidos como "traçadores".

O marcador utilizado é qualquer funcionalmente detetável que não interfere com a ligação de EphB4 e anticorpo anti-EphB4. Numerosos marcadores são conhecidos para utilização em imunoensaio, os exemplos incluindo frações que podem ser detetadas diretamente, tais como marcadores de fluorocromo, quimioluminescentes, e radioativos, bem como frações, tais como enzimas, que devem

ser reagidas ou derivatizadas para serem detetadas. Os exemplos de tais marcadores incluem:

O marcador utilizado é qualquer funcionalmente detetável que não interfere com a ligação de EphB4 e anticorpo anti-EphB4. Numerosos marcadores são conhecidos para utilização em imunoensaio, os exemplos incluindo frações que podem ser detetadas diretamente, tais como marcadores de fluorocromo, quimioluminescentes, e radioativos, bem como frações, tais como enzimas, que devem ser reagidas ou derivatizadas para serem detetadas. Os exemplos de tais marcadores incluem os radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , e ^{131}I , fluoróforos tais como quelantes terrosos raros ou fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferases, por exemplo, luciferase de vaga-lime e luciferase bacteriana (Patente U.S. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, peroxidase de rábano (HRP), fosfatase alcalina, β -galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacaridoxidasas, por exemplo, glucose oxidase, galactose oxidase, e glucose-6-fosfato desidrogenase, oxidases heterocíclicas tais como uricase e xantina oxidase, acopladas com uma enzima que emprega peróxido de hidrogénio para oxidar um precursor corante tal como HRP, lactoperoxidase, ou microperoxidase, biotina/avidina, marcadores de *spin*, marcadores de bacteriofagos, radicais livres estáveis, e semelhantes.

Métodos convencionais estão disponíveis para ligar covalentemente estes marcadores a proteínas ou polipéptidos. Por exemplo, agentes de acoplamento tais como dialdeídos, carbodiimidas, dimaleimidas, *bis*-imidatos, benzidina *bis*-diazotada, semelhantes, podem ser usados para etiquetar os anticorpos com os marcadores fluorescentes, quimioluminescentes e enzimáticos acima descritos. Veja-se, por exemplo, as Patentes U.S. N.º 3.940.475 (fluorimetria)

e 3.645.090 (enzimas); Hunter *et al.*, *Nature*, 144: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); e Nygren, J. *Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Os marcadores aqui preferidos são enzimas tais como peroxidase de rábano e fosfatase alcalina. A conjugação de tal marcador, incluindo as enzimas, ao anticorpo é um procedimento de manipulação padrão para um perito em técnicas de imunoensaio. Veja-se, por exemplo, O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," em *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, Nova York, Nova York, 1981), pág. 147-166.

A imobilização de reagentes é necessária para determinados métodos de ensaio. A imobilização envolve a separação do anticorpo anti-EphB4 de qualquer EphB4 que permaneça livre em solução. Isto é convencionalmente realizado tanto por insolubilização do anticorpo anti-EphB4 ou análogo de EphB4 antes do procedimento do ensaio, como por adsorção a uma matriz insolúvel em água ou superfície (Bennich *et al.*, documento U.S. 3.720.760), por acoplamento covalente (por exemplo, usando ligação cruzada com glutaraldeído), ou por posterior insolubilização do anticorpo anti-EphB4 ou análogo de EphB4, por exemplo, por imunoprecipitação.

A expressão de proteínas numa amostra pode ser examinada utilizando protocolos de imunohistoquímica e coloração. A coloração imunohistoquímica de secções tecidulares mostrou ser um método fiável de avaliar ou detetar a presença de proteínas numa amostra. As técnicas de imunohistoquímica ("IHC") utilizam um anticorpo para sondar e visualizar antigénios celulares *in situ*, geralmente por meio de métodos cromogénicos ou fluorescentes. Para preparação da amostra, pode ser utilizada uma amostra tecidular ou celular de um mamífero

(tipicamente um paciente humano). Exemplos de amostras incluem, mas não estão limitadas a, células cancerígenas, tais como células de cancro do cólon, mama, próstata, ovário, pulmão, estômago, pâncreas, linfoma, e leucemia. A amostra pode ser obtida por uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica incluindo, mas não limitados a, excisão cirúrgica, aspiração ou biópsia. O tecido pode ser fresco ou congelado. Numa forma de realização, a amostra é fixada e embebida em parafina ou semelhante. A amostra tecidual pode ser fixada (isto é, conservada) por metodologia convencional. Um perito na especialidade apreciará que a escolha de um fixador é determinada pelo propósito para o qual a amostra está a ser histologicamente corada ou analisada de outra forma. Um perito na especialidade também apreciará que o comprimento de fixação depende do tamanho da amostra tecidual e do fixador utilizado.

IHC pode ser realizada em combinação com técnicas adicionais tais como coloração morfológica e/ou hibridação *in situ* de fluorescência. Dois métodos gerais de IHC estão disponíveis; ensaios diretos e indiretos. De acordo com o primeiro ensaio, a ligação de anticorpo ao antigénio alvo (por exemplo, EphB4) é determinada diretamente. Este ensaio direto utiliza um reagente marcado, tal como uma etiqueta fluorescente ou um anticorpo primário marcado com enzima, que pode ser visualizado sem interação adicional de anticorpo. Num ensaio indireto típico, o anticorpo primário não conjugado liga-se ao antigénio e, em seguida, um anticorpo secundário marcado liga-se ao anticorpo primário. Quando o anticorpo secundário é conjugado com um marcador enzimático, um substrato cromogénico ou fluorogénico é adicionado para proporcionar a visualização do antigénio. Amplificação de sinal ocorre porque diversos anticorpos secundários podem reagir com diferentes epitopos no anticorpo primário.

O anticorpo primário e/ou o secundário utilizados para imunohistoquímica serão tipicamente marcados com uma fração detetável. Numerosos marcadores estão disponíveis, os quais podem ser geralmente agrupados nas seguintes categorias:

Para além dos procedimentos de preparação da amostra discutidos acima, o tratamento adicional da secção tecidual antes de, durante ou depois de IHC pode ser desejado. Por exemplo, métodos de recuperação de epitopos, tal como aquecimento da amostra tecidual em tampão citrato, podem ser efetuados (veja-se, por exemplo, Leong *et al.* Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)).

Na sequência de uma etapa de bloqueio opcional, a secção tecidual é exposta ao anticorpo primário por um período de tempo suficiente e sob condições adequadas de tal modo que o anticorpo primário liga-se ao antigénio da proteína alvo na amostra tecidual. As condições apropriadas para alcançar este objetivo podem ser determinadas por experimentação de rotina. A extensão de ligação do anticorpo à amostra é determinada utilizando qualquer um dos marcadores detetáveis acima discutidos. Preferivelmente, o marcador é um marcador enzimático (por exemplo, HRPO) que catalisa uma alteração química do substrato cromogénico, tal como cromogénio 3,3'-diaminobenzidina. Preferivelmente, o marcador enzimático é conjugado a um anticorpo que se liga especificamente ao anticorpo primário (por exemplo, o anticorpo primário é anticorpo policlonal de coelho e o anticorpo secundário é anticorpo de cabra anti-coelho).

Os espécimes assim preparados podem ser montados e cobertos com um lamela. A avaliação das lâminas é, em seguida, determinada, por exemplo, usando um microscópio, e critérios de intensidade de coloração, habitualmente utilizados na técnica, podem ser empregues. Os critérios de intensidade de coloração podem ser avaliados como se segue:

TABELA 2

Padrão de coloração	Pontuação
Nenhuma coloração é observadas nas células	0
Coloração ligeira/quase imperceptível é detectado em mais de 10% das células.	1+
Coloração fraca a moderada é observada em mais de 10% das células.	2+
Coloração moderada a forte é observada em mais de 10% das células.	3+

Tipicamente, uma pontuação do padrão de coloração de cerca de 2+ ou superior num ensaio de IHC é de diagnóstico e/ou prognóstico. Em algumas formas de realização, uma pontuação do padrão de coloração de cerca de 1+ ou superior é de diagnóstico e/ou prognóstico. Noutras formas de realização, uma pontuação do padrão de coloração de cerca de 3 ou superior é de diagnóstico e/ou prognóstico. Entende-se que quando células e/ou tecido de um tumor ou adenoma do cólon são examinados utilizando IHC, a coloração é geralmente determinado ou avaliada na célula e/ou tecido tumoral (em oposição ao tecido do estroma ou circundante que pode estar presente na amostra).

Outros métodos de ensaio, conhecidos como ensaios competitivos ou tipo sanduíche, estão bem estabelecidos e são amplamente utilizados na indústria de diagnósticos comercial.

Os ensaios competitivos contam com a capacidade de um traçador análogo de EphB4 competir com a EphB4 da amostra de teste para um número limitado de sítios de ligação para antigénio e anticorpo anti-EphB4. O anticorpo anti-EphB4 geralmente é insolubilizado antes ou depois da competição e, em seguida, o traçador e EphB4 ligados ao anticorpo anti-EphB4 são separados do traçador e EphB4 não ligados. Esta separação é conseguida por decantação (no caso em que o parceiro de ligação foi pré-insolubilizado) ou por centrifugação (no caso em que o parceiro de ligação foi precipitado depois da reação competitiva). A quantidade de

EphB4 na amostra de teste é inversamente proporcional à quantidade de traçador ligado, conforme medido pela quantidade de substância marcadora. Curvas dose-resposta com quantidades conhecidas de EphB4 são preparadas e comparadas com os resultados dos testes para determinar quantitativamente a quantidade de EphB4 presente na amostra de teste. Estes ensaios são chamados sistemas ELISA quando enzimas são utilizadas como os marcadores detetáveis.

Um outra espécie de ensaio competitivo, chamada ensaio "homogêneo", não necessita de uma separação de fases. Aqui, um conjugado de uma enzima com a EphB4 é preparado e usado de tal modo que quando o anticorpo anti-EphB4 se liga à EphB4, a presença do anticorpo anti-EphB4 modifica a atividade da enzima. Neste caso, a EphB4 ou seus fragmentos imunologicamente ativos são conjugados com uma ponte orgânica bifuncional a uma enzima, tal como peroxidase. Os conjugados são selecionados para utilização com o anticorpo anti-EphB4 de tal modo que a ligação do anticorpo anti-EphB4 inibe ou potencia a atividade enzimática do marcador. Este método *per se* é amplamente praticado sob o nome de EMIT.

Os conjugados estéricos são usados em métodos de impedimento estérico para ensaio homogêneo. Estes conjugados são sintetizados por ligação covalente de um hapteno de baixa massa molecular a um pequeno fragmento de EphB4 pequeno, de tal modo que o anticorpo para hapteno é substancialmente incapaz de se ligar ao conjugado ao mesmo tempo que o anticorpo anti-EphB4. Conforme este procedimento de ensaio, a EphB4 presente na amostra de teste ligar-se-á ao anticorpo anti-EphB4, permitindo, assim, que anti-hapteno se ligue ao conjugado, resultando numa alteração no carácter do hapteno do conjugado, por exemplo, uma alteração na fluorescência quando o hapteno é um fluoróforo.

Os ensaios tipo sanduíche são particularmente úteis

para a determinação de EphB4 ou de anticorpos anti-EphB4. Em ensaios tipo sanduíche sequenciais, um anticorpo anti-EphB4 imobilizado é usado para adsorver EphB4 da amostra de teste, a amostra de teste é removida por lavagem, a EphB4 ligada é utilizada para adsorver um segundo anticorpo anti-EphB4 marcado e o material ligado é, em seguida, separado do traçador residual. A quantidade de traçador ligado é diretamente proporcional à de EphB4 da amostra de teste. Em ensaios tipo sanduíche "simultâneos", a amostra de teste não é separada antes de se adicionar anti-EphB4 marcado. Um ensaio tipo sanduíche sequencial usando um anticorpo monoclonal anti-EphB4 como um anticorpo e um anticorpo anti-EphB4 policlonal como o outro, é útil para testar amostras de EphB4.

O precedente são ensaios de detecção de EphB4 meramente exemplificativos. Outros métodos desenvolvidos agora ou no futuro que usam anticorpo anti-EphB4 para a determinação de EphB4 estão incluídos dentro do âmbito do presente documento, incluindo os bioensaios aqui descritos.

Artigos de fabrico

Num outro aspeto da invenção, um artigo de fabrico contendo materiais úteis para o tratamento, prevenção e/ou diagnóstico dos distúrbios acima descritas é proporcionado. O artigo de fabrico compreende um recipiente e um rótulo ou folheto informativo no ou associado ao recipiente. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, etc. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais, tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição a qual é, por si só, ou quando combinada com uma outra composição(ões), eficaz para tratar, prevenir e/ou diagnosticar a condição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasco com uma rolha perfurável por uma agulha para injeção hipodérmica). Pelo menos um agente ativo na composição é um

anticorpo da invenção. O rótulo ou folheto informativo indica que a composição é utilizada para tratar a condição de escolha, tal como cancro. Além disso, o artigo de fabrico pode compreender (a) um primeiro recipiente com uma composição contida neste, em que a composição compreende um anticorpo da invenção; e (b) um segundo recipiente com uma composição contida neste, em que a composição compreende um agente citotóxico adicional. O artigo de fabrico nesta forma de realização da invenção pode compreender ainda um folheto informativo indicando que a primeira e a segunda composições de anticorpo podem ser usadas para tratar uma condição particular, por exemplo, cancro. Alternativamente, ou adicionalmente, o artigo de fabrico pode compreender ainda um segundo (ou terceiro) recipiente compreendendo um tampão farmacologicamente aceitável, tal como água bacteriostática para injeção (BWHI), soro fisiológico tamponado com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Este pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

O seguinte são exemplos dos métodos e composições da invenção. Entende-se que várias outras formas de realização podem ser praticadas, dada a descrição geral acima fornecida.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Geração de anticorpos anti-EphB4

Os anticorpos anti-EphB4 foram gerados utilizando expressão em fagos, utilizando EphB4-His para selecionar fagos. Uma variedade de métodos são conhecidos na técnica para a geração de bibliotecas de expressão em fagos a partir das quais um anticorpo de interesse pode ser obtido. Um método de gerar anticorpos de interesse baseia-se na utilização de uma biblioteca de fagos e anticorpos, tal como descrito em Lee et al., J. Mol. Biol. (2004),

340(5):1073-93. Os clones selecionados utilizando exibição em fagos foram rastreados contra a proteína EphB4-His usando ELISA de fagos. Clones únicos foram selecionados para caracterização adicional por ELISA de competição de fagos e um ensaio de bloqueio para determinar se o clone de anticorpo do fago poderia bloquear as interações EphB4-efrinaB2. O clone 30.35 cumpriu de forma favorável e foi selecionado para análise posterior. Para melhorar a afinidade do clone 30.35, bibliotecas de expressão em fagos foram geradas no fundo de YW30.35, cada direcionando-se a HVRs selecionadas para randomização leve ou forte. Os clones selecionados foram rastreados por ELISA de fagos e em seguida expressos como uma proteína de Fab e a sua afinidade determinada utilizando Biacore. Os clones selecionados foram reformatados como IgGs de comprimento completo, e a sua afinidade foi determinada utilizando Biacore. As sequências do clone de origem 30.35 e afinidade de clones maturados são mostradas na Figura 1.

Exemplo 2: Caracterização de anticorpos anti-EphB4

Para determinar a afinidade de ligação de Mabs anti-EphB4, medição por ressonância de plasmon de superfície (SRP) com um BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) foi utilizada. Resumidamente, *chips* biossensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) foram ativados com cloridrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. Anticorpo anti-EphB4 foi diluído com acetato de sódio a 10 mM, pH 4,8, para 5 ug/ml antes da injeção a uma taxa de fluxo de 5 ul/minuto para atingir aproximadamente 500 unidades de resposta (RU) de anticorpo acoplado. Em seguida, etanolamina a 1 M foi injetada para bloquear os grupos que não reagiram. Para as medições cinéticas, diluições seriadas duas vezes de moléculas de EphB4-His quer humanas quer murinas (0,7 nM a 500 nM) foram injetadas em PBS com Tween 20 a 0,05% a 25 °C

a uma taxa de fluxo de 25 ul/min. Taxas de associação (k_{on}) e taxas de dissociação (k_{off}) foram calculadas utilizando um modelo de ligação de Langmuir um para um simples (BIAcore Evaluation Software version 3.2). A constante de dissociação em equilíbrio (Kd) foi calculada como o rácio k_{off}/k_{on} . Os resultados desta experiência são apresentados na Tabela 3. "NA" significa que a medição não foi realizada.

Tabela 3: Afinidade e cinéticas de ligação de anticorpos anti-EphB4 a EphB4 humana e de ratinho

Anti-EphB4	Antigénio murino			Antigénio humano		
	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	Kd (nM)	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	Kd (nM)
YW30.35	0,31	0,75	2,4	0,03	0,96	32
YW30.35.1D2	1,28	< 0,05	< 0,04	0,36	< 0,05	< 0,14
YW30.35.2D8	0,92	< 0,05	< 0,05	0,4	< 0,05	< 0,12
YW30.35.2D12	NA	NA	NA	0,27	< 0,05	< 0,19
YM30.35.2D13	NA	NA	NA	0,45	< 0,05	< 0,11

Em diferentes experiências, a reatividade cruzada de clone 30.35 de anticorpo anti-EphB4 foi testada contra outros recetores EphB. Resumidamente, células COS7 foram transitoriamente transfetadas com plasmídeos expressando EphB1 humana, EphB2 humana, EphB4 humana ou EphB6 humana de comprimentos completos. 24 horas após a transfeção, as células foram submetidas a análise por FACS para detetar a ligação de anticorpos anti-EphB4, se houver. O clone 30.35 anti-EphB4 não realizou reação cruzada com EphB1 humana, EphB2 humana, EphB3 humana ou EphB6 humana.

Exemplo 3: Sinalização de recetor EphB4 bloqueado com anticorpo anti-EphB4 num ensaio baseado em células

A fim de demonstrar a capacidade dos anticorpos anti-EphB4 para bloquearem a interação de EfrinaB2 ligada à membrana e de EphB4, realizámos um ensaio baseado em células, no qual EphB4 e EfrinaB2 foram apresentadas por diferentes tipos de células. Células 3T3 que sobreexpressando EfrinaB2 humana foram usadas para estimular células HUVEC que expressam um elevado nível de EphB4, mas baixo nível de

EfrinaB2, e a capacidade do anticorpo anti-EphB4 para inibir a ativação de EphB4 foi testada.

As células 3T3 sobreexpressando EfrinaB2 humana foram preparadas como se segue: EfrinaB2 humana de comprimento completo foi clonada no vetor pcDNA5/FRT (Invitrogen) e subsequentemente usado para gerar uma linha celular estável com células 3T3.Flp (Invitrogen) de acordo com o manual do fabricante.

As células 3T3 sobreexpressando EfrinaB2 humana foram sobrepostas às células HUVEC durante 15 ou 30 minutos, na presença ou ausência do anticorpo anti-EphB4. A ativação do recetor EphB4 foi avaliada por imunoprecipitação da proteína EphB4, em seguida, detecção da presença ou ausência de fosforilação do recetor de tirosina usando um anticorpo anti-fosfotirosina (anticorpo 4G10; Upstate) utilizando um western blot. Resumidamente, as células foram lisadas com tampão RIPA. Os lisados celulares foram clarificados por centrifugação e o anticorpo anti-EphB4 35.2D8 foi adicionado a 5 ug/amostra. Após incubação a 4 °C durante duas horas, o imunocomplexo foi arrastado para baixo, usando proteína A-agarose. A fosforilação de EphB4 foi analisada por western blot usando anticorpo anti-fosfotirosina 4G10 (Upstate), a uma concentração de 1 ug/ml.

Os resultados desta experiência são apresentados na Figura 7. A sobreposição de células 3T3 a células HUVEC provocou uma dramática fosforilação da tirosina de EphB4 (linha 4 e 5). Uma pré-incubação das HUVECs de 30 minutos com anticorpo anti-EphB4 (clone 35.2D8 a 5 ug/ml) aboliu eficazmente a fosforilação da tirosina de EphB4 induzida pela sobreposição das células 3T3-EfrinaB2 (linha 6). Em contraste, o tratamento de células HUVEC com anti-EphB4 isolado não provocou ativação de EphB4 em HUVECs (linha 2 e 3), e as células HUVEC não tratadas não demonstraram ativação de EphB4. Estes resultados estabeleceram que o

anticorpo anti-EphB4 bloqueou a interação ligando-recetor no contexto de contacto direto célula-célula.

Embora a invenção anterior tenha sido descrita em algum detalhe por meio de ilustrações e exemplos para fins de clareza de compreensão, os exemplos não devem ser interpretados como limitantes do âmbito da invenção, como definido nas reivindicações.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- EP 817648 A [0007]
- WO 9845331 A [0007]
- WO 9845332 A [0007] [0348]
- WO 2004024773 A [0010]
- WO 2005090406 A [0011]
- US 6407213 B [0033] [0035]
- US 5821337 B [0035]
- US 4816567 A [0118] [0161] [0203]
- EP 404097 A [0121]
- WO 9311161 A [0121]
- US 5500362 A [0125] [0242]
- US 5821337 A [0125] [0242]
- US 6737056 B, Presta [0125]
- WO 0042072 A, Presta [0127] [0232]
- US 6194551 B1 [0130] [0232]
- WO 9951642 A [0130] [0232]
- WO 9607754 A [0181]
- US 5635177 A [0182]
- WO 9209690 A [0195]
- US 5869046 A [0202]
- WO 9316185 A [0202]
- US 5571894 A [0202]
- US 5587458 A [0202]
- US 5641870 A [0202]
- WO 9306213 A [0208]
- WO 9308829 A [0210]

- WO 9404690 A [0212]
- US 4676980 A [0214]
- WO 9100360 A [0214]
- WO 9200373 A [0214]
- EP 03089 A [0214]
- US 20030157108 A [0225] [0226]
- US 20040093621 A [0225] [0226]
- WO 2003011878 A, Jean-Mairet [0225]
- US 6602684 B, Umana [0225]
- WO 199730087 A, Patel [0225]
- WO 199858964 A, Raju, S. [0225]
- WO 199922764 A, Raju, S. [0225]
- US 20050123546 A, Umana [0225]
- WO 200061739 A [0226]
- WO 200129246 A [0226]
- US 20030115614 A [0226]
- US 20020164328 A [0226]
- US 20040132140 A [0226]
- US 20040110704 A [0226]
- US 20040110282 A [0226]
- US 20040109865 A [0226]
- WO 2003085119 A [0226]
- WO 2003084570 A [0226]
- WO 2005035586 A [0226]
- WO 2005035778 A [0226]
- WO 2005053742 A [0226]
- US 20030157108 A1, Presta, L [0226]
- WO 2004056312 A1, Adams [0226]
- US 5648260 A [0232]
- US 5624821 A [0232]
- WO 9429351 A [0232]
- WO 2004056312 A, Lowman [0232]
- US 20050014934 A1, Hinton [0232]
- US 5648237 A, Carter [0245]
- US 5639635 A [0252]

- US 6083715 A, Georgiou [0262]
- US 6027888 A, Georgiou [0262]
- US 5264365 A, Georgiou [0263]
- US 5508192 A, Georgiou [0263]
- US 4965199 A [0276]
- US 4419446 A [0279]
- US 4601978 A [0279]
- WO 9411026 A [0281] [0291] [0310]
- US 4767704 A [0284]
- US 4657866 A [0284]
- US 4927762 A [0284]
- US 4560655 A [0284]
- US 5122469 A [0284]
- WO 9003430 A [0284]
- WO 8700195 A [0284]
- US RE30985 E [0284]
- US 4975278 A [0289]
- EP 1391213 A [0289]
- US 4970198 A [0290]
- US 5079233 A [0290]
- US 5585089 A [0290]
- US 5606040 A [0290]
- US 5693762 A [0290]
- US 5739116 A [0290] [0304]
- US 5767285 A [0290] [0304]
- US 5773001 A [0290] [0304]
- WO 9321232 A [0291] [0306]
- US 3896111 A [0294]
- US 4151042 A [0294]
- US 4137230 A [0294]
- US 4248870 A [0294]
- US 4256746 A [0294]
- US 4260608 A [0294]
- US 4265814 A [0294]
- US 4294757 A [0294]

- US 4307016 A [0294]
- US 4308268 A [0294]
- US 4308269 A [0294]
- US 4309428 A [0294]
- US 4313946 A [0294]
- US 4315929 A [0294]
- US 4317821 A [0294]
- US 4322348 A [0294]
- US 4331598 A [0294]
- US 4361650 A [0294]
- US 4364866 A [0294]
- US 4424219 A [0294]
- US 4450254 A [0294]
- US 4362663 A [0294]
- US 4371533 A [0294]
- US 5208020 A [0296] [0297] [0298] [0310]
- US 5416064 A [0296]
- EP 0425235 B1 [0296] [0298]
- US 96060204 A [0298]
- US 5635483 A [0301] [0303]
- US 5780588 A [0301] [0303]
- US 5663149 A [0301]
- WO 02088172 A [0301]
- US 10983340 B [0302] [0303] [0313]
- US 5712374 A [0304]
- US 5714586 A [0304]
- US 5770701 A [0304]
- US 5770710 A [0304] [0305]
- US 5877296 A [0304] [0305]
- US 5053394 A [0305]
- US 5362852 A [0316]
- US 3773919 A [0324]
- US 20030055006 A [0343]
- US 6582959 B [0348]
- US 6884879 B [0348]

- US 6703020 B [0348]
- WO 9630046 A [0348]
- WO 9410202 A [0348]
- EP 0666868 B1 [0348]
- US 20030206899 A [0348]
- US 20030190317 A [0348]
- US 20030203409 A [0348]
- US 20050112126 A [0348]
- WO 2005012359 A [0348]
- US 4737456 A [0359]
- US 3940475 A [0360]
- US 3645090 A [0360]
- US 3720760 A, Bennich [0361]

Documentos de não patente citados na descrição

- **HANAHAN.** *Science*, 1997, vol. 277, 48-50 [0002]
- **HOGAN ; KOLODZIEJ.** *Nat. Rev. Genet.*, 2002, vol. 3, 513-23 [0002]
- **LUBARSKY ; KRASNOW.** *Cell*, 2003, vol. 112, 19-28 [0002]
- **FOLKMAN et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 10931-34 [0003]
- **KLAGSBRUN et al.** *Annu. Rev. Physiol.*, 1992, vol. 53, 217-39 [0003]
- Vascular diseases. **GARNER A.** *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach.* Marcel Dekker, 1994, 1625-1710 [0003]
- **FOLKMAN et al.** *Nature*, 1989, vol. 339, 58 [0004]
- **WEIDNER et al.** *N. Engl. J. Med.*, 1991, vol. 324, 1-6 [0004]
- **HORAK et al.** *Lancet*, 1992, vol. 340, 1120-24 [0004]
- **MACCHIARINI et al.** *Lancet*, 1992, vol. 340, 145-46 [0004]
- **FOLKMAN.** *Nat. Med.*, 1995, vol. 1 (1), 27-31 [0004]
- **FERRARA et al.** *Endocr. Rev.*, 1997, vol. 18, 4-25 [0005]
- **FERRARA et al.** *Endocr. Rev.* [0005]
- **BERKMAN et al.** *J. Clin. Invest.*, 1993, vol. 91, 153-59

[0005]

- **BROWN et al.** *Human Pathol.*, 1995, vol. 26, 86-91 [0005]
- **BROWN et al.** *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 4727-35 [0005]
- **MATTERN et al.** *Brit. J. Cancer*, 1996, vol. 73, 931-34 [0005]
- **DVORAK et al.** *Am. J. Pathol.*, 1995, vol. 146, 1029-39 [0005]
- **AIELLO et al.** *N. Engl. J. Med.*, 1994, vol. 331, 1480-87 [0006]
- **LOPEZ et al.** *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1996, vol. 37, 855-68 [0006]
- **KIM et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 841-44 [0007]
- **WARREN et al.** *J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95, 1789-97 [0007]
- **BORGSTRÖM et al.** *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 4032-39 [0007]
- **MELNYK et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 56, 921-24 [0007]
- **ADAMIS et al.** *Arch. Ophthalmol.*, 1996, vol. 114, 66-71 [0007]
- **DODELET.** *Oncogene*, 2000, vol. 19, 5614-5619 [0008]
- **KULLANDER et al.** *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2002, vol. 3, 475-486 [0008]
- **CHENG et al.** *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, vol. 13, 75-85 [0008]
- **COULTHARD et al.** *Int. J. Dev. Biol.*, 2002, vol. 46, 375-384 [0008]
- **LCC.** *J. Mol. Biol.*, 2004, vol. 340 (5), 1073-93 [0033]
- **LEE et al.** *J. Mol. Biol.*, 2004, vol. 340 (5), 1073-93 [0035] [0376]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0091]
- **CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY.** 2003 [0091]
- **METHODS IN ENZYMOLOGY. PCR 2: A PRACTICAL APPROACH.** Academic Press, Inc, 1995 [0091]
- **ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL.** 1988 [0091]

- ANIMAL CELL CULTURE. 1987 [0091]
- **KABAT et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 [0094]
- **CHEN et al.** *J. Mol Biol*, 1999, vol. 293, 865-881 [0097]
- **PRESTA et al.** *Cancer Res.*, 1997, vol. 57, 4593-4599 [0097]
- **CHEN, Y. et al.** *J. Mol Biol*, 1999, vol. 293, 865-881 [0097] [0098]
- **KABAT et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institute of Health, 1991 [0107]
- **KABAT et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health, 1991 [0114]
- **CHOTHIA ; LESK.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0114]
- **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0117] [0203]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0117]
- **PRESTA.** *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0117]
- **VASWANI ; HAMILTON.** *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.*, 1998, vol. 1, 105-115 [0117]
- **HARRIS.** *Biochem. Soc. Transactions*, 1995, vol. 23, 1035-1038 [0117]
- **HURLE ; GROSS.** *Curr. Op. Biotech.*, 1994, vol. 5, 428-433 [0117]
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0118]
- **PLUCKTHUN.** *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies.* Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315 [0119]
- **HOLLINGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0121] [0217]
- **MARKS et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0123]
- **BARBAS et al.** *Proc Nat. Acad. Sci, USA*, 1994, vol. 91,

3809-3813 [0123]

- **SCHIER et al.** *Gene*, 1995, vol. 169, 147-155 [0123]
- **YELTON et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 1994-2004 [0123]
- **JACKSON et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 154 (7), 3310-9 [0123]
- **HAWKINS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0123] [0181]
- **RAVETCH ; KINET.** *Annu. Rev. Immunol*, 1991, vol. 9, 457-92 [0125] [0127]
- **CLYNES et al.** *PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 652-656 [0125] [0242]
- **DAËRON.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0127]
- **CAPEL et al.** *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0127]
- **DE HAAS et al.** *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-41 [0127]
- **GUYER et al.** *J. Immunol.*, 1976, vol. 117, 587 [0127] [0232]
- **KIM et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 249 [0127] [0232]
- **SHIELDS et al.** *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 9 (2), 6591-6604 [0127] [0232]
- **GAZZANO-SANTORO et al.** *J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 202, 163 [0129] [0242]
- **IDUSOGIE et al.** *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, 4178-4184 [0130] [0232]
- **AGNEW.** *Chem Intl. Ed. Engl.*, 1994, vol. 33, 183-186 [0150]
- Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. **MURAKAMI et al.** *The Molecular Basis of Cancer*. WB Saunders, 1995, 13 [0152]
- **WILMAN.** Prodrugs in Cancer Chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 1986, vol. 14, 375-382 [0155]
- Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery. **STELLA et al.** *Directed Drug Delivery*. Humana Press,

- 1985, 247-267 [0155]
- **KLAGSBRUN ; D'AMORE.** *Annu. Rev. Physiol.*, 1991, vol. 53, 217-39 [0156]
 - **STREIT; DETMAR.** *Oncogene*, 2003, vol. 22, 3172-3179 [0156]
 - **FERRARA ; ALITALO.** *Nature Medicine*, 1999, vol. 5 (12), 1359-1364 [0156]
 - **TONINI et al.** *Oncogene*, 2003, vol. 22, 6549-6556 [0156]
 - **SATO.** *Int. J. Clin. Oncol.*, 2003, vol. 8, 200-206 [0156] [0343]
 - **KOHLER et al.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0161]
 - **GODING.** *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice.* Academic Press, 1986, 59-103 [0163]
 - [0168]
 - **KOZBOR.** *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0165] [0206]
 - **BRODEUR et al.** *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications.* Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0165] [0206]
 - **MUNSON et al.** *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0167]
 - **KABAT et al.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest.* NIH Publication 91-3242, 1991, vol. 1-3 [0170]
 - **WINTER et al.** *Ann. Rev. Immunol.*, 1994, vol. 12, 433-455 [0171] [0172]
 - **GRIFFITHS et al.** *EMBO J*, 1993, vol. 12, 725-734 [0172]
 - **HOOGENBOOM ; WINTER.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 227, 381-388 [0172] [0178]
 - **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0173] [0177] [0194]
 - **HOOGENBOOM et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1991, vol. 19, 4133-4137 [0173]
 - **ORLANDI et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1989, vol. 86, 3833-3837 [0177]
 - **WARD et al.** *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0177]
 - **JONES et al.** *Biotechnol*, 1991, vol. 9, 88-89 [0177]
 - **SASTRY et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1989, vol.

- 86, 5728-5732 [0177]
- **ORUM et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1993, vol. 21, 4491-4498 [0177]
 - **CLACKSON et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0177] [0180] [0194]
 - **TOMLINSON et al.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 227, 776-798 [0178]
 - **MATSUDA et al.** *Nature Genet.*, 1993, vol. 3, 88-94 [0178]
 - **BARBAS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4457-4461 [0178]
 - **WILLIAMS; WINTER.** *Eur. J. Immunol.*, 1993, vol. 23, 1456-1461 [0178]
 - **HOGREFE et al.** *Gene*, 1993, vol. 128, 119-126 [0179]
 - **WATERHOUSE.** *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0179]
 - **BARBAS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 7978-7982 [0180]
 - **EMBLETON et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1992, vol. 20, 3831-3837 [0180]
 - **LEUNG et al.** *Technique*, 1989, vol. 1, 11-15 [0181]
 - **GRAM et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1992, vol. 89, 3576-3580 [0181]
 - **MARKS et al.** *Biotechnol.*, 1992, vol. 10, 779-783 [0181]
 - **ENGELS et al.** *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1989, vol. 28, 716-734 [0182]
 - **ABRAHMSEN et al.** *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 3901 [0184]
 - *Methods in Enzyrnology*, 1976, vol. 44 [0192]
 - **BARBAS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1991, vol. 88, 7978-7982 [0194]
 - **BASS et al.** *Proteins*, 1990, vol. 8, 309-314 [0195] [0252]
 - **MARKS et al.** *Biotechnol.*, 1992, vol. 10, 779-783 [0195]
 - **SKERRA et al.** *Curry Opinion in Immunol.*, 1993, vol. 5, 256 [0198]
 - **PLUCKTHUN.** *Immunol Revs*, 1992, vol. 130, 151 [0198]

- **MORRISON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0200]
- **MORIMOTO et al.** *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0202]
- **BRENNAN et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0202] [0215]
- **CARTER et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0202]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0203]
- **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0203]
- **SIMS et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0204]
- **CHOTHIA et al.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0204]
- **CARTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0204]
- **PRESTA et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0204]
- **BOERNER et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 86 [0206]
- **JAKOBOVITS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0207]
- **JAKOBOVITS et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 255 [0207]
- **BRUGGERMANN et al.** *Year in Immunol.*, 1993, vol. 7, 33 [0207]
- **MILSTEIN ; CUELLO.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537 [0210]
- **TRAUNECKER.** *EMBOJ.*, 1991, vol. 10, 3655 [0210]
- **SURESH et al.** *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0212]
- **SHALABY et al.** *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0216]
- **KOSTELNY et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0217]
- **GRUBER et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0217]
- **TUTT et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0218]
- **CUNNINGHAM ; WELLS.** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0221]
- **OKAZAKI et al.** *J. Mol. Biol.*, 2004, vol. 336, 1239-1249 [0226]

- **YAMANE-OHNUKI et al.** *Biotech. Bioeng.*, 2004, vol. 87, 614 [0226]
- **RIPKA et al.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, vol. 249, 533-545 [0226]
- **DUNCAN ; WINTER.** *Nature*, 1988, vol. 322, 738-40 [0232]
- **RAVETCH ; KINET.** *Annu. Rev. Immunol*, vol. 9, 457-92 [0242]
- **SIEBENLIST et al.** *Cell*, 1980, vol. 20, 269 [0249]
- **PROBA ; PLUCKTHUN.** *Gene*, 1995, vol. 159, 203 [0251]
- **BACHMANN.** *Cellular and Molecular Biology.* American Society for Microbiology, 1987, vol. 2, 1190-1219 [0252]
- **SIMMONS et al.** *J. Immunol. Methods*, 2002, vol. 263, 133-147 [0258]
- **CHEN et al.** *J Bio Chem*, 1999, vol. 274, 19601-19605 [0262]
- **BOTHMANN ; PLUCKTHUN.** *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 17100-17105 [0262]
- **RAMM ; PLUCKTHUN.** *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 17106-17113 [0262]
- **ARIE et al.** *Mol. Microbiol.*, 2001, vol. 39, 199-210 [0262]
- **HARA et al.** *Microbial Drug Resistance*, 1996, vol. 2, 63-72 [0263]
- **LINDMARK et al.** *J. Immunol. Meth.*, 1983, vol. 62, 1-13 [0266] [0286]
- **YANIV.** *Nature*, 1982, vol. 297, 17-18 [0280]
- **GRAHAM et al.** *J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0282]
- **URLAUB et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0282]
- **MATHER.** *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0282]
- **MATHER et al.** *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1982, vol. 383, 44-68 [0282]
- **HAM et al.** *Meth. Enz.*, 1979, vol. 58, 44 [0284]
- **BARNES et al.** *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102, 255 [0284]
- **GUSS et al.** *EMBO J.*, 1986, vol. 5, 15671575 [0286]

- **SYRIGOS ; EPEKETOS.** *Anticancer Research*, 1999, vol. 19, 605-614 [0289]
- **NICULESCU-DUVAZ ; SPRINGER.** *Adv. Drg Del. Rev.*, 1997, vol. 26, 151-172 [0289]
- **BALDWIN et al.** *Lancet*, 15 March 1986, 603-05 [0289]
- Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review. **THORPE et al.** *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*. 1985, 475-506 [0289]
- **ROWLAND et al.** *Cancer Immunol. Immunother.*, 1986, vol. 21, 183-87 [0289]
- **MANDLER et al.** *Jour. of the Nat. Cancer Inst.*, 2000, vol. 92 (19), 1573-1581 [0289]
- **MANDLER et al.** *Bioorganic & Med. Chem. Letters*, 2000, vol. 10, 1025-1028 [0289]
- **MANDLER et al.** *Bioconjugate Chem.*, 2002, vol. 13, 786-791 [0289]
- **LIU et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 8618-8623 [0289] [0296]
- **LODE et al.** *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, 2928 [0289]
- **HINMAN et al.** *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 3336-3342 [0289]
- **WISEMAN et al.** *Eur. Jour. Nucl. Med.*, 2000, vol. 27 (7), 766-77 [0290]
- **WISEMAN et al.** *Blood*, 2002, vol. 99 (12), 4336-42 [0290]
- **WITZIG et al.** *J. Clin. Oncol.*, 2002, vol. 20 (10), 2453-63 [0290]
- **WITZIG et al.** *J. Clin. Oncol.*, 2002, vol. 20 (15), 3262-69 [0290]
- *Drugs of the Future*, 2000, vol. 25 (7), 686 [0290]
- **DORONINA et al.** *Nature Biotechnology*, 2003, vol. 21 (7), 778-784 [0290]
- **VITETTA et al.** *Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0291] [0310]
- **CHARI et al.** *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 127-131

- [0296] [0298] [0310]
- **CARLSSON et al.** *Biochem. J.*, 1978, vol. 173, 723-737
[0299]
 - **WOYKE et al.** *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 2001,
vol. 45 (12), 3580-3584 [0301]
 - **PETTIT et al.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, vol.
42, 2961-2965 [0301]
 - **E. SCHRÖDER ; K. LÜBKE.** *The Peptides.* Academic Press,
1965, vol. 1, 76-136 [0303]
 - **PETTIT et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, vol. 111, 5463-
5465 [0303]
 - **PETTIT et al.** *Anti-Cancer Drug Design*, 1998, vol. 13,
243-277 [0303]
 - **PETTIT, G.R. et al.** *Synthesis*, 1996, 719-725 [0303]
 - **PETTIT et al.** *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1996, vol. 1
(5), 859-863 [0303]
 - **DORONINA.** *Nat Biotechnol*, 2003, vol. 21 (7), 778-784
[0303]
 - **HINMAN et al.** *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 3336-3342
[0304]
 - **LODE et al.** *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 2925-2928
[0304]
 - **FRAKER et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 80,
49-57 [0309]
 - *Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy.* Chatal, CRC
Press, 1989 [0309]
 - *Applications Handbook and Catalog.* 2003, 467-498 [0311]
 - **GEOGHEGAN ; STROH.** *Bioconjugate Chem.*, 1992, vol. 3,
138-146 [0316]
 - *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.* 2000
[0320] [0322]
 - **CARMELIET ; JAIN.** *Nature*, 2000, vol. 407, 249-257 [0343]
 - **FERRARA et al.** *Nature Reviews: Drug Discovery*, 2004, vol.
3, 391-400 [0343]
 - **POPKOV et al.** *Journal of Immunological Methods*, 2004,

vol. 288, 149-164 [0348]

- **HUNTER et al.** *Nature*, 1962, vol. 144, 945 [0360]
- **DAVID et al.** *Biochemistry*, 1974, vol. 13, 1014-1021 [0360]
- **PAIN et al.** *J. Immunol. Methods*, 1981, vol. 40, 219-230 [0360]
- **NYGREN.** *J. Histochem. and Cytochem.*, 1982, vol. 30, 407-412 [0360]
- Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay. **SULLIVAN et al.** *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1981, vol. 73, 147-166 [0360]
- **LEONG et al.** *Appl. Immunohistochem.*, 1996, vol. 4 (3), 201 [0364]

Lisboa, 16 de Dezembro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo anti-EphB4 isolado compreendendo seis HVRs, em que cada HVR compreende ou consiste numa sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1-17, e em que SEQ ID NO:9 ou 10 corresponde a uma HVR-L1, SEQ ID NO:11 ou 12 corresponde a uma HVR-L2, SEQ ID NO:13, 14, 15, 16, ou 17 corresponde a uma HVR-L3, SEQ ID NO:1 ou 2 corresponde a uma HVR-H1, SEQ ID NO:3, 4, 5, ou 6 corresponde a uma HVR-H2, e SEQ ID NOs:7 ou 8 corresponde a uma HVR-H3, em que o anticorpo bloqueia a ligação de EfrinaB2 a EphB4 e bloqueia a fosforilação de tirosina mediada por EfrinaB2 de EphB4 e não faz reação cruzada com EphB1 humana, EphB2 humana, EphB3 humana ou EphB6 humana.
2. O anticorpo da reivindicação 1, em que o anticorpo compreende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, e HVR-H3, em que cada, por ordem, compreende:
 - (i) SEQ ID NO:9, 11, 13, 1, 3, e 7;
 - (ii) SEQ ID NO:10, 12, 14, 1, 3, e 8;
 - (iii) SEQ ID NO:9, 11, 15, 2, 4, e 7;
 - (iv) SEQ ID NO:9, 11, 16, 1, 5, e 7; ou
 - (v) SEQ ID NO:9, 11, 17, 1, 6, e 7.
3. O anticorpo da reivindicação 1 ou da reivindicação 2, em que o anticorpo compreende uma sequência estrutural de consenso do subgrupo III humana para uma cadeia pesada e compreende uma substituição em uma ou mais das posições 71, 73 ou 78, opcionalmente um ou mais de R71A, N73T, ou N78A.
4. Um polinucleótido codificando um anticorpo de qualquer das reivindicações 1-3.
5. Um vetor compreendendo o polinucleótido da reivindicação 4, em que, opcionalmente, o vetor é um vetor

de expressão.

6. Uma célula hospedeira compreendendo um vetor da reivindicação 5, em que, opcionalmente, a célula hospedeira é de mamífero.

7. Um método *in vitro* para a obtenção de um anticorpo ou imunocombinado anti-EphB4, o dito método compreendendo (a) a expressão num vetor de expressão da reivindicação 5 numa célula hospedeira adequada, e (b) a recuperação do anticorpo.

8. Um método para a deteção de EphB4, o método compreendendo detetar um complexo EphB4-anticorpo anti-EphB4 numa amostra biológica, em que o anticorpo anti-EphB4 no complexo é um anticorpo anti-EphB4 de qualquer das reivindicações 1-3, em que, opcionalmente, o anticorpo anti-EphB4 é marcado de forma detetável.

9. Um método para o diagnóstico de um tumor, cancro e/ou distúrbio proliferativo celular associado à expressão de EphB4, o método compreendendo detetar um complexo EphB4-anticorpo anti-EphB4 numa amostra biológica de um paciente que tem ou suspeita-se ter o distúrbio, em que o anticorpo anti-EphB4 no complexo é um anticorpo anti-EphB4 de qualquer das reivindicações 1-3, em que, opcionalmente, o anticorpo anti-EphB4 é marcado de forma detetável.

10. Uma composição compreendendo um anticorpo anti-EphB4 de qualquer das reivindicações 1-3 ou um polinucleótido ou vetor da reivindicação 4 ou 5, em que, opcionalmente, a composição compreende ainda um veículo.

11. O anticorpo anti-EphB4 de qualquer das reivindicações 1-3, para utilização num método de tratamento médico.

12. O anticorpo anti-EphB4 para utilização da reivindicação 11, o qual é para utilização num método de inibição da angiogénese, o método compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do anticorpo a um sujeito em necessidade de tal tratamento, o método, opcionalmente, compreendendo ainda administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente anti-angiogénico, em que o agente anti-angiogénico é, opcionalmente, um antagonista do fator de crescimento celular endotelial vascular (VEGF), opcionalmente, ainda um anticorpo anti-VEGF, ainda mais opcionalmente, bevacizumab.

13. O anticorpo anti-EphB4 para utilização da reivindicação 12, o método compreendendo ainda administrar uma quantidade eficaz de um agente quimioterapêutico.

14. O anticorpo anti-EphB4 para utilização de qualquer uma das reivindicações 11-13, o qual é para utilização num método de tratamento de um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular, o método compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do anticorpo a um sujeito em necessidade de tal tratamento.

15. Utilização de um anticorpo anti-EphB4 de qualquer das reivindicações 1-3 na preparação de um medicamento para a inibição da angiogénese e/ou tratamento de um cancro, um tumor, e/ou um distúrbio proliferativo celular.

Lisboa, 16 de Dezembro de 2014

RESUMO

ANTICORPOS ANTI-EPBH4 E MÉTODOS QUE OS UTILIZAM

A invenção proporciona anticorpos anti-EphB4, e composições que os compreendem, e métodos de utilização destes anticorpos.

Clone #	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
30.35	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H
30.35.1D2	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H
30.35.2D8	G	F	S	I	S	N	Y	Y	L	H
30.35.2D12	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H
30.35.2D13	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H

Clone #	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
30.35	G	G	I	Y	P	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.1D2	G	G	I	Y	P	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.2D8	G	G	I	Y	L	Y	G	S	S	S	E	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.2D12	G	G	I	Y	L	Y	S	G	S	R	G	Y	A	D	S	V	K	G
30.35.2D13	G	G	I	Y	L	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G

Clone #	H3																	
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	101	102	
30.35	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y	
30.35.1D2	A	R	S	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y	
30.35.2D8	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y	
30.35.2D12	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y	
30.35.2D13	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y	

Clone #	L1										
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
30.35	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
30.35.1D2	R	A	S	Q	D	S	E	I	F	L	A
30.35.2D8	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
30.35.2D12	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
30.35.2D13	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A

Clone #	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
30.35	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.1D2	S	A	S	N	L	E	S
30.35.2D8	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.2D12	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.2D13	S	A	S	F	L	Y	S

Clone #	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
30.35	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
30.35.1D2	Q	Q	S	N	A	V	P	L	T
30.35.2D8	Q	E	S	T	T	T	P	P	T
30.35.2D12	Q	K	S	E	T	I	P	P	S
30.35.2D13	Q	Q	T	A	Q	T	P	E	T

FIG. 1

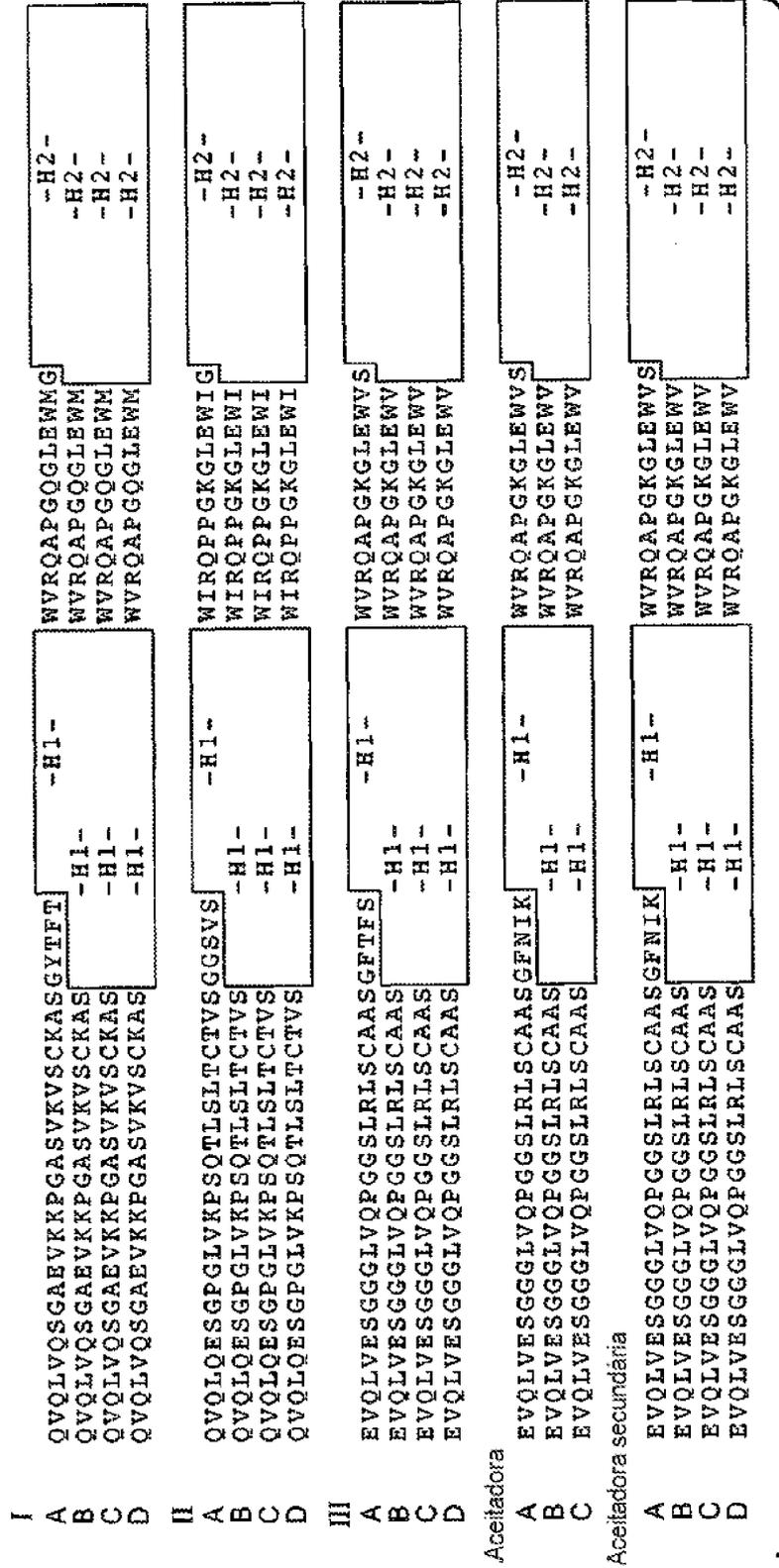


FIG. 2A

I	A	RVTITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 19
	B	RVTITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 20
	C	RVTITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCA	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 21
	D	RVTITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYC	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 22
II	A	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 23
	B	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 24
	C	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCA	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 25
	D	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYC	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 26
III	A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 27
	B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 28
	C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCA	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 29
	D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 30
Aceitadora						
	A	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCSR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 31
	B	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCSR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 32
	C	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCS	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 33
Aceitadora secundaria						
	A	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 34
	B	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 35
	C	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCA	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 36
	D	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 37

FIG. 2B

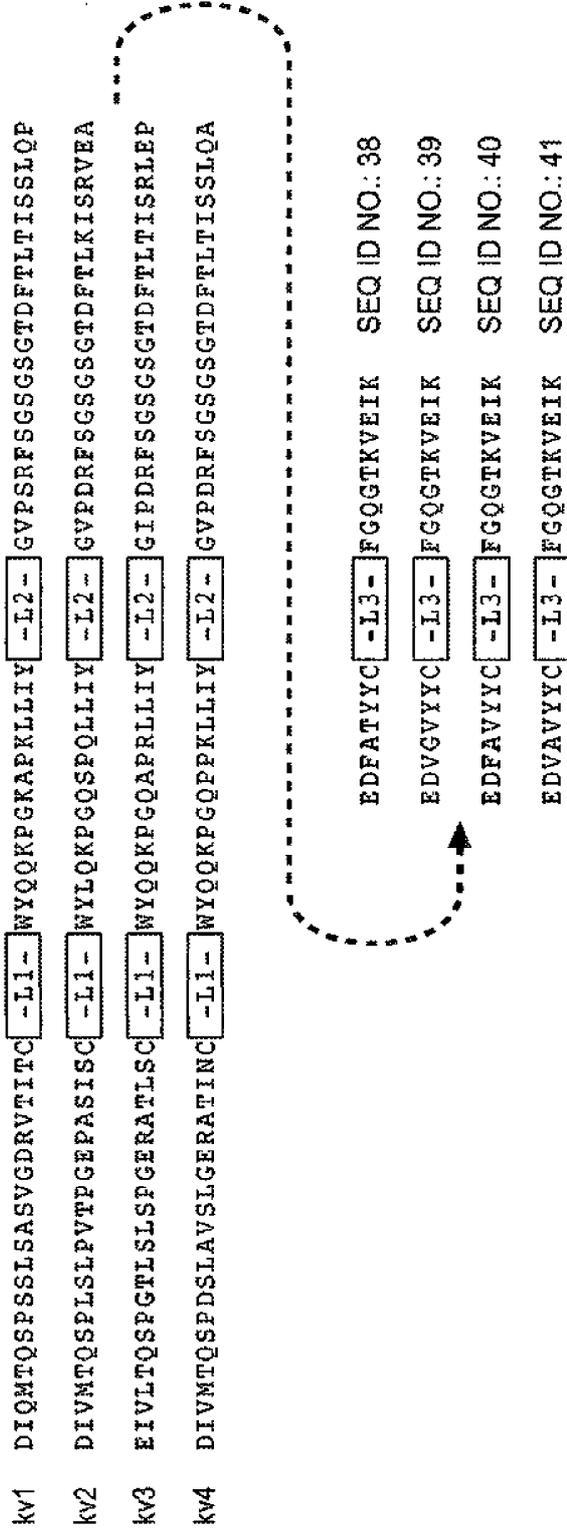


FIG. 3

Sequências Estruturais da Cadeia Leve de huMAb4D5-8

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 44)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 45)

Sequências Estruturais da Cadeia Pesada de huMAb4D5-8

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEQ ID NO: 48)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 49)

FIG. 4Sequências Estruturais da Cadeia Leve de huMAb4D5-8 Modificada na Posição 66 (Sublinhado)

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 50)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 45)

Sequências Estruturais da Cadeia Pesada de huMAb4D5-8 Modificada nas Posições 71, 73 e 78 (Sublinhado)

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (SEQ ID NO: 51)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 49)

FIG. 5

30.35

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYPYSGSTDY
ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGRLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
(SEQ ID NO:53)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:54)

30.35.1D2

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYPYSGSTDY
ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGRLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
(SEQ ID NO:55)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDSEIFLAWYQQKPKAPKLLIYSASNLESGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNAVPLTPGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:56)

30.35.2D8

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSISNYLHWVRQAPGKGLEWVGGIYLYGSSSEY
ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGRLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
(SEQ ID NO:57)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQESTTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:58)

30.35.2D12

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYLYSGSRGY
ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGRLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
(SEQ ID NO:59)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQKSETIPSPFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:60)

30.35.2D13

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYLYSGSTDY
ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGRLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
(SEQ ID NO:61)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTAPETPFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:62)

FIG. 6

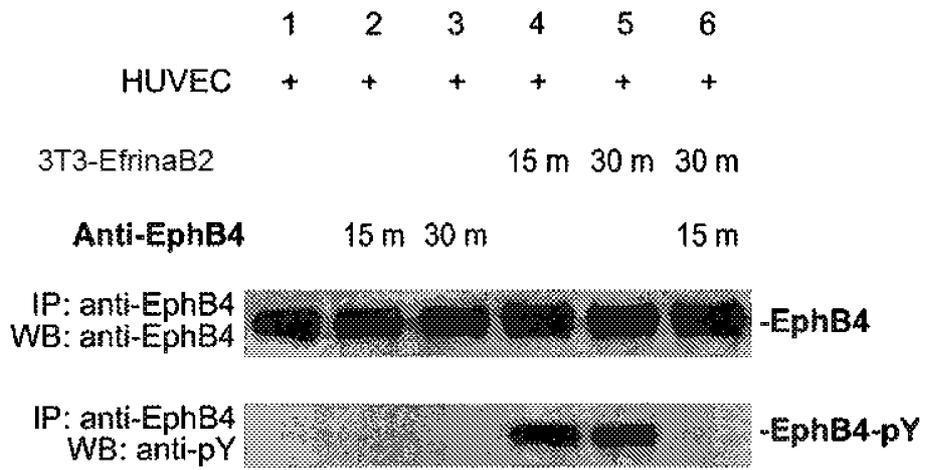


FIG. 7