

(11) Número de Publicação: **PT 2000481 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/00 (2016.01) **C07K 16/42** (2016.01)
A61P 37/08 (2016.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.02.02	(73) Titular(es): TANOX, INC.	
(30) Prioridade(s): 2003.02.01 US 444229 P	10301 STELLA LINK ROAD HOUSTON, TX 77025	US
(43) Data de publicação do pedido: 2008.12.10		
(45) Data e BPI da concessão: 2016.03.30 116/2016	(72) Inventor(es): HERREN WU SANJAYA SINGH CATHERINE FOSTER	US US US
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-IGE HUMANA DE ALTA AFINIDADE**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS DE ALTA AFINIDADE, PARTICULARMENTE ÀQUELES DIRIGIDOS CONTRA DETERMINANTES ISOTÍPICOS DE IMUNOGLOBULINA E (IGE), BEM COMO A EQUIVALENTES DIRETOS E DERIVADOS DESTES ANTICORPOS. ESTES ANTICORPOS LIGAM-SE AO SEU RESPECTIVO ALVO COM UMA AFINIDADE PELO MENOS 100 VEZES SUPERIOR AO ANTICORPO PARENTAL ORIGINAL. ESTES ANTICORPOS SÃO ÚTEIS PARA DIAGNÓSTICO, PROFILAXIA E TRATAMENTO DE DOENÇA.

RESUMO

"ANTICORPOS ANTI-IgE HUMANA DE ALTA AFINIDADE"

A invenção refere-se a anticorpos monoclonais humanos de alta afinidade, particularmente àqueles dirigidos contra determinantes isotípicos de imunoglobulina E (IgE), bem como a equivalentes diretos e derivados destes anticorpos. Estes anticorpos ligam-se ao seu respetivo alvo com uma afinidade pelo menos 100 vezes superior ao anticorpo parental original. Estes anticorpos são úteis para diagnóstico, profilaxia e tratamento de doença.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS ANTI-IgE HUMANA DE ALTA AFINIDADE"

Antecedentes da Invenção

A alergia é um estado hipersensível induzido por uma resposta imunológica exagerada a um agente estranho, tal como um alergénio. A hipersensibilidade imediata (tipo I), caracterizada por reações alérgicas imediatamente após contacto com o alergénio, é mediada via células B e baseia-se em reações antigénio-anticorpo. A hipersensibilidade retardada é mediada através de células T e com base em mecanismos de imunidade celular. Nos últimos anos, o termo "alergia" tornou-se cada vez mais sinónimo de hipersensibilidade de tipo I.

A hipersensibilidade imediata é uma resposta que se baseia na produção de anticorpos da classe de imunoglobulina E (anticorpos de IgE) pelas células B, as quais após exposição a um alergénio diferenciam-se em células plasmáticas secretoras de anticorpos. A reação induzida por IgE é um evento local que ocorre no sítio de entrada do alergénio no corpo, *i.e.* nas superfícies da mucosa e/ou nos gânglios linfáticos locais. A IgE produzida localmente sensibilizará primeiro os mastócitos locais, *i.e.* os anticorpos de IgE ligam-se através das suas regiões

constantes aos recetores $Fc\epsilon$ sobre a superfície dos mastócitos e, em seguida, a IgE "transbordante" entra na circulação e liga-se aos recetores tanto de basófilos circulantes como de mastócitos fixos ao tecido por todo o corpo. Quando a IgE ligada é subseqüentemente posta em contacto com o alergénio, os recetores $Fc\epsilon$ são reticulados por ligação do alergénio, o que faz com que as células se desgranulem e libertem um número de mediadores anafiláticos tais como histaminas, prostaglandinas, leucotrienos, etc. É a libertação destas substâncias que é responsável pelos sintomas clínicos típicos da hipersensibilidade imediata, nomeadamente a contração do músculo liso do aparelho respiratório ou do intestino, a dilatação dos vasos sanguíneos pequenos e o aumento da sua permeabilidade à água e proteínas do plasma, a secreção de muco que resulta, e.g. em rinite alérgica, eczema atópico e asma, e a estimulação das terminações nervosas na pele que resultam em prurido e dor. Além disso, a reacção no segundo contacto com o alergénio é intensificada porque algumas células B formam um "acervo de memória" de células B positivas em IgE na superfície (células B sIgE+) após o primeiro contacto com o alergénio através da expressão de IgE na superfície celular.

Existem dois recetores principais para a IgE, o recetor de alta afinidade $Fc\epsilon$ RI e o recetor de baixa afinidade $Fc\epsilon$ RII. O $Fc\epsilon$ RI é predominantemente expresso na superfície de mastócitos e basófilos, mas podem ser também encontrados níveis baixos de $Fc\epsilon$ RI nas células de

Langerhans humanas, células dendríticas, e monócitos, onde funciona na apresentação de alérgenos mediada pela IgE. Além disso, o FcεRI foi descrito em eosinófilos e plaquetas humanos (Hasegawa, S. et al., *Hematopoiesis*, 1999, 93:2543-2551). O FcεRI não se encontra na superfície de células B, nem de células T, nem de neutrófilos. A expressão de FcεRI nas células de Langerhans e células dendríticas dérmicas é funcional e biologicamente importante para a apresentação de antígenos ligados a IgE em indivíduos alérgicos (Klubaal R. et al., *J. Invest. Dermatol.* 1997, 108 (3):336-42).

O receptor de baixa afinidade, FcεRII (CD23) é uma molécula semelhante a lectina que compreende três subunidades idênticas com estruturas de cabeça que se prolongam desde um longo segmento em hélice α a partir da membrana plasmática celular (Dierks, A.E. et al., *J. Immunol.* 1993, 150:2372-2382). Após ligação à IgE, o FcεRII associa-se ao CD21 em células B envolvidas na regulação da síntese de IgE (Sanon, A. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990, 86:333-344, Bonnefoy, J. et al., *Eur. Resp. J.* 1996, 9:63s-66s). O FcεRII é reconhecido desde há muito tempo pela apresentação de alérgenos (Sutton e Gould, 1993, *Nature*, 366:421-428). A IgE ligada ao FcεRII em células epiteliais é responsável pela apresentação específica e rápida de alérgenos (Yang, P.P., *J. Clin. Invest.*, 2000, 106:879-886). O FcεRII está presente em vários tipos de células, incluindo células B, eosinófilos, plaquetas, células assassinas naturais, células T, células dendríticas foliculares e células de Langerhans.

As entidades estruturais na molécula de IgE que interagem com o FcεRI e o FcεRII foram também identificadas. Estudos de mutagénese indicaram que o domínio CH3 medeia a interação da IgE com o FcεRI (Presta et al., J. Biol. Chem. 1994, 269:26368-26373; Henry A.J. et al., Biochemistry, 1997, 36:15568-15578) e o FcεRII (Sutton e Gould, Nature, 1993, 366:421-428; Shi, J. et al., Biochemistry, 1997, 36:2112-2122). Os sítios de ligação para os recetores de alta e baixa afinidade estão localizados simetricamente ao longo de um eixo rotacional central através dos dois domínios CH3. O sítio de ligação de FcεRI está localizado num domínio CH3 do lado externo próximo da junção do domínio CH2, enquanto o sítio de ligação do FcεRII está na extremidade carboxilo do CH3.

Um conceito promissor para o tratamento de alergia envolve a aplicação de anticorpos monoclonais, que são específicos para o isotipo IgE e são, desse modo, capazes de ligar a IgE. Esta abordagem baseia-se na inibição das reações alérgicas regulando negativamente a resposta imunológica de IgE, a qual é o primeiro evento na indução de alergia e permite a manutenção do estado alérgico. Como a resposta de outras classes de anticorpos não é afetada, consegue-se tanto um efeito imediato como um efeito duradouro sobre os sintomas alérgicos. Os primeiros estudos da densidade de basófilos humanos mostraram uma correlação entre o nível de IgE no plasma de um doente e o número de recetores FcεRI por basófilo (Malveaux et al., J.

Clin. Invest., 1978,62:176). Aqueles observaram que as densidades de FcεRI em pessoas alérgicas e não alérgicas variam de 10^4 a 10^6 recetores por basófilo. Mais tarde foi demonstrado que o tratamento de doenças alérgicas com anti-IgE diminuiu a quantidade de IgE circulante para 1% dos níveis de pré-tratamento (MacGlashan et al., J. Immunol., 1997, 158:1438-1445). MacGlashan analisou o soro obtido de doentes tratados com anticorpo anti-IgE completo, que liga a IgE livre circulante no soro do doente. Eles reportaram que a diminuição do nível de IgE circulante num doente resultou num menor número de recetores presentes na superfície de basófilos. Assim, propuseram a hipótese de que a densidade de FcεRI na superfície de basófilos e mastócitos é direta ou indiretamente regulada pelo nível de anticorpo de IgE circulante.

Mais recentemente, a WO 99/62550 divulgou a utilização de moléculas e fragmentos de IgE que se ligam a sítios de ligação de IgE dos FcεRI e FcεRII para bloquear a ligação de IgE aos recetores. No entanto, as terapias eficazes que carecem de efeitos secundários prejudiciais para o tratamento destas doenças alérgicas são limitadas. Uma abordagem terapêutica para tratar doenças alérgicas envolveu a utilização de anticorpo anti-IgE humanizado para tratar a rinite alérgica e a asma (Corne, J. et al., J. Clin. invest. 1997, 99:879-887; Racine-Poon, A. et al., Clin. Pharmacol. Ther. 1997,62:675-690; Fahy, J.V. et al., Am. J. Resp. Crit. Care Med. 1997, 155:1824-1834; Boulet, L. P. et al., Am. J. Resp. Crit. Care Med., 1997,155:1835-

1840; Milgrom, E. et al., N. Engl. J. Med., 1999, 341:1966-1973). Estes dados clínicos demonstram que a inibição da ligação da IgE aos seus recetores é uma abordagem eficaz para tratar doenças alérgicas.

Kolbinger et al., Protein Engineering 1993, 6, n.º 8, 971-980 e US5958708 descrevem anticorpos humanizados obtidos por humanização do anticorpo anti-IgE murídeo TES-C21.

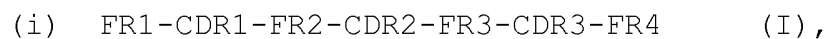
Os anticorpos adequados como agentes antialérgicos devem reagir com as células B positivas em IgE na superfície que se diferenciam em células plasmáticas produtoras de IgE, para que possam ser utilizados para eliminar funcionalmente aquelas células B. No entanto, os anticorpos para a IgE também podem induzir, em princípio, a libertação de mediadores a partir de mastócitos sensibilizados pela IgE por reticulação dos recetores Fcε, antagonizando, desse modo, o efeito benéfico exercido no nível sérico de IgE e células B sIgE+. Por conseguinte, os anticorpos aplicáveis para a terapia de alergia não devem ser capazes de reagir com a IgE ligada em mastócitos e basófilos sensibilizados, mas devem reter a capacidade de reconhecer as células B sIgE+.

Tais anticorpos específicos do isotipo IgE foram descritos e.g. por Chang et al. (Biotechnology 8, 122-126 (1990)), na Patente Europeia N.º EP0407392, e em várias Patentes U.S., e.g., Patente U.S. N.º 5,449,760. No

entanto, como os anticorpos divulgados não são de origem humana, são menos adequados para aplicação em humanos devido à sua imunogenicidade como proteínas estranhas. Esta desvantagem pode ser potencialmente reduzida transformando, *e.g.*, um anticorpo monoclonal anti-IgE de roedor num anticorpo quimérico que combina os domínios variáveis do anticorpo do roedor com os domínios constantes do anticorpo humano. Esta abordagem conserva o sítio de ligação de antigénio do anticorpo anti-IgE parental de roedor, ao mesmo tempo que confere o isotipo e funções efetoras humanos. A imunogenicidade de um anticorpo quimérico pode ser ainda reduzida enxertando regiões hipervariáveis de roedor, também denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), nas regiões estruturais dos domínios de região variável das cadeia leve e pesada humanas resultando anticorpos humanos remodelados. A técnica envolve a substituição ou o enxerto recombinante de sequências CDR de roedor específicas para o antigénio por aquelas existentes nos domínios variáveis das cadeias pesada e leve humanas "genéricas" (Patente U.S. N.º 6,180,370).

As imunoglobulinas ou os anticorpos intactos naturais compreendem uma molécula tetramérica geralmente na forma de Y possuindo um sítio de ligação de antigénio na extremidade de cada braço superior. Um sítio de ligação de antigénio consiste no domínio variável de uma cadeia pesada associado ao domínio variável de uma cadeia leve. Mais especificamente, o sítio de ligação de antigénio de um

anticorpo é essencialmente constituído pelas 3 CDRs do domínio variável de uma cadeia pesada (V_H) e pelas 3 CDRs do domínio variável da cadeia leve (V_L). Tanto no V_L como no V_H , as CDRs alternam com 4 regiões estruturais (FRs) que formam uma cadeia polipeptídica da fórmula geral



em que a cadeia polipeptídica é descrita como começando na extremidade N-terminal e terminando na extremidade C-terminal. As CDRs de V_H e V_L são também referidas como H1, H2, H3, e L1, L2, L3, respetivamente. A determinação do que constitui uma FR ou uma CDR é geralmente feita comparando as sequências de aminoácidos de um número de anticorpos gerados na mesma espécie e as regras gerais para a sua identificação são conhecidas na técnica ("Sequences of proteins of immunological interest", Kabat E. A. et al., US department of health and human service, Public health service, National Institute of Health).

A contribuição feita por um domínio variável da cadeia leve para a energética da ligação é pequena em comparação com aquela feita pelo domínio variável da cadeia pesada associado, e os domínios variáveis da cadeia pesada isolados têm uma atividade de ligação ao antigénio por si só. Tais moléculas são comumente referidas como anticorpos de domínio único (Ward, E. S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)).

As CDRs formam ansas que, dentro dos domínios, estão conectadas a uma região estrutural de folha β . A relação entre a sequência de aminoácidos e a estrutura de uma ansa pode ser descrita por um modelo de estrutura canónica (Chotia et al., Nature 342, 887-883 (1989)). De acordo com este modelo, os anticorpos têm apenas algumas conformações de cadeia principal ou "estruturas canónicas" para cada região hipervariável. As conformações são determinadas pela presença de alguns resíduos de aminoácidos chave em sítios específicos das CDRs e, para certas ansas, nas regiões estruturais. As regiões hipervariáveis que têm a mesma conformação em diferentes imunoglobulinas têm os mesmos ou resíduos de aminoácidos muito semelhantes nestes sítios.

Foi realizado o enxerto de CDR nos anticorpos monoclonais para produzirem anticorpos humanos humanizados com uma afinidade de ligação significativamente inferior à do anticorpo roedor dador de CDR. As observações indicaram que, além da transferência de CDRs, nalguns casos poderiam ser necessárias alterações dentro da região estrutural da sequência humana para proporcionar atividade de ligação ao antigénio satisfatória no produto enxertado com CDR.

Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)) divulgaram que as CDRs de um anticorpo monoclonal anti-Tac murídeo poderiam ser enxertadas numa região estrutural humana. As regiões estruturais humanas foram escolhidas para maximizar a homologia com a sequência

murídea. Os autores utilizaram um modelo em computador do anticorpo parental murídeo para identificar resíduos de aminoácidos localizados dentro das FRs que estão suficientemente próximos para interagir com as CDRs ou o antigénio. Estes resíduos foram mutados para o resíduo encontrado na sequência murídea. O anticorpo anti-Tac humanizado tinha uma afinidade que era apenas cerca de 1/3 daquela do anticorpo anti-Tac murídeo e a manutenção do carácter humano deste anticorpo foi problemática.

O tratamento de doenças com níveis muito altos de IgE pode exigir um anticorpo com maior afinidade para reduzir o risco de imunogenicidade, e para alargar as indicações clínicas às doenças com níveis muito altos de IgE, *e.g.*, dermatite atópica. Assim, é desejável ter um anticorpo anti-IgE com maior nível de humanização e uma afinidade muito maior para a IgE. Os anticorpos nesta invenção são anticorpos anti-IgE humana com afinidades ultra altas e um grau mais elevado de homologia com sequência humana diminuindo o risco de imunogenicidade.

Assim, há uma necessidade de anticorpos humanizados de maior afinidade que permitirão diminuir a quantidade de anticorpo necessária para tratar a doença, reduzindo, desse modo, os potenciais efeitos secundários da imunogenicidade do fármaco e o custo para o doente. Além disso, a presente invenção melhora a probabilidade de que se identifique anticorpos de alta afinidade.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a um anticorpo anti-IgE de alta afinidade como definido nas reivindicações apensas.

É também descrito um método de preparação de tais anticorpos de alta afinidade a partir de uma molécula de anticorpo parental, que combina a humanização e maturação da afinidade de um anticorpo não humano num método rápido e eficaz que aumenta significativamente a afinidade de ligação em relação a outros métodos. Este método envolve a modificação simultânea ou sequencial das CDRs e regiões estruturais da molécula de anticorpo parental gerando uma biblioteca de CDRs e/ou regiões estruturais aleatoriamente substituídas, e a triagem de moléculas de alta afinidade.

Em particular, a presente invenção refere-se a um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo que compreende uma região variável da cadeia leve que compreende CDRL1, CDRL2 e CDRL3 e uma região variável da cadeia pesada que compreende CDRH1, CDRH2 e CDRH3, em que CDRL1 consiste na SEQ ID NO:5, CDRL2 consiste na SEQ ID NO:8, CDRL3 consiste na sequência de aminoácidos QQSWWPTT, CDRH1 consiste na SEQ ID NO:16, CDRH2 consiste na SEQ ID NO:20 e CDRH3 consiste na SEQ ID NO:26, em que o anticorpo liga-se especificamente à IgE.

Além disso, a presente invenção refere-se a uma

composição que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou seu fragmento e um veículo farmacêuticamente aceitável bem como um kit de diagnóstico que compreende o anticorpo ou seu fragmento da invenção, um ácido nucleico que codifica o anticorpo ou seu fragmento da invenção, um vetor que compreende o referido ácido nucleico, e uma célula hospedeira isolada que compreende o referido vetor.

Além disso, a presente invenção refere-se a um método para medir o nível de IgE num indivíduo, que compreende pôr em contacto uma amostra do indivíduo, amostra essa que compreende moléculas de IgE, com um anticorpo ou seu fragmento da invenção, e determinar o nível de retenção do anticorpo ou seu fragmento pela amostra relativamente a uma amostra de controlo de um indivíduo de controlo, em que um nível mais alto ou mais baixo de retenção do anticorpo ou seu fragmento pela amostra do indivíduo relativamente à amostra de controlo indica que o indivíduo tem um nível mais alto ou mais baixo de moléculas de IgE relativamente àquele no indivíduo de controlo.

Além disso, a presente invenção refere-se a um método para diagnosticar um distúrbio associado a um nível anormal de IgE num indivíduo, que compreende pôr em contacto uma amostra do indivíduo, amostra essa que compreende moléculas de IgE, com um anticorpo ou seu fragmento da invenção e determinar o nível de retenção do

anticorpo ou seu fragmento pela amostra relativamente a uma amostra de controlo de um indivíduo de controlo, em que um nível mais alto ou mais baixo de retenção do anticorpo ou seu fragmento pela amostra do indivíduo relativamente à amostra de controlo indica que o indivíduo tem um distúrbio associado a um nível anormal de IgE.

Além disso, a presente invenção refere-se a uma utilização de um anticorpo ou seu fragmento da invenção para o fabrico de um medicamento para tratar um distúrbio associado a um nível anormalmente alto de IgE num indivíduo.

Finalmente, a presente invenção refere-se a um anticorpo ou seu fragmento da invenção para utilização num método de tratamento de um distúrbio associado a um nível anormalmente alto de IgE num indivíduo.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 é uma representação esquemática do vetor fágico utilizado na clonagem e triagem de anticorpos.

A Figura 2 é uma representação esquemática de oligonucleótidos úteis na geração de variantes de anticorpo.

A Figura 3A representa a comparação das cadeias leves do anticorpo anti-IgE murídeo TES-C21 e a cadeia molde humana combinada de L16 e JK4.

A Figura 3B representa a comparação das cadeias pesadas de TES-C21 e a cadeia molde humana combinada DP88 e JH4b.

A Figura 4 apresenta uma tabela das variantes de resíduos estruturais possuindo alta afinidade em comparação com o TES-C21 parental.

As Figura 5A e B representam as curvas de titulação ELISA para os clones 4, 49, 72, 78 e 136, em comparação com o Fab parental de TES-C21 e o controle negativo (5D12).

A Figura 6 representa um ensaio de inibição dos clones 2C, 5A e 5I, em comparação com o TES-C21 parental e um anticorpo de controle negativo.

A Figura 7A representa as sequências de clones que têm uma combinação de mutações benéficas que resultou numa afinidade ainda maior para a IgE.

As Figuras 8A & 8B representam as sequências estruturais de toda a região variável da cadeia leve para os clones 136, 1, 2, 4, 8, 13, 15, 21, 30, 31, 35, 43, 44, 53, 81, 90 e 113.

As Figuras 9A & 9B representam as sequências estruturais de toda a região variável da cadeia pesada para 35 clones.

As Figuras 10 A-F representam a sequências das cadeias pesada e leve completas para os clones 136, 2C, 51, 5A, 2B e 1136-2C.

Descrição Detalhada da Invenção

Definições

Os termos utilizados ao longo deste pedido são para ser interpretados com o significado comum e típico para os especialistas com conhecimentos médios na matéria. No entanto, as Requerentes desejam que se dê aos seguintes termos a definição particular como definida abaixo.

A frase "substancialmente idêntica" em relação a uma sequência polipeptídica da cadeia de um anticorpo pode ser interpretada como uma cadeia de anticorpo que exhibe pelo menos 70% ou 80% ou 90% ou 95% de identidade de sequência com a sequência polipeptídica de referência. O termo em relação a uma sequência de ácido nucleico pode ser interpretado como uma sequência de nucleótidos que exhibe pelo menos cerca de 85% ou 90% ou 95% ou 97% de identidade de sequência com a sequência de ácido nucleico de referência.

O termo "identidade" ou "homologia," deve ser interpretado como significando a percentagem de resíduos de aminoácidos na sequência candidata que são idênticos aos

resíduos de uma sequência correspondente com a qual é comparada, após alinhamento das sequências e introdução de lacunas, se for necessário, para conseguir a percentagem máxima de identidade para a sequência completa, e não considerando quaisquer substituições conservadoras como parte da identidade de sequência. Nem as extensões N- ou C-terminais nem as inserções devem ser interpretadas como reduzindo a identidade ou homologia. Os métodos e programas de computador para o alinhamento são bem conhecidos na técnica. A identidade de sequência pode ser medida utilizando software de análise de sequências.

O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais alargado e cobre, especificamente, os anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais e anticorpos multiespecíficos (e.g., anticorpos biespecíficos). Os anticorpos (Abs) e as imunoglobulinas (Igs) são glicoproteínas que têm as mesmas características estruturais. Enquanto os anticorpos exibem especificidade de ligação a um alvo específico, as imunoglobulinas incluem tanto anticorpos como outras moléculas semelhantes a anticorpos que carecem de especificidade para o alvo. Os anticorpos e imunoglobulinas nativos são geralmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150 000 daltons, constituídas por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia pesada tem numa extremidade um domínio variável (V_H) seguido de um número de domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável numa

extremidade (V_L) e um domínio constante na sua outra extremidade.

Como aqui utilizado, "anticorpo de anti-IgE humana" significa um anticorpo que se liga à IgE humana de tal maneira que inibe ou reduz substancialmente a ligação dessa IgE ao recetor de alta afinidade, $Fc\epsilon RI$.

O termo "variável" no contexto do domínio variável de anticorpos refere-se ao facto de certas porções dos domínios variáveis diferirem exaustivamente em termos de sequência entre anticorpos e serem utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para o seu alvo particular. No entanto, a variabilidade não está distribuída uniformemente ao longo dos domínios variáveis dos anticorpos. Está concentrada em três segmentos chamados regiões determinantes de complementaridade (CDRs) também conhecidos como regiões hipervariáveis nos domínios variáveis tanto da cadeia leve como da cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são chamadas de regiões estruturais (FR). Os domínios variáveis das cadeias pesada e leve nativas compreendem cada um quatro regiões FR, que adotam em grande parte uma configuração em folha β , conectadas por três CDRs, que formam ansas que conectam, e nalguns casos fazem parte de, da estrutura de folhas 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 do alvo nos anticorpos (ver Kabat et al.)

Como aqui utilizada, a numeração dos resíduos de aminoácidos da imunoglobulina é feita de acordo com o sistema de numeração de resíduos de aminoácidos de imunoglobulina de Kabat et al., (Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987), salvo indicação em contrário.

O termo "fragmento de anticorpo" refere-se a uma porção de um anticorpo de comprimento total, geralmente a região de ligação do alvo ou variável. Os exemplos de fragmentos de anticorpos incluem os fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv. A frase "fragmento ou análogo funcional" de um anticorpo é um composto que tem atividade biológica qualitativa em comum com um anticorpo de comprimento total. Por exemplo, um fragmento ou análogo funcional de um anticorpo anti-IgE é um que pode ligar-se a uma imunoglobulina IgE de tal maneira que impede ou reduz substancialmente a capacidade que essa molécula tem para ligar-se ao recetor de alta afinidade, FcεRI. Como aqui utilizado, "fragmento funcional" em relação a anticorpos, refere-se aos fragmentos Fv, F(ab) e F(ab')₂. Um fragmento "Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de reconhecimento e ligação de um alvo completo. Esta região consiste num dímero de um domínio variável de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve numa associação forte, não covalente (dímero V_H-V_L). É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação do alvo na superfície do dímero V_H-V_L. Coletivamente, as seis CDRs conferem ao anticorpo a

especificidade de ligação para o alvo. No entanto, até mesmo um único domínio variável (ou a metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicas para um alvo) tem a capacidade de reconhecer e ligar o alvo, embora com uma menor afinidade do que o sítio de ligação completo. Os fragmentos de anticorpos "Fv de cadeia simples" ou "sFv" compreendem os domínios V_H e V_L de um anticorpo, em que estes domínios estão presentes numa única cadeia polipeptídica. Geralmente, o polipéptido Fv compreende ainda uma unidade de ligação polipeptídica entre os domínios V_H e V_L que permite que o sFv forme a estrutura desejada para ligação ao alvo.

O fragmento Fab contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos da extremidade carboxilo do domínio CH1 da cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região charneira do anticorpo. Os fragmentos F(ab') são produzidos por dissociação da ligação dissulfureto nas cisteínas da charneira do produto de digestão de F(ab')₂ com pepsina. Os especialistas com conhecimentos médios na matéria conhecem acoplamentos químicos adicionais de fragmentos de anticorpos.

O termo "anticorpo monoclonal" como aqui utilizado refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, *i.e.*, os anticorpos individuais que constituem a população são

idênticos exceto para possíveis mutações naturais que possam estar presentes em quantidades mais pequenas. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos e estão dirigidos contra um único sítio alvo. Além disso, em contraste com as preparações de anticorpo (policlonal) convencionais que incluem tipicamente anticorpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no alvo. Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos na medida em que podem ser sintetizados por cultura de hibridomas, não contaminadas com outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como tendo sido obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não é para ser interpretado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais para utilização com a presente invenção podem ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos em fagos utilizando técnicas bem conhecidas. Os anticorpos monoclonais parentais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser preparados pelo método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler e Milstein, Nature 256, 495 (1975), ou podem ser preparados por métodos recombinantes.

As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (e.g. murídeos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos das mesmas (tais como Fv, Fab,

Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de anticorpos que se ligam ao alvo) que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que a totalidade ou substancialmente a totalidade das regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e a totalidade ou substancialmente a totalidade das regiões FR são as de uma sequência consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado pode compreender também pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma cadeia molde de imunoglobulina humana escolhida.

Os termos "célula", "linha de células" e "cultura de células" incluem a descendência. É também entendido que toda a descendência pode não ser exatamente idêntica no conteúdo de ADN, devido a mutações deliberadas ou involuntárias. Encontra-se incluída a descendência variante que tem a mesma função ou propriedade biológica, que a procurada para a célula originalmente transformada. As "células hospedeiras" utilizadas na presente invenção são geralmente hospedeiros procarióticos ou eucarióticos.

"Transformação" de um organismo celular com ADN significa a introdução de ADN num organismo de tal forma que o ADN seja replicável, quer como um elemento extracromossómico ou por integração cromossómica. A "transfeção" de um organismo celular com ADN refere-se à

captação de ADN, e.g., um vetor de expressão, pela célula ou organismo quer sejam de facto expressas, ou não, quaisquer sequências codificantes. Os termos "célula hospedeira transfetada" e "transformada" referem-se a uma célula na qual foi introduzida ADN. A célula é denominada "célula hospedeira" e pode ser procariótica ou eucariótica. As células hospedeiras procarióticas típicas incluem várias estirpes de *E. coli*. As células hospedeiras eucarióticas típicas são de mamífero, tais como de ovário de hamster Chinês ou células de origem humana. A sequência de ADN introduzida pode ser da mesma espécie que a célula hospedeira, de uma espécie diferente da célula hospedeira, ou pode ser uma sequência de ADN híbrida, que contém algum ADN estranho e algum ADN homólogo.

O termo "vetor" significa uma construção de ADN que contém uma sequência de ADN que está operacionalmente ligado a uma sequência de controlo adequada capaz de efetuar a expressão do ADN num hospedeiro adequado. Tais sequências de controlo incluem um promotor para efetuar a transcrição, uma sequência operadora opcional para controlar essa transcrição, uma sequência que codifica sítios de ligação de ribossomas ao ARNm adequados e sequências que controlam a terminação da transcrição e tradução. O vetor pode ser um plasmídeo, uma partícula de fago ou simplesmente uma potencial inserção genómica. Uma vez transformado num hospedeiro adequado, o vetor pode integrar-se e funcionar de forma independente do genoma do hospedeiro, ou pode, em alguns casos, integrar-se no

próprio genoma. Na presente descrição, "plasmídeo" e "vetor" são por vezes utilizados indistintamente, já que o plasmídeo é a forma de vetor mais comumente utilizada. No entanto, a invenção pretende incluir essas outras formas de vetores que realizam uma função equivalente e que são, ou que se tornaram, conhecidas na técnica.

A expressão "sequências de controlo" refere-se às sequências de ADN necessárias para a expressão de uma sequência codificante operacionalmente ligada num organismo hospedeiro particular. As sequências de controlo que são adequadas para procariotas incluem, por exemplo, um promotor, opcionalmente uma sequência operadora, e um sítio de ligação de ribossoma. Sabe-se que as células eucarióticas utilizam promotores, sinais de poliadenilação e potenciadores. O ADN para uma pré-sequência ou líder de secreção pode estar operacionalmente ligado ao ADN para um polipéptido se for expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou potenciador está operacionalmente ligado a uma sequência codificante se afetar a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação de ribossoma está operacionalmente ligado a uma sequência codificante se afetar a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação de ribossoma está operacionalmente ligado a uma sequência codificante se estiver posicionado de forma a facilitar a tradução. Em geral, "operacionalmente ligado" significa que as sequências de ADN que são ligadas estão contíguas, e, no caso de um líder de secreção, contíguas e em fase de leitura. No entanto, os potenciadores não têm de estar contíguos.

"Mamífero" para os fins de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e de exploração pecuária, primatas não humanos, e animais de zoológico, para desportos, ou animais de estimação, tais como cães, cavalos, gatos, vacas, etc.

O termo "etiquetado com epítopo" quando aqui utilizado no contexto de um polipéptido refere-se a um polipéptido fundido com uma "etiqueta de epítopo". O polipéptido da etiqueta de epítopo tem resíduos suficientes para proporcionar um epítopo contra o qual se pode gerar um anticorpo, e mesmo assim é suficientemente curta para que não interfira com a atividade do polipéptido. Preferencialmente, a etiqueta de epítopo é também razoavelmente única para que o anticorpo não reaja substancialmente de forma cruzada com outros epítopos. Os polipéptidos de etiqueta adequados têm geralmente pelo menos 6 resíduos de aminoácidos e, geralmente, entre cerca de 8-50 resíduos de aminoácidos (preferencialmente entre cerca de 9-30 resíduos). Os exemplos incluem o polipéptido da etiqueta HA da gripe e o seu anticorpo 12CA5 (Field et al, Mol Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)); a etiqueta c-myc e os anticorpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 contra a mesma (Evan et al., Mol Cell. Biol. 5(12): 3610-3616 (1985)); e a etiqueta de glicoproteína D (gD) do vírus Herpes Simplex e o seu anticorpo (Paborsky et al., Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990)). Em certas formas de

realização, a etiqueta de epítopo pode ser um epítopo da região Fc de uma molécula de IgG (e.g., IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) que é responsável por aumentar a semivida sérica in vivo da molécula de IgG.

A palavra "marcador" quando aqui utilizada refere-se a um composto ou composição detetável que pode ser conjugado direta ou indiretamente com uma molécula ou proteína, e.g., um anticorpo. O marcador pode ser ele mesmo detetável (e.g., marcadores radioisotópicos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou composição de substrato que é detetável.

Como aqui utilizada, "fase sólida" significa uma matriz não aquosa à qual o anticorpo da presente invenção possa aderir. Os exemplos de fases sólidas aqui abrangidas incluem aquelas constituídas parcial ou inteiramente por vidro (e.g. vidro de poros controlados), polissacáridos (e.g., agarose), poliacrilamidas, poliestireno, poli(álcool vinílico) e silicones. Em certas formas de realização, dependendo do contexto, a fase sólida pode compreender o poço de uma placa de ensaio; noutras é uma coluna de purificação (e.g. uma coluna de cromatografia de afinidade).

Como aqui utilizado, o termo "distúrbio mediado por IgE" significa uma condição ou doença que se caracteriza pela produção excessiva e/ou hipersensibilidade

à imunoglobulina IgE. Especificamente, deve ser interpretado como incluindo condições associadas à hipersensibilidade anafilática e às alergias atópicas, incluindo, por exemplo: asma, rinite alérgica e conjuntivite (febre dos fenos), eczema, urticária, dermatite atópica e alergias alimentares. A condição fisiológica grave de choque anafilático provocado por, *e.g.*, picadas de abelha, mordeduras de cobra, alimentos ou medicação, está também abrangida no âmbito deste termo.

Geração de Anticorpos

O anticorpo de partida ou "parental" pode ser preparado utilizando técnicas disponíveis na matéria para gerar tais anticorpos. Estas técnicas são bem conhecidas. Os métodos ilustrativos para gerar o anticorpo de partida são descritos em mais pormenor nas secções que se seguem. Estas descrições são alternativas possíveis para a preparação ou seleção de um anticorpo parental e não limitam, de maneira nenhuma, os métodos através dos quais uma tal molécula pode ser gerada.

A afinidade de ligação do anticorpo é determinada antes de se gerar um anticorpo de alta afinidade da presente invenção. De igual forma, o anticorpo pode ser submetido a outros ensaios da atividade biológica, *e.g.*, para avaliar a eficácia como um agente terapêutico. Esses ensaios são conhecidos na técnica e dependem do alvo e utilização pretendida para o anticorpo.

A fim de pesquisar anticorpos que se ligam a um epítopo particular (e.g., aqueles que bloqueiam a ligação da IgE ao seu recetor de alta afinidade), pode realizar-se um ensaio de bloqueio cruzado de rotina tal como o descrito em "Antibodies: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988)). Alternativamente, pode realizar-se o mapeamento de epítopo para determinar se o anticorpo liga um epítopo de interesse. Opcionalmente, a afinidade de ligação do anticorpo a um homólogo do alvo utilizado para gerar o anticorpo (onde o homólogo é de uma espécie diferente) pode ser avaliada utilizando técnicas conhecidas na matéria. Numa forma de realização, a outra espécie é um mamífero não humano ao qual se administrará o anticorpo em estudos pré-clínicos. Por conseguinte, a espécie pode ser um primata não humano, tal como um macaco rhesus, cinomolgo, babuíno, chimpanzé e macaco. Alternativamente, a espécie pode ser, por exemplo, um roedor, gato ou cão.

O anticorpo parental é alterado de acordo com a presente invenção de forma a gerar um anticorpo que tem uma afinidade de ligação maior ou mais forte para o alvo do que o anticorpo parental. O anticorpo de alta afinidade resultante tem preferencialmente uma afinidade de ligação para o alvo que é pelo menos cerca de 10 vezes superior, ou pelo menos cerca de 20 vezes superior, ou pelo menos cerca de 500 vezes superior ou pode ser 1000 a 5000 vezes superior, à afinidade de ligação do anticorpo parental para

o alvo. O grau de melhoria necessário ou desejado na afinidade de ligação dependerá da afinidade de ligação inicial do anticorpo parental.

Em geral, o método de preparação de anticorpos de alta afinidade a partir de um anticorpo parental envolve os seguintes passos:

1. Obter ou selecionar um anticorpo parental que liga o alvo de interesse, o qual compreende domínios variáveis das cadeias pesada e leve. Isto pode ser efetuado por técnicas de hibridoma tradicionais, técnicas de apresentação em fagos ou qualquer outro método de geração de um anticorpo específico alvo.
2. Selecionar uma sequência estrutural que seja próxima em termos de sequência da região estrutural parental, preferencialmente uma sequência molde humana. Esta cadeia molde pode ser escolhida com base no, *e.g.*, seu comprimento global comparativo, o tamanho das CDRs, os resíduos de aminoácidos localizados na junção entre a região estrutural e as CDRs, homologia global, etc. A cadeia molde escolhida pode ser uma mistura de mais do que uma sequência ou pode ser uma cadeia molde consenso.
3. Gerar uma biblioteca de clones realizando substituições de aminoácidos aleatórias em toda e qualquer posição possível da CDR. Também se pode substituir aleatoriamente os aminoácidos na cadeia molde estrutural humana que

estejam, e.g., adjacentes às CDRs ou que possam afetar a ligação ou dobragem, por todos os aminoácidos possíveis, gerando uma biblioteca de substituições estruturais. Estas substituições estruturais podem ser avaliadas quanto ao seu efeito potencial na ligação ao alvo e dobragem do anticorpo. A substituição de aminoácidos na região estrutural pode ser feita simultânea ou sequencialmente com a substituição de aminoácidos nas CDRs. Um método para gerar a biblioteca de variantes por síntese de oligonucleótidos.

4. Construir um vetor de expressão que compreende as variantes da cadeia pesada e/ou leve geradas no passo (3) que pode compreender as fórmulas: FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4 (I) e FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4 (II), em que FRL1, FRL2, FRL3, FRL4, FRH1, FRH2, FRH3 e FRH4 representam as variantes das sequências da cadeia leve e da cadeia pesada da cadeia molde estrutural escolhidas no passo 3 e as CDRs representam as CDRs variantes das CDRs do anticorpo parental. Um exemplo de um vetor que contém tais sequências das cadeias leve e pesada é representado na Figura 1.

5. Pesquisar a biblioteca de clones contra o alvo específico e aqueles clones que ligam o alvo são pesquisados quanto a uma afinidade de ligação melhorada. Pode selecionar-se aqueles clones que ligam com maior afinidade do que a molécula parental. O candidato de alta afinidade ótimo terá a maior afinidade de ligação possível em comparação com o anticorpo parental, preferencialmente

maior do que 20 vezes, 100 vezes, 1000 vezes ou 5000 vezes. Se a variante escolhida possuir certos aminoácidos que são indesejáveis, tal como um sítio de glicosilação que foi introduzido ou um sítio potencialmente imunogénico, aqueles aminoácidos podem ser substituídos por resíduos de aminoácidos mais benéficos e a afinidade de ligação reavaliada.

Pode também utilizar-se este método para gerar anticorpos de alta afinidade a partir de um anticorpo parental totalmente humano, substituindo aleatoriamente apenas as regiões CDR, deixando a região estrutural humana intacta.

Devido às técnicas de triagem de alto débito e vetores melhorados, tais como aquele representado na Figura 1, um especialista pode pesquisar rápida e eficientemente uma biblioteca completa de substituições em todos os sítios de uma dada CDR e/ou região estrutural. Ao substituir aleatoriamente e simultaneamente todos os aminoácidos em todas as posições, pode-se pesquisar possíveis combinações que aumentam significativamente a afinidade que não seriam previstas ou identificadas por substituição individual devido a, *e.g.*, sinergia.

PREPARAÇÃO DO ANTICORPO PARENTAL

A. Preparação Alvo

Os alvos solúveis ou fragmentos dos mesmos podem ser utilizados como imunogénios para gerar anticorpos. O

anticorpo é dirigido contra o alvo de interesse. Preferencialmente, o alvo é um polipéptido biologicamente importante e a administração do anticorpo a um mamífero que sofre de uma doença ou distúrbio pode resultar num benefício terapêutico nesse mamífero. No entanto, os anticorpos podem ser dirigidos contra alvos não polipéptidos. Quando o alvo é um polipéptido, ele pode ser uma molécula transmembranar (e.g. recetor) ou um ligando tal como um fator de crescimento. Um alvo da presente invenção é a IgE. Pode utilizar-se células inteiras como o imunogénio para gerar anticorpos. O alvo pode ser produzido de forma recombinante ou feito utilizando métodos de síntese. O alvo pode ser também isolado a partir de uma fonte natural.

Para moléculas transmembranares, tais como recetores, pode utilizar-se fragmentos destas (e.g. o domínio extracelular de um recetor) como o imunogénio. Alternativamente, pode utilizar-se as células que expressam a molécula transmembranar como o imunogénio. Tais células podem ser derivadas de uma fonte natural (e.g. linhas de mastócitos) ou podem ser células que foram transformadas por técnicas recombinantes para expressar a molécula transmembranar. Outros alvos e formas dos mesmos úteis para preparar anticorpos serão evidentes para os especialistas na técnica.

B. Anticorpos Policlonais

Os anticorpos policlonais são geralmente gerados

em mamíferos não humanos por múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do alvo relevante em combinação com um adjuvante. Pode ser útil conjugar o alvo relevante com uma proteína que é imunogénica na espécie a ser imunizada, *e.g.*, hemocianina de lapa californiana. Na técnica são conhecidos muitos agentes capazes de desencadear uma resposta imunológica.

Os animais são imunizados contra o alvo, conjugados imunogénicos ou derivados, combinando a proteína ou conjugado (para coelhos ou murganhos, respetivamente) com adjuvante completo de Freund e injetando a solução por via intradérmica. Um mês depois, os animais são reforçados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de péptido ou conjugado em adjuvante incompleto de Freund por injeção subcutânea em múltiplos sítios. Sete a 14 dias depois, os animais são sangrados e o soro é analisado para o título de anticorpo. Os animais são reforçados até o título atingir um nível estável.

O anticorpo de mamífero selecionado terá normalmente uma afinidade de ligação suficientemente forte para o alvo. Por exemplo, o anticorpo pode ligar o alvo anti-IgE humano com um valor de afinidade de ligação (Kd) de cerca de 1×10^{-8} M. As afinidades do anticorpo podem ser determinadas por ligação de saturação; ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA); e ensaios de competição (*e.g.*, radioimunoensaios).

Para pesquisar anticorpos que liguem o alvo de interesse, pode realizar-se um ensaio de reticulação de rotina, tal como o descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988). Alternativamente, pode realizar-se o mapeamento de epítopo, e.g., como descrito em Champe, et al. *J. Biol. Chem.* 270: 1388-1394 (1995), para determinar a ligação.

C. Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais são anticorpos que reconhecem um único sítio antigénico. A sua especificidade uniforme torna os anticorpos monoclonais muito mais úteis do que os anticorpos policlonais, os quais contêm geralmente anticorpos que reconhecem uma variedade de sítios antigénicos diferentes. Os anticorpos monoclonais podem ser gerados utilizando o método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser gerados por métodos de ADN recombinante.

No método de hibridoma, um murganho ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um roedor, é imunizado como descrito acima para desencadear linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são em seguida fundidos com células

de mieloma utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principals and Practice*, pág. 590-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma assim preparadas são aplicadas e cultivadas num meio de cultura adequado que contém preferencialmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parentais, não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais carecerem da enzima hipoxantina guanina fosforribosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT. As células de mieloma preferidas são aquelas que se fundem eficazmente, suportam a produção estável de alto nível de anticorpo pelas células produtoras de anticorpos selecionadas, e são sensíveis a um meio tal como o meio HAT. Foram descritas linhas de células de mieloma humano e heteromieloma de murganho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbar, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Depois de serem identificadas células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejada, os clones podem ser subclonados

por procedimentos de diluição limitante e cultivados por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103, Academic Press, 1986)). São incluídos os meios de cultura adequados para este fim. Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxilapatite, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

O ADN que codifica os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (e.g., utilizando sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias pesada e leve dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem como uma fonte desse ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vetores de expressão, os quais são em seguida transferidos para células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células NS0, células de ovário de hamster Chinês (CHO), ou células de mieloma para se obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O ADN também pode ser modificado, por exemplo, substituindo as sequências muríneas pela sequência codificante homóloga para os domínios constantes das cadeias pesada e leve humanas (Pat. U.S. N.º 4,816,567; Morrison et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81: 6851 (1984)), ou por união covalente ao polipéptido de imunoglobulina.

D. Anticorpos Humanizados

A humanização é uma técnica para gerar um anticorpo quimérico em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos no mesmo de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente referidos como resíduos de "importação", os quais são tipicamente retirados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones et al, Nature 321: 522-525 (1986); Riechman et al., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyens et al., Science 239:1534-1536 (1988)), substituindo CDRs ou sequências de CDR não humanas pelas sequências correspondentes num anticorpo humano (ver, e.g., Pat U.S. N.º 4,816,567). Como praticado na presente invenção, o anticorpo humanizado pode ter alguns resíduos de CDR e alguns resíduos de FR substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos murídeos.

A escolha dos domínios variáveis humanos, tanto de cadeia leve como pesada, a serem utilizados na preparação dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o chamado método de "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo não humano é comparada com a biblioteca de

sequências de domínios variáveis humanos conhecidos. A sequência humana que é mais próxima daquela do anticorpo parental não humano é então aceita como a região estrutural humana para o anticorpo humanizado (Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chotia et al., J. Mol. Biol. 196: 901 (1987)). Outro método utiliza uma região estrutural particular derivada da sequência consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. A mesma região estrutural pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 (1993)).

E. Fragmentos de Anticorpos

Foram desenvolvidas várias técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, estes fragmentos eram obtidos por digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, e.g., Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) e Brennan et al., Science 229: 81 (1985)). No entanto, estes fragmentos podem ser agora produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de uma biblioteca de anticorpos em fagos. Alternativamente, os fragmentos F(ab')₂-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 outra abordagem, os fragmentos

F(ab')₂ podem ser isolados diretamente da cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para o especialista médico. Noutras formas de realização, o anticorpo de eleição é um fragmento Fv de cadeia simples (scFv). (Pedido de patente PCT WO 93/16185).

PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS DE ALTA AFINIDADE

Uma vez identificado e isolado o anticorpo parental, um ou mais resíduos de aminoácidos são alterados em uma ou mais das regiões variáveis do anticorpo parental. Alternativamente, ou além disso, uma ou mais substituições de resíduos estruturais podem ser introduzidas no anticorpo parental, as quais resultam numa melhoria da afinidade de ligação do anticorpo, por exemplo, à IgE humana. Os exemplos de resíduos da região estrutural a modificar incluem aqueles que não ligam covalentemente, de forma direta, o alvo (Amit et al. Science 233: 747-753 (1986)); interagem com/afetam a conformação da CDR (Chotia et al. J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)); e/ou participam na interface VL-VH (EP 239 400 B1). Em certas formas de realização, a modificação de um ou mais de tais resíduos da região estrutural resulta numa melhoria da afinidade de ligação do anticorpo ao alvo de interesse.

As modificações das propriedades biológicas dos anticorpos podem ser conseguidas selecionando substituições que diferem significativamente no seu efeito sobre a

manutenção de, *e.g.*, (a) a estrutura da cadeia polipeptídica principal na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal; (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. As substituições não conservadoras implicarão a troca de um membro de uma destas classes por outra classe.

As moléculas de ácido nucleico que codificam variantes da sequência de aminoácidos são preparadas por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem a mutagénese mediada por oligonucleótidos (ou específica de um locus), mutagénese por PCR, e mutagénese de cassete de uma variante preparada antes ou uma versão não variante do anticorpo dependente da espécie. O método preferido para gerar variantes é uma síntese mediada por oligonucleótidos. Em certas formas de realização, a variante de anticorpo terá apenas substituições de resíduos numa única região hipervariável, *e.g.* desde cerca de dois a cerca de quinze substituições na região hipervariável.

Um método para gerar a biblioteca de variantes é através da síntese mediada por oligonucleótidos de acordo com o esquema representado na Figura 2. Podem ser sintetizados três oligonucleótidos de aproximadamente 100 nucleótidos cada que abarcam toda a região variável da cadeia leve ou cadeia pesada. Cada oligonucleótido pode compreender: (1) um segmento de 60 aminoácidos gerado pelo

triplete (NNK)₂₀, em que N é qualquer nucleótido e K é G ou T, e (2) uma sobreposição de aproximadamente 15-30 nucleótidos com o oligonucleótido seguinte ou com a sequência do vetor em cada extremidade. Após emparelhamento destes três oligonucleótidos numa reação de PCR, a polimerase preencherá a cadeia oposta, o que gera uma sequência de cadeia dupla completa da região variável da cadeia pesada ou cadeia leve. O número de tripletos podem ser ajustados a qualquer comprimento de repetições e a sua posição dentro do oligonucleótido pode ser escolhida de forma a substituir apenas os aminoácidos numa dada CDR ou região estrutural. Utilizando (NNK), qualquer um dos vinte aminoácidos pode surgir em cada posição nas variantes codificadas. A sequência sobreposta de 5-10 aminoácidos (15-30 nucleótidos) não será substituída, mas esta deve ser escolhida para que caia dentro das regiões empilhadas da região estrutural, ou pode ser substituída por uma ronda de síntese separada ou subsequente. Os métodos para sintetizar oligonucleótidos são bem conhecidos na técnica e estão também comercialmente disponíveis. Os métodos para gerar as variantes de anticorpo a partir destes oligonucleótidos são também bem conhecidos na técnica, *e.g.*, PCR.

A biblioteca das variantes das cadeias pesada e leve, que diferem em posições aleatórias da sua sequência, pode ser construída em qualquer vetor de expressão, tal como um bacteriófago, especificamente o vetor da Fig.1, cada um dos quais contém ADN que codifica uma variante particular das cadeias pesada e leve.

Após produção das variantes de anticorpo, determina-se a atividade biológica da variante relativamente ao anticorpo parental. Como assinalado acima, isto envolve a determinação da afinidade de ligação da variante ao alvo. Existem numerosos métodos de alto débito para pesquisar rapidamente as variantes de anticorpo quanto à sua capacidade para ligar o alvo de interesse.

Uma ou mais das variantes de anticorpo selecionadas a partir desta triagem inicial podem ser depois pesquisadas quanto a uma afinidade de ligação melhorada relativamente ao anticorpo parental. Um método comum para determinar a afinidade de ligação é através da avaliação das constantes de velocidade de associação e dissociação utilizando um sistema de ressonância plasmónica de superfície BIAcore™ (BIAcore, Inc.). Um chip biossensor é ativado para o acoplamento covalente do alvo de acordo com as instruções do fabricante (BIAcore). O alvo é em seguida diluído e injetado sobre o chip para se obter um sinal em unidades de resposta (RU) de material imobilizado. Uma vez que o sinal em RU é proporcional à massa de material imobilizado, isto representa uma gama de densidades de alvo imobilizado na matriz. Os dados de dissociação são ajustados a um modelo de um sítio para se obter o $k_{\text{dissociação}}$ +/- d.p. (desvio padrão das medições). A constante de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_s) é calculada para cada curva de associação, e representada graficamente como uma função da concentração de proteína para se obter a

kassociação +/- e.p. (erro padrão do ajuste). As constantes de dissociação no equilíbrio para a ligação, K_d , são calculadas a partir das medições de SPR como $k_{dissociação}/k_{associação}$. Uma vez que a constante de dissociação no equilíbrio, K_d , é inversamente proporcional à $k_{dissociação}$, pode fazer-se uma estimativa da melhoria da afinidade assumindo que a velocidade de associação ($k_{associação}$) é constante para todas as variantes.

O(s) candidato(s) resultante(s) com alta afinidade pode(m) ser opcionalmente submetido(s) a um ou mais ensaios adicionais da atividade biológica para confirmar que a(s) variante(s) de anticorpo com afinidade de ligação melhorada continuam a manter os atributos terapêuticos desejado. Por exemplo, no caso de um anticorpo anti-IgE, pode pesquisar-se aqueles que bloqueiam a ligação de IgE ao seu recetor e inibem a libertação de histamina. A variante de anticorpo ótima retém a capacidade para ligar-se ao alvo com uma afinidade de ligação significativamente superior ao anticorpo parental.

A(s) variante(s) de anticorpo assim selecionada(s) pode(m) ser submetida(s) a modificações adicionais dependendo frequentemente da utilização pretendida para o anticorpo. Tais modificações podem envolver a alteração adicional da sequência de aminoácidos, a fusão a polipéptido(s) heterólogo(s) e/ou modificações covalentes tais como aquelas elaboradas abaixo. Por exemplo, quaisquer resíduos de cisteínas não envolvidos na manutenção da

conformação apropriada da variante de anticorpo podem ser substituídos, geralmente por serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e impedir a reticulação aberrante. Reciprocamente, pode adicionar-se (uma) ligação(ões) de cisteína ao anticorpo para melhorar a sua estabilidade (em particular, quando o anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv).

VETORES

A invenção também proporciona um ácido nucleico isolado que codifica uma variante de anticorpo como aqui divulgada, vetores e células hospedeiras que compreendem o ácido nucleico, e técnicas recombinantes para a produção da variante de anticorpo. Para a produção recombinante da variante de anticorpo, o ácido nucleico que a codifica é isolado e inserido num vetor replicável para clonagem adicional (amplificação do ADN) ou para expressão. O ADN que codifica a variante de anticorpo é facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (e.g., utilizando sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias pesada e leve da variante de anticorpo).

Há muitos vetores disponíveis. As componentes do vetor incluem geralmente uma ou mais das seguintes: uma sequência sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento potenciador, um promotor e uma sequência de terminação da transcrição.

O vetor de expressão fágico representado na Figura 1 é constituído por um vetor M13 comumente utilizado e o sinal de secreção viral do gene III do próprio M13 para a secreção e triagem rápidas dos Fabs variantes quanto aos critérios apropriados de especificidade de ligação e afinidade mínima. Este vetor não utiliza a sequência do gene III completa, pelo que não há apresentação na superfície da célula bacteriana, mas, pelo contrário, os Fabs são segregados para o espaço periplasmático. Alternativamente, os Fabs poderiam ser expressos no citoplasma e isolados. As cadeias pesada e leve têm, cada, o seu próprio sinal de secreção viral, mas são expressas de forma dependente a partir de um único promotor induzível forte.

O vetor na Figura 1 também proporciona uma etiqueta de His e uma etiqueta myc para purificação e detecção fáceis. Um especialista reconheceria que os Fabs poderiam ser independentemente expressos a partir de promotores separados ou que o sinal de secreção não tem de ser a sequência viral escolhida, mas poderia ser uma sequência sinal procariótica ou eucariótica adequada para a secreção dos fragmentos de anticorpos a partir da célula hospedeira escolhida. Deve também reconhecer-se que as cadeias pesada e leve podem residir em diferentes vetores.

A. Componente de Sequência Sinal

A variante de anticorpo desta invenção pode ser produzida de forma recombinante. A variante pode ser também

expressa como um polipéptido de fusão fundido com um polipéptido heterólogo, o qual é preferencialmente uma sequência sinal ou outro polipéptido que tem um sítio de dissociação específico na extremidade N-terminal da proteína ou polipéptido maduro. A sequência sinal heteróloga selecionada é preferencialmente uma que é reconhecida e processada (*i.e.*, dissociada pela peptidase sinal) pela célula hospedeira. Para as células hospedeiras procarióticas que não reconhecem nem processam a sequência sinal do anticorpo nativo, a sequência sinal pode ser substituída por uma sequência sinal procariótica selecionada, por exemplo, do grupo da fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp ou líderes termoestáveis da enterotoxina II. Ou no caso do vetor da Figura 1, a sequência sinal escolhida foi uma sequência sinal viral do gene III. Para secreção a partir de levedura, a sequência sinal nativa pode ser substituída por, *e.g.*, o líder da invertase de levedura, líder do fator α (incluindo as líderes do fator α de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*), ou líder da fosfatase ácida, o líder da glucoamilase de *C. albicans*, ou um sinal descrito, *e.g.*, na WO 90/13646. Para a expressão em células de mamífero, estão disponíveis sequências sinal de mamífero bem como líderes de secreção virais, por exemplo, o sinal gD de herpes simplex. O ADN para essa região precursora está ligado em grelha de leitura com o ADN que codifica a variante de anticorpo.

B. Componente de Origem de Replicação

Os vetores contêm geralmente uma sequência de

ácido nucleico que permite que o vetor se replique em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Geralmente, esta sequência é uma que permite que o vetor se replique independentemente do ADN cromossômico do hospedeiro, e inclui as origens de replicação ou sequências com replicação autônoma. Tais sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, leveduras e vírus. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo 2 μ é adequada para levedura, e várias origens virais (SV40, polioma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vetores em células de mamíferos. Geralmente, a componente de origem de replicação não é necessária para vetores de expressão de mamíferos (a origem SV40 pode ser tipicamente utilizada apenas porque contém o promotor precoce).

C. Componente de Gene de Seleção

Os vetores podem conter um gene de seleção, também denominado um marcador selecionável. Os genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, *e.g.*, ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis em meios complexos, *e.g.*, o gene que codifica a D-alanina-racemase para Bacilos.

Um exemplo de um esquema de seleção utiliza um

fármaco para parar o crescimento de uma célula hospedeira. Aquelas células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem uma proteína que confere resistência ao fármaco e, desse modo, sobrevivem ao regime de seleção. Os exemplos de uma tal seleção dominante utilizam os fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Outro exemplo de marcadores selecionáveis adequados para células de mamíferos são aqueles que permitem a identificação de células competentes para captar o ácido nucleico do anticorpo, tal como DHFR, timidina-cinase, metalotioneína-I e -II, preferencialmente genes de metalotioneínas de primatas, adenosina-desaminase, ornitina Descarboxilase, etc.

Por exemplo, as células transformadas com o gene de seleção DHFR são primeiro identificadas através da cultura de todos os transformantes num meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada quando é utilizado DHFR de tipo selvagem é a linha de células de ovário de hamster Chinês (CHO) deficiente em atividade DHFR.

Alternativamente, as células hospedeiras (em particular, os hospedeiros de tipo selvagem que contêm DHFR endógena) transformadas ou co-transformadas com sequências de ADN que codificam o anticorpo, proteína DHFR de tipo selvagem e outro marcador selecionável, tal como a

aminoglicósido-3'-fosfotransferase (APH), podem ser selecionadas por crescimento de células em meio que contém um agente de seleção para o marcador selecionável tal como um antibiótico aminoglicosídico, e.g., canamicina, neomicina ou G418. (Pat. U.S. N.º 4,965,199).

Um gene de seleção adequado para utilização em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura Yrp7 (Stinchcomb et al., Nature 282: 39 (1979)). O gene *trp1* proporciona um marcador de seleção para uma estirpe variante de levedura que carece da capacidade para crescer em triptofano, por exemplo, ATCC N.º 44076 ou PEP4-1. Jones, Genetics 85:12 (1977). A presença de lesão de *trp1* no genoma da célula hospedeira de levedura proporciona então um ambiente eficaz para detetar a transformação por crescimento na ausência de triptofano. De forma semelhante, as estirpes de levedura deficientes em *Leu2* (ATCC 20.622 ou 38.626) são complementadas por plasmídeos conhecidos que têm o gene *Leu2*.

D. Componente Promotor

Os vetores de expressão e clonagem contêm geralmente um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operacionalmente ligado ao ácido nucleico do anticorpo. Os promotores adequados para utilização com hospedeiros procarióticos incluem o promotor *phoA*, sistemas promotores de β -lactamase e lactose, fosfatase alcalina, um sistema promotor de triptofano (*trp*) e promotores híbridos

tais como o promotor tac. No entanto, são adequados outros promotores bacterianos conhecidos. Os promotores para utilização em sistemas bacterianos podem conter também uma sequência Shine-Dalgarno (S.D.) operacionalmente ligada ao ADN que codifica o anticorpo.

São conhecidas sequências promotoras para eucariotas. Praticamente todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases a montante do sítio onde é iniciada a transcrição. Outra sequência encontrada 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT, em que N pode ser qualquer nucleótido. Na extremidade 3' a maioria dos genes eucarióticos é uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para a adição da cauda de poli A à extremidade 3' da sequência codificante. Todas estas sequências são inseridas de modo adequado nos vetores de expressão eucarióticos.

Os exemplos de sequências promotoras adequadas para utilização com hospedeiros de levedura incluem os promotores para a 3-fosfoglicerato-cinase ou outras enzimas glicolíticas, tais como a enolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, hexocinase, piruvato-descarboxilase, fosfofructocinase, glicose-6-fosfato-isomerase, 3-fosfoglicerato-mutase, piruvato-cinase, triosefosfato-isomerase, fosfoglicose-isomerase e glicocinase.

Outros promotores de levedura, os quais são

promotores induzíveis que têm a vantagem adicional de transcrição controlada pelas condições de crescimento, são as regiões promotoras para a álcool-desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas ao metabolismo de azoto, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Os vetores e promotores adequados para utilização na expressão em levedura são adicionalmente descritos na EP 73,657. Os potenciadores para a levedura são também vantajosamente utilizados com promotores para a levedura.

A transcrição 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 vírus de polioma, vírus da varíola aviária, adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e, muito preferencialmente, vírus 40 Síbio (SV40), a partir de promotores mamíferos heterólogos, e.g., o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico - desde que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

Os promotores precoce e tardio do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição de SV40 que também contém a origem viral de replicação do SV40. O promotor precoce imediato do citomegalovírus humano

é convenientemente obtido como um fragmento de restrição de HindIII E. Um sistema para expressar o ADN em hospedeiros mamíferos utilizando o vírus do papiloma bovino como um vetor é divulgado na Pat. U.S. N.º 4,419,446. Uma modificação deste sistema é descrita na Pat. U.S. N.º 4,601,978. Alternativamente, o ADNc do interferão β humano foi expresso em células de murganho sob o controlo de um promotor de timidina-cinase a partir do vírus herpes simplex. Alternativamente, a repetição terminal longa do vírus de sarcoma de rous pode ser utilizado como o promotor.

E. Componente de Elemento Potenciador

A transcrição de um ADN que codifica o anticorpo desta invenção por eucariotas superiores é frequentemente aumentada inserindo uma sequência potenciadora no vetor. Agora são conhecidas muitas sequências potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, α -feto-proteína e insulina). No entanto, tipicamente, utilizar-se-á um potenciador de um vírus de célula eucariótica. Os exemplos incluem o potenciador de SV40 do lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o potenciador do promotor precoce de citomegalovírus, o potenciador de polioma do lado tardio da origem de replicação e os potenciadores de adenovírus. Ver também Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre os elementos potenciadores para a ativação dos promotores eucarióticos. O potenciador pode ser inserido por excisão-união no vetor numa posição 5' ou

3' relativamente à sequência codificante do anticorpo, mas está preferencialmente localizado num sítio 5' do promotor.

F. Componente de Terminação da Transcrição

Os vetores de expressão utilizados em células hospedeiras eucarióticas (células de levedura, fungos, insetos, plantas, animais, humanos ou nucleadas de outros organismos multicelulares) podem conter também sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilizar o ARNm. Tais sequências estão comumente disponíveis a partir das regiões não traduzidas 5' e, ocasionalmente 3', de ADNs ou ADNcs eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do ARNm que codifica o anticorpo. Um componente de terminação da transcrição útil é a região de poliadenilação da hormona de crescimento bovina. Ver e.g., W094/11026.

SELEÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS

As células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão do ADN nos vetores aqui são células procarióticas, de levedura ou eucarióticas superiores. Os procariotas adequados para este efeito incluem organismos Gram-negativos e Gram-positivos, por exemplo, Enterobactérias tais como *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* e *Shigella*, bem como Bacilos, *Pseudomonas* e *Streptomyces*. Um hospedeiro de

clonagem de *E. coli* preferido é a *E. coli* 294 (ATCC 31 446), embora sejam adequadas outras estirpes tais como *E. coli* B, *E. coli* X17776 (ATCC 31 537) e *E. coli* W3110 (ATCC 27 325). Estes exemplos são ilustrativos em vez de limitativos.

Além dos procariotas, os micróbios eucarióticos tais como os fungos filamentosos ou a levedura são hospedeiros de clonagem ou expressão adequados para os vetores que codificam o anticorpo. A *Saccharomyces cerevisiae* é o mais comumente utilizado entre os microrganismos hospedeiros eucarióticos inferiores. No entanto, um número de outros géneros, espécies e estirpes são aqui comumente disponíveis e úteis, tais como *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*; *Candida*; *Trichoderma*; *Neurospora crassa*; e fungos filamentosos tais como *e.g.*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyposcladium*, e hospedeiros de *Aspergillus*, tais como *A. nidulans* e *A. niger*.

As células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpos glicosilados são derivadas de organismos multicelulares. Em princípio, qualquer cultura de células eucarióticas superiores pode ser trabalhada, quer seja de cultura de vertebrados ou invertebrados. Os exemplos de células de invertebrados incluem células vegetais e de insetos, Luckow et al., *Bio/Technology* 6, 47-55 (1988); Miller et al., *Genetic Engineering*, Setlow et al. eds. Vol. 8, pág. 277-279 (Plenam publishing 1986); Mseda et al., *Nature* 315, 592-594 (1985). Foram identificadas numerosas

estirpes e variantes baculovirais e correspondentes células hospedeiras de inseto permissivas a partir de hospedeiros tais como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e *Bombyx mori*. Uma variedade de estirpes virais para transfeção estão publicamente disponíveis, *e.g.*, a variante L-1 de *Autographa californica* NPV e a estirpe Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, e tais vírus podem ser aqui utilizados como o vírus de acordo com a presente invenção, particularmente para transfeção de células de *Spodoptera frugiperda*. Além do mais, as culturas de células vegetais de algodão, milho, batata, soja, petúnia, tomate e tabaco podem ser também utilizadas como hospedeiros.

As células de vertebrados e a propagação de células de vertebrados, em cultura (cultura de tecido), tornou-se um procedimento de rotina. Ver *Tissue Culture*, Academic Press, Kruse and Patterson, eds. (1973). Os exemplos de linhas de células hospedeira de mamífero úteis são de rim de macaco; linha de rim embrionário humano; células de rim de cria de hamster; células de ovário de hamster Chinês/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células de Sertoli de murganho; células de carcinoma cervical humano (HELA); células de rim canino; células de pulmão humano; células de fígado humano; tumor mamário de murganho; e células NS0.

As células hospedeiras são transformadas com os vetores descritos acima para a produção de anticorpos e

cultivadas em meio nutriente convencional modificado consoante apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas.

As células hospedeiras utilizadas para produzir a variante de 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 cultivar células hospedeiras. Além disso, qualquer um dos meios descritos em Ham et al., Meth. Enzymol. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Pat. U.S. N.º 4,767,704; 4,657,866; 4,560,655; 5,122,469; 5,712,163; ou 6,048,728 podem ser utilizados como meios de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado, consoante necessário, com hormonas e/ou outros fatores de crescimento (tais como insulina, transferrina ou o fator de crescimento epidérmico), sais (tais como cloretos de X, em que X é sódio, cálcio, magnésio; e fosfatos), tampões (tais como HEPES), nucleótidos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como o fármaco GENTAMICINA.TM.), oligoelementos (definidos como compostos inorgânicos geralmente presentes em concentrações finais na gama dos micromolar), e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Podem ser também incluídos quaisquer outros suplementos necessários a concentrações apropriadas que seriam

conhecidos dos especialistas na técnica. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e semelhantes, são aquelas previamente utilizadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e serão evidentes para o especialista com conhecimentos médios.

PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO

Quando se utilizam técnicas recombinantes, a variante de anticorpo pode ser produzida intracelularmente, no espaço periplasmático, ou segregada diretamente para o meio. Se a variante de anticorpo é produzida intracelularmente, como um primeiro passo, os detritos em partículas, quer sejam células hospedeiras ou fragmentos lisados, podem ser removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) descrevem um procedimento para isolar anticorpos que são segregados para o espaço periplasmático de *E. coli*. Resumidamente, a pasta de células é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA e fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) ao longo de cerca de 30 minutos. Os detritos celulares podem ser removidos por centrifugação. Nos casos em que a variante de anticorpo é segregada para o meio, os sobrenadantes de tais sistemas de expressão são geralmente primeiro concentrados utilizando um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Pode ser incluído um inibidor de protease tal como PMSF em qualquer um dos passos

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 utilizando, por exemplo, cromatografia de hidroxilapatite, eletroforese em gel, diálise e cromatografia de afinidade, sendo a cromatografia de afinidade a técnica de purificação preferida. A aptidão da proteína A como um ligando de afinidade depende da espécie e isotipo de qualquer domínio Fc de imunoglobulina que esteja presente na variante de anticorpo. A Proteína A pode ser utilizada para purificar anticorpos que se baseiam em cadeias pesadas de IgG1, IgG2 ou IgG4 humana (Lindmark et al., J. Immunol Meth. 62: 1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isotipos de murganhos e para a IgG3 humana (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligando de afinidade está ligado é muito frequentemente agarose, mas estão disponíveis outras matrizes. As matrizes mecanicamente estáveis tais como o vidro de poro controlado ou poli(estirenodivinil)benzeno permitem caudais mais rápidos e tempos de processamento mais curtos do que podem ser conseguidos com a agarose. Quando a variante de anticorpo compreende um domínio CH3, a resina ABXTM Bakerbond (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) é útil para purificação. Outras técnicas para a purificação de proteínas tais como fracionamento numa coluna de troca iónica, precipitação com etanol, HPLC de fase inversa, cromatografia sobre sílica, cromatografia sobre heparina

SEPHAROSE™, cromatografia sobre uma resina de troca aniônica ou catiônica (tal como uma coluna de poli(ácido aspártico)), cromatofocagem, SDS-PAGE e precipitação com sulfato de amônio estão também disponíveis dependendo da variante de anticorpo a ser recuperada.

Após quaisquer passo(s) de purificação preliminar(es), a mistura que compreende a variante de anticorpo de interesse e contaminantes pode ser submetida a cromatografia de interação hidrófoba de pH baixo utilizando um tampão de eluição a um pH entre cerca de 2,5-4,5, preferencialmente realizada a baixas concentrações de sal (e.g., sal desde cerca de 0-0,25M).

FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

As formulações terapêuticas do polipéptido ou anticorpo podem ser preparadas para armazenagem como formulações liofilizadas ou soluções aquosas, misturando o polipéptido que tem o grau de pureza desejado com veículos, excipientes ou estabilizantes "farmaceuticamente aceitáveis" opcionais, tipicamente utilizados na técnica (os quais são todos denominados "excipientes"). Por exemplo, agentes tampão, estabilizantes, conservantes, agentes de isotonicidade, detergentes não iônicos, antioxidantes e outros aditivos de vários tipos. (ver Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osol, Ed. (1980)). Tais aditivos têm de ser não tóxicos para os recetores nas dosagens e concentrações utilizadas.

Os agentes tampão ajudam a manter o pH na gama que se aproxima das condições fisiológicas. Preferencialmente, estão presentes a uma concentração que vai desde cerca de 2 mM a cerca de 50 mM. Os agentes tampão adequados para utilização com a presente invenção incluem ácidos orgânicos e inorgânicos e os seus sais tais como tampões de citrato (e.g., mistura de citrato monossódico-citrato dissódico, mistura de ácido cítrico-citrato trissódico, mistura de ácido cítrico-citrato monossódico, etc.), tampões de succinato (e.g., mistura de ácido succínico-succinato monossódico, mistura de ácido succínico-hidróxido de sódio, mistura de ácido succínico-succinato dissódico, etc.), tampões de tartrato (e.g., mistura de ácido tartárico-tartrato de sódio, mistura de ácido tartárico-tartrato de potássio, mistura de ácido tartárico-hidróxido de sódio, etc.), tampões de fumarato (e.g., mistura de ácido fumárico-fumarato monossódico, etc.), tampões de fumarato (e.g., mistura de ácido fumárico-fumarato monossódico, mistura de ácido fumárico-fumarato dissódico, mistura de fumarato monossódico-fumarato dissódico, etc.), tampões de gluconato (e.g., mistura de ácido glucónico-gliconato de sódio, mistura de ácido glucónico-hidróxido de sódio, mistura de ácido glucónico-gliconato de potássio, etc.), tampão de oxalato (e.g., mistura de ácido oxálico-oxalato de sódio, mistura de ácido oxálico-hidróxido de sódio, mistura de ácido oxálico-oxalato de potássio, etc.), tampões de lactato (e.g., mistura de ácido láctico-lactato de sódio, mistura de ácido láctico-hidróxido de sódio,

mistura de ácido láctico-lactato de potássio, etc.) e tampões de acetato (e.g., mistura de ácido acético-acetato de sódio, mistura de ácido acético-hidróxido de sódio, etc.). Adicionalmente, podem ser mencionados tampões de fosfato, tampões de histidina e sais de trimetilamina tais como Tris.

Podem ser adicionados conservantes para retardar o crescimento microbiano e podem ser adicionados em quantidades que vão desde 0,2%-1% (p/v). Os conservantes adequados para utilização com a presente invenção incluem fenol, álcool benzílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloreto de octadecildimetilbenzilamónio, halogenetos de benzalcónio (e.g., cloreto, brometo, iodeto), cloreto de hexametónio, alquilparabenos tais como metil- ou propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclo-hexanol e 3-pentanol.

Podem ser adicionados agentes de isotonicidade por vezes conhecidos como "estabilizantes" para assegurar a isotonicidade das composições líquidas da presente invenção e incluem açúcar-álcoois poli-hídricos, preferencialmente açúcar-álcoois tri-hídricos ou superiores, tais como glicerina, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol e manitol.

Estabilizantes refere-se a uma categoria ampla de excipientes que podem variar em função desde um agente de volume até um aditivo que solubiliza o agente terapêutico

ou ajuda a prevenir a desnaturação ou a aderência à parede do recipiente. Os estabilizantes típicos podem ser açúcar-álcoois poli-hídricos (enumerados acima); aminoácidos tais como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutâmico, treonina, etc., açúcares orgânicos ou açúcar-álcoois, tais como lactose, trealose, estaquiase, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol e semelhantes, incluindo ciclitóis tais como o inositol; polietileno glicol; polímeros de aminoácidos; agentes de redução contendo enxofre, tais como ureia, glutationa, ácido tióctico, tioglicolato de sódio, tioglicerol, .alfa.-monotioglicerol e tiosulfato de sódio; polipéptidos de baixo peso molecular (*i.e.* <10 resíduos); proteínas tais como albumina de soro humano, albumina de soro bovino, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tais como monossacáridos de polivinilpirrolidona, tais como xilose, manose, frutose, glicose; dissacáridos tais como lactose, maltose, sacarose e trissacáridos tais como rafinose; polissacáridos tais como dextrano. Os estabilizantes podem estar presentes na gama desde 0,1 a 10 000 partes em peso por peso de proteína ativa.

Podem ser adicionados tensioativos ou detergentes não iônicos (também conhecidos como "humectantes") para ajudar a solubilizar o agente terapêutico bem como para proteger a proteína terapêutica contra a agregação induzida pela agitação, o que também permite que a formulação seja exposta a tensões de cisalhamento superficiais sem originar

desnaturação da proteína. Os tensioativos não iônicos adequados incluem polissorbatos (20, 80, etc.), polioxâmeros (184, 188 etc.), polióis Plurónico.RTM., monoéteres de polioxietileno sorbitano (Tween.RTM.-20, Tween.RTM.-80, etc.). Os tensioativos não iônicos podem estar presentes numa gama de cerca de 0,05 mg/mL a cerca de 1,0 mg/mL, preferencialmente cerca de 0,07 mg/mL a cerca de 0,2 mg/mL.

Os excipientes de outros tipos adicionais incluem agentes de volume, (e.g. amido), agentes quelantes (e.g. EDTA), antioxidantes (e.g., ácido ascórbico, metionina, vitamina E), e co-solventes. A formulação aqui pode conter também mais do que um composto ativo consoante necessário para a indicação particular a ser tratada, preferencialmente aqueles com atividades complementares que não afetem desfavoravelmente entre si. Por exemplo, pode ser desejável proporcionar adicionalmente um agente imunossupressor. Tais moléculas estão adequadamente presentes em associação em quantidades que são eficazes para o fim pretendido. Os ingredientes ativos podem ser também capturados em microcápsula preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respetivamente, em sistemas de administração de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osal, Ed. (1980).

As formulações para serem utilizadas para administração in vivo têm de ser estéreis. Isto é facilmente conseguido, por exemplo, por filtração através de membranas de filtração estéreis. Podem ser preparadas preparações de libertação sustentada. Os exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrófobos sólidos que contêm a variante de anticorpo, matrizes essas que estão na forma de artigos moldados, e.g., películas, ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogeles (por exemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), ou poli(álcool vinílico)), polilactídeos (Pat U.S. N.º 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo não degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico-ácido glicólico tais como o LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis constituídas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Enquanto os polímeros tais como etileno-acetato de vinilo e ácido láctico-ácido glicólico permitem a libertação de moléculas durante mais de 100 dias, certos hidrogeles libertam as proteínas durante intervalos de tempo mais curtos. Quando os anticorpos encapsulados permanecem no corpo durante um tempo longo, eles podem desnaturar ou agregar-se como consequência da exposição à humidade a 37° C, resultando numa perda de atividade biológica e possíveis alterações na imunogenicidade. Podem ser concebidas estratégias racionais

para estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se se descobrir que o mecanismo de agregação é por formação de uma ligação S-S intermolecular através da troca de tiodissulfuretos, a estabilização pode ser conseguida modificando os resíduos de sulfidrilo, liofilizando a partir de soluções ácidas, controlando o teor de humidade, utilizando aditivos apropriados e desenvolvendo composições de matrizes poliméricas específicas.

A quantidade de polipéptido, anticorpo ou seu fragmento terapêutico que será eficaz no tratamento de um distúrbio ou condição particular dependerá da natureza do distúrbio ou condição, e pode ser determinada por técnicas clínicas padrão. Quando seja possível, é desejável que se determine a curva dose-resposta e as composições farmacêuticas da invenção primeiro *in vitro* e, em seguida, em sistemas modelo em animais úteis antes de as testar em humanos.

Preferencialmente, uma solução aquosa de polipéptido, anticorpo ou seu fragmento terapêutico é administrada por injeção subcutânea. Cada dose pode variar desde cerca de 0,5 µg a cerca de 50 µg por quilograma de peso corporal, ou mais preferencialmente, desde cerca de 3 µg a cerca de 30 µg por quilograma de peso corporal.

O plano posológico para administração subcutânea pode variar desde uma vez por mês até diariamente dependendo de um número de fatores clínicos, incluindo o

tipo de doença, gravidade da doença, e a sensibilidade do indivíduo ao agente terapêutico.

UTILIZAÇÕES PARA A VARIANTE DE ANTICORPO

As variantes de anticorpo da invenção podem ser utilizadas como agentes de purificação por afinidade. Neste processo, os anticorpos são imobilizados numa sólida fase tal como resina de SEPHADEX™ ou papel de filtro, utilizando métodos bem conhecidos na técnica. A variante de anticorpo imobilizada é posta em contacto com uma amostra que contém o alvo a ser purificado, e depois disso o suporte é lavado com um solvente adequado que removerá substancialmente todo o material na amostra exceto o alvo a ser purificado, o qual fica ligado à variante de anticorpo imobilizada. Finalmente, o suporte é lavado com outro solvente adequado, tal como tampão de glicina, que libertará o alvo da variante de anticorpo.

Os anticorpos variantes podem ser também úteis em ensaios de diagnóstico, e.g., para detetar a expressão de um alvo de interesse em células, tecidos ou soro específicos. Para aplicações em diagnóstico, a variante de anticorpo será tipicamente marcada com uma unidade detetável. Estão disponíveis muitos marcadores. As técnicas para quantificar uma alteração na fluorescência são descritas acima. O substrato quimioluminescente torna-se eletronicamente excitado por uma reação química e pode emitir, em seguida, luz que pode ser medida (utilizando,

por exemplo, um quimioluminómetro) ou doa energia a um aceitador fluorescente. Os exemplos de marcadores enzimáticos incluem luciferases (e.g., luciferase de pirilampo e luciferase bacteriana; Pat. U.S. N.º 4,737,456), luciferina, 2,3-di-hidroftalazinadionas, malato-desidrogenase, urease, peroxidase tal como peroxidase de rábano-silvestre (HRPO), fosfatase alcalina, .beta.-galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacárido-oxidases (e.g., glicose-oxidase, galactose-oxidase e glicose-6-fosfato-desidrogenase), oxidases de heterocíclicos (tais como uricase e xantina-oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase e semelhantes. As técnicas para conjugar enzimas a anticorpos são descritas em O'Sullivan et al., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (Ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981).

Por vezes, o marcador é conjugado indiretamente com a variante de anticorpo. O especialista estará ciente das várias técnicas para conseguir isto. Por exemplo, a variante de anticorpo pode ser conjugada com biotina e qualquer uma das três grandes categorias de marcadores mencionadas acima pode ser conjugada com avidina, ou vice-versa. A biotina liga-se seletivamente à avidina e, desse modo, o marcador pode ser conjugado com a variante de anticorpo desta maneira indireta. Alternativamente, para se conseguir a conjugação indireta do marcador com a variante de anticorpo, a variante de anticorpo é conjugada com um hapteno pequeno (e.g. digloxina) e um dos diferentes tipos

de marcadores mencionados acima é conjugado com uma variante de anticorpo anti-hapteno (e.g. anticorpo anti-digloxina). Deste modo, pode conseguir-se a conjugação indireta do marcador com a variante de anticorpo.

Noutra forma de realização da invenção, a variante de anticorpo não tem de ser marcada e a presença da mesma pode ser detetada utilizando um anticorpo marcado, o qual se liga à variante de anticorpo.

Os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados em qualquer método de ensaio conhecido, tais como os ensaios de ligação competitiva, os ensaios tipo sanduíche diretos e indiretos, e os ensaios de imunoprecipitação. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pág. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Os ensaios de ligação competitiva baseiam-se na capacidade de um padrão marcado para competir com a amostra de ensaio para ligação a uma quantidade limitada de variante de anticorpo. A quantidade de alvo na amostra de ensaio é inversamente proporcional à quantidade de padrão que se liga aos anticorpos. Para facilitar a determinação da quantidade de padrão que se liga, os anticorpos estão geralmente insolubilizados antes ou após a competição. Como consequência, o padrão e a amostra de ensaio que estão ligados aos anticorpos podem ser convenientemente separados do padrão e da amostra de ensaio que permanecem não ligados.

Os ensaios de tipo sanduíche envolvem a utilização de dois anticorpos, cada um capaz de se ligar a uma porção imunogénica, ou epítopo, diferente ou à proteína a ser detetada. Num ensaio de tipo sanduíche, a amostra de ensaio a ser analisado é ligada por um primeiro anticorpo que está imobilizado num suporte sólido e, depois disso, um segundo anticorpo liga-se à amostra de ensaio, formando assim um complexo de três partes insolúvel. Ver *e.g.*, Pat. U.S. N.º 4,376,110. O segundo anticorpo pode estar ele mesmo marcado com uma unidade detetável (ensaios de tipo sanduíche diretos) ou pode ser medido utilizando um anticorpo anti-imunoglobulina que está marcado com uma unidade detetável (ensaio de tipo sanduíche indireto). Por exemplo, um tipo de ensaio de tipo sanduíche é um ensaio ELISA, em cujo caso a unidade detetável é uma enzima.

Para imuno-histoquímica, a amostra de tumor pode ser fresca ou congelado ou pode ser embutida em parafina e fixada com um conservante tal como, por exemplo, formalina.

Os anticorpos podem ser também utilizados para ensaios de diagnóstico *in vivo*. Em geral, a variante de anticorpo é marcada com um radionucleótido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P ou ^{35}S) para que o tumor possa ser localizado utilizando imunocintigrafia. Por exemplo, um anticorpo anti-IgE de alta afinidade da presente invenção pode ser utilizado para detetar a quantidade de IgE presente, *e.g.*, nos pulmões de um doente asmático.

O anticorpo da presente invenção pode ser proporcionado num kit, *i.e.*, combinação embalada de reagentes em quantidades predeterminadas com instruções para realizar o ensaio de diagnóstico. Quando a variante de anticorpo é marcada com uma enzima, o kit pode incluir substratos e cofatores necessários para a enzima (*e.g.*, um precursor de substrato que proporciona o cromóforo ou fluoróforo detetável). Além disso, podem ser incluídos outros aditivos tais como estabilizantes, tampões (*e.g.*, um tampão de bloqueio ou tampão de lise) e semelhantes. As quantidades relativas dos vários reagentes podem ser amplamente modificadas para proporcionar concentrações em solução dos reagentes que otimizem substancialmente a sensibilidade do ensaio. Em particular, os reagentes podem ser proporcionados como pós secos, geralmente liofilizados, incluindo excipientes que, em dissolução, proporcionarão uma solução reagente com a concentração apropriada.

UTILIZAÇÕES IN VIVO PARA O ANTICORPO

É considerado que os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados para tratar um mamífero. Numa forma de realização, o anticorpo é preparado para ser administrado a um mamífero não humano, por exemplo, com a finalidade de se obter dados pré-clínicos. Os mamíferos não humanos ilustrativos a serem tratados incluem primatas não humanos, cães, gatos, roedores e outros mamíferos nos quais se realizam os estudos pré-clínicos. Tais mamíferos podem

ser modelos animais estabelecidos para uma doença a ser tratada com o anticorpo ou podem ser utilizados para estudar a toxicidade do anticorpo de interesse. Em cada uma destas formas de realização, pode realizar-se estudos de aumento progressivo da dose no mamífero.

O anticorpo ou polipéptido é administrado por qualquer meio adequado, incluindo administração parentérica, subcutânea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, e, se desejado para tratamento imunossupressor local, administração intralesional. As infusões parentéricas incluem a administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. Além disso, a variante de anticorpo é adequadamente administrada através de infusão em impulsos, particularmente com doses decrescentes da variante de anticorpo. Preferencialmente, a dose é administrada por injeções, muito preferencialmente injeções intravenosas ou subcutâneas, dependendo, em parte, se a administração é breve ou crónica.

Para a prevenção ou tratamento de doença, a dosagem apropriada do anticorpo ou polipéptido dependerá do tipo de doença a ser tratada, da gravidade e evolução da doença, quer a variante de anticorpo seja administrada para profiláticos ou terapêuticos, de terapia anterior, dos antecedentes clínicos do doente e da resposta à variante de anticorpo, e o critério do médico assistente. Os anticorpos anti-IgE humana de muito alta afinidade podem ser administrados de modo adequado ao doente de uma única vez ou ao longo de uma série de tratamentos.

Dependendo do tipo e gravidade da doença, cerca de 0,1 mg/kg a 150 mg/kg (e.g., 0,1-20 mg/kg) de anticorpo é uma dosagem candidata inicial para administração ao doente, quer seja, por exemplo, por uma ou mais administrações separadas ou por infusão contínua. Uma dosagem diária típica pode variar desde cerca de 1 mg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que ocorra uma supressão desejada dos sintomas de doença. No entanto, podem ser úteis outros regimes posológicos. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado por técnicas e ensaios convencionais. Um regime posológico ilustrativo para um anticorpo anti-LFA-1 ou anti-ICAM-1 é divulgado na WO 94/04188.

A composição da variante de anticorpo será formulada, doseada e administrada de uma maneira coerente com a boa prática médica. Os fatores a considerar neste contexto incluem o distúrbio particular a ser tratado, o mamífero particular a ser tratado, a condição clínica do doente particular, a causa do distúrbio, o sítio de administração do agente, o método de administração, o plano de administração e outros fatores conhecidos para os médicos. A "quantidade terapêuticamente eficaz" da variante de anticorpo a ser administrada será governada por tais

considerações e é a quantidade mínima necessária para prevenir, melhorar ou tratar uma doença ou distúrbio. A variante de anticorpo não precisa de estar, mas está, opcionalmente, formulada com um ou mais agentes atualmente utilizados para prevenir ou tratar o distúrbio em questão. A quantidade eficaz de esses outros agentes depende da quantidade de anticorpo presente na formulação, do tipo de distúrbio ou tratamento, e de outros fatores discutidos acima. Estes são geralmente utilizados nas mesmas doses e pelas vias de administração que as utilizadas acima ou desde cerca de 1 a 99% das doses utilizadas até à data.

Os anticorpos da presente invenção que reconhecem a IgE como o seu alvo podem ser utilizados para tratar "distúrbios mediados por IgE". Estes incluem doenças tais como asma, rinite alérgica e conjuntivite (febre dos fenos), eczema, urticária, dermatite atópica e alergias alimentares. É também aqui divulgada a condição fisiológica grave de choque anafilático provocada, e.g., por picadas de abelha, mordeduras de cobra, alimentação ou medicação.

EXEMPLOS

Exemplo 1 Humanização do MAb Murídeo Anti-IgE TES-C21

As sequências da região variável da cadeia pesada (V_H) e da região variável da cadeia leve (V_L) do mAb

murídeo TES-C21 foram comparadas com as sequências da linha germinal de anticorpos humanos disponíveis nas bases de dados públicas. Foram utilizados vários critérios ao decidir sobre uma cadeia molde como se descreve no passo 1 acima, incluindo o comprimento global, posição semelhante na CDR dentro da região estrutural, homologia global, tamanho da CDR, etc. Todos estes critérios tomados em conjunto proporcionaram um resultado para escolher a cadeia molde humana ótima como se mostra no alinhamento de sequências entre as sequências das cadeias pesada e leve do MAb TES-C21 e as respectivas sequências molde humanas representadas nas Figuras 3A e 3B.

Neste caso, utilizou-se mais do que uma cadeia molde estrutural humana para conceber este anticorpo. A cadeia molde humana escolhida para a cadeia V_H foi uma combinação de DP88 (resíduos de aa 1-95) e JH4b (resíduos de aa 103-113) (ver Figura 3B). A cadeia molde humana escolhida para a cadeia V_L foi uma combinação de L16 (VK subgrupo III, resíduos de aa 1-87) combinada com JK4 (resíduos de aa 98-107) (ver Figura 3A). A homologia estrutural entre a sequência murídea e a cadeia molde humana foi de cerca de 70% para a V_H e cerca de 74% para a V_L .

Uma vez escolhida a cadeia molde, construiu-se uma biblioteca de Fab por síntese de ADN e PCR sobreposta, como se descreveu acima e representa na Fig.2. A biblioteca

era constituída pelas CDRs de TES-C21 sintetizadas com as respectivas cadeias molde humanas escolhidas, DP88/JH4b e L16/JK4. A complexidade da biblioteca foi de 4096 ($= 2^{12}$). Os nucleótidos sobrepostos que codificam sequências parciais de V_H e V_L foram sintetizados na gama de cerca de 63 a cerca de 76 nucleótidos com 18 a 21 sobreposições de nucleótidos.

A amplificação por PCR do gene de V_L e V_H foi realizada utilizando um iniciador direto biotinizado contendo a sequência específica da região estrutural FR1 e uma sequência saliente emparelhada com a extremidade da sequência líder (Genell1) e um iniciador inverso da região constante conservada (C_K ou CH1) sob condições de PCR padrão. O produto de PCR foi purificado por eletroforese em gel de agarose, ou por um kit de purificação por PCR comercial para remover os iniciadores biotinizados não incorporados e a PCR não específica.

A fosforilação 5' do produto de PCR foi realizada utilizando 2 μg de produto de PCR, 1 μL de polinucleótido cinase T4 (10 unidades/ μL), 2 μL de 10x PNK tampão, 1 μL de ATP 10 mM num volume total de 20 μL ajustado com ddH₂O. Após incubação a 37 °C durante 45 minutos, e desnaturação térmica a 65 °C durante 10 min, o volume reacional foi ajustado a 200 μL adicionando ddH₂O para o passo seguinte.

Os 100 μL de esférulas magnéticas revestidas com

estreptavidina foram lavados duas vezes com 200 μ L de tampão B&W a 2x e ressuspensos em 200 μ L de tampão B&W 2x. O produto de PCR fosforilado foi misturado com esférulas e incubado à temperatura ambiente (TA) durante 16 min com agitação suave.

As esférulas foram sedimentadas e lavadas duas vezes com 200 μ L de tampão B&W 2x. O ADNss (cadeia negativa) não biotinilado foi eluído com 300 μ L de NaOH 0,15 M recém-preparado à TA durante 10 min com agitação suave. Uma segunda eluição com NaOH pode aumentar o rendimento ligeiramente (opcional). O eluente foi centrifugado para remover quaisquer restos de esférulas.

O ADNss foi precipitado a partir do sobrenadante adicionando 1 μ L de glicogénio (10 mg/mL), 1/10 volume de NaOAc 3M (pH 5,2) e 2,5 volumes de EtOH. O ADNss precipitado foi em seguida lavado com EtOH a 70%, seguido de liofilização durante 3 min e dissolução em 20 μ L de ddH₂O. O ADNss foi quantificado por aplicação em pontos numa placa de agarose com brometo de etídio (EtBr) com padrões de ADN, ou medindo a OD₂₆₀.

Exemplo 2 Clonagem de V_H e V_L no Vetor de Expressão de Fagos

As V_H e V_L foram clonadas num vetor de expressão para fagos através de mutagénese por hibridação. As cadeias

molde uridiniladas foram preparadas infetando a estirpe de *E. coli* CJ236 (*dut⁻ ung⁻*) com o fago baseado em M13 (vetor de expressão para fagos TN003).

Os seguintes componentes [200 ng de vetor fágico uridinilado (8,49 kb); 92 ng de cadeia H monocatenária fosforilada (489 bases); 100 ng de cadeia L monocatenária fosforilada (525 bases); 1 µL de tampão de emparelhamento a 10X; ajustando o volume com ddH₂O a 10 µL] foram emparelhados (a uma proporção molar de aproximadamente 8 vezes de inserção para vetor) por PCR mantendo a temperatura a 85 °C durante 5 min (desnaturação) e em seguida aumentando até 55 °C ao longo de 1 hora. As amostras foram geladas em gelo.

Ao produto emparelhado foram adicionados os seguintes componentes: 1,4 µL de tampão de síntese a 10 X; 0,5 µL de ADN-ligase de T4 (1 unidade/µL); 1 µL de ADN-polimerase de T4 (1 unidade/µL) seguidos de incubação sobre gelo durante 5 min e 37 °C durante 1,5 horas. O produto foi em seguida precipitado com etanol, e dissolvido em 10 µL de ddH₂O ou TE.

O ADN foi digerido com 1 µL de *Xba*I (10 unidades/µL) durante 2 h e termicamente inativado a 65 °C durante 20 min. O ADN digerido foi transfetado em 50 µL de células DH10B eletrocompetentes através de eletroporação. O fago resultante foi titulado por crescimento em hospedeiro bacteriano XL-1 Blue a 37 °C de um dia para o outro. Os clones foram sequenciados para confirmar a composição.

Exemplo 3 Cultura em Poços Profundos para Triagem da Biblioteca

A. Biblioteca de Fagos em Placas

A biblioteca de fagos foi diluída em meio LB para conseguir o número de placas desejado por placa. Os fagos de título elevado foram misturados com 200 µL de cultura de células XL-1B. Foram misturado 3 mL de ágar de cobertura LB, vertidos sobre uma placa LB e deixados agitar à temperatura ambiente durante 10 minutos. A placa foi incubada de um dia para o outro a 37 °C.

B. Eluição dos Fagos

Foram adicionados 100 µL de tampão de eluição de fagos (Tris-Cl 10 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM) a cada poço de uma placa de 96 poços de fundo em U estéril. Uma única placa de fagos da placa da biblioteca de um dia para o outro foi transferida através de uma ponta de pipeta com filtro para um poço. A placa de eluição de fagos foi incubada a 37 °C durante 1 hora. A placa pode ser armazenada a 4 °C após incubação.

C. Cultura para Placas de Poços Profundos

As células B XL1 de uma cultura de 50 mL foram adicionadas a meio 2xYT a uma diluição de 1:100. As células

foram cultivadas a 37 °C num agitador até que a A_{600} estivesse entre 0,9 a 1,2.

D. Infecção com o Fago em Placas de Poços Profundos

Quando as células atingiram a OD apropriada, foi adicionada IPTG 1 M (1:2000) à cultura de XL1B. A concentração final de IPTG foi de 0,5 mM. Foram transferidos 750 µL de cultura de células para cada poço de uma placa de 96 poços profundos (Fisher Scientific). Cada poço foi inoculado com 25 µL de fago eluído. A placa de poços profundos foi colocada no agitador (250rpm) e incubada de um dia para o outro a 37 °C.

E. Preparação do Sobrenadante para a Triagem ELISA

Após incubação, as placas de poços profundos foram centrifugadas a 3 250 rpm durante 20 minutos utilizando o rotor de placas Beckman JA-5.3. Foram retirados 50 µL de sobrenadante de cada poço para ELISA.

F. Inoculação de Culturas Líquidas de 15 mL de Células XL-1

As XL-1s foram cultivadas a 37 °C no agitador (250 rpm) em 2xYT contendo 10 µg/mL de tetraciclina até uma $A_{600} = 0,9$ a 1,2. Foi adicionada IPTG a uma concentração

final de 0,5 mM e foram transferidos 15 mL da cultura para um tubo cônico de 50 mL para cada clone a ser caracterizado. As células foram inoculadas com 10 µL de fago a partir da cultura-mãe de alto título (título = $\sim 10^{11}$ pfu/mL) e incubadas durante 1 hora a 37 °C. As células foram cultivadas de um dia para o outro à temperatura ambiente com agitação.

G. Isolamento de Fab Solúvel a partir do Periplasma

As células foram sedimentadas numa centrífugadora IEC a 4 500 rpm durante 20 minutos. O meio de cultura foi retirado, o sedimento foi ressuspensão em 650 µL de tampão de ressuspensão (Tris 50 mM, pH 8,0 contendo EDTA 1 mM e sacarose 500 mM), agitado em vórtice e colocado sobre gelo durante 1 hora com agitação suave. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 9 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante contendo os Fabs solúveis foi recolhido e armazenado a 4 °C.

Exemplo 4 Modificação da Região Estrutural

Havia doze resíduos oscilantes murídeos/humanos dentro da região estrutural nas posições chave potenciais descritas acima. A posição 73 na V_H foi mantida como treonina residual murídea na biblioteca de humanização porque se determinou que esta posição afetava a ligação. No entanto, observou-se que a treonina na V_H 73 é um resíduo

humano comum no subgrupo 1 e 2 da V_H da linha germinal humana.

Os resíduos estruturais que diferem entre a sequência TES-C21 e a cadeia molde humana foram aleatoriamente substituídos como se descreve acima e em seguida avaliados quanto ao seu efeito potencial na ligação ao alvo, e dobragem do anticorpo. Foram identificados os resíduos estruturais potenciais que podem ter afetado a ligação. Neste caso, foram os resíduos 12, 27, 43, 48, 67, 69 na V_H , e 1, 3, 4, 49, 60, 85 na V_L (sistema de numeração de Kabat) (ver Figura 4). Foi demonstrado mais tarde que apenas as posições 27 e 69 afetavam significativamente a ligação na região V_H (número de clone 1136-2C).

A triagem primária utilizada foi um ELISA de ponto único (SPE) utilizando meios de cultura (ver descrição abaixo). A triagem primária selecionou clones que se ligavam à molécula alvo do anticorpo. Os clones que originaram um sinal igual ou melhor do que a molécula parental foram selecionados para a ronda de triagem seguinte.

Na segunda ronda de triagem, os fagos individuais foram cultivados numa cultura bacteriana de 15 mL e as preparações periplasmáticas foram utilizadas para ensaios de titulação SPE e ELISA. Os clones que retiveram maior ligação neste ensaio foram adicionalmente caracterizados. Uma vez processados todos os clones primários selecionados,

10-15% dos melhores clones foram sequenciados e os clones organizados de acordo com a sequência. Os representantes de cada grupo de sequências foram comparados uns contra os outros e os melhores clones selecionados. As sequências destes clones escolhidos foram combinadas e foram avaliados os efeitos das várias combinações.

A biblioteca construída foi submetida a uma triagem por ELISA para pesquisa de ligação melhorada à IgE humana recombinante, SE44. Os clones com afinidade de ligação superior ao Fab de TES-C21 murídeo foram isolados e sequenciados. Os clones com ID #4, 49, 72, 76 e 136 foram adicionalmente caracterizados. As curvas de titulação ELISA para os clones 4, 49, 72, 78 e 136 são mostradas na Figura 5A e 5B, que indicam que a sua afinidade é semelhante à do parental, TES-C21. Estes clones competem com o TES-C21 murídeo para ligação à IgE humana, o que indica que o epítipo de ligação não foi alterado durante o processo de humanização. Os Fabs humanizados não se ligaram à IgE ligada ao FcεRI, o que sugere que é menos provável que os anticorpos humanizados reajam de forma cruzada com o recetor para originar a libertação de histamina quando sejam construídos em IgG bivalente.

O clone 136 humanizado conserva 5 resíduos estruturais da cadeia pesada murídea (= 94,3 % homologia com a região estrutural V_H humana), com uma região estrutural da cadeia leve 100% humana selecionada por

maturação da afinidade. Foi demonstrado que o Fab humanizado inibia a ligação da IgE ao FcεRI (Figura 6).

Exemplo 5 Protocolo de ELISA de Ponto Único para Triagem de anti-IgE

As placas foram revestidas com anti-Fd humano de ovelha a 2 ug/mL em tampão de revestimento de carbonato de um dia para o outro a 4 °C. A solução de revestimento foi retirada e as placas foram bloqueadas com 200 uL/poço de BSA a 3%/PBS durante 1 hora a 37 °C. Depois de lavar as placas 4x com PBS/0,1% de TWEEN® (PBST), foram adicionados 50 uL/poço de amostra de Fab (*i.e.*, sobrenadante que contém fago de alto título e Fab segregado ou a preparação periplasmática do bloqueio de DMB, ou a preparação de 15 mL). As placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente, seguida de lavagem 4x com PBST. Foram em seguida adicionados 50 uL/poço de SE44 biotinilado a 0,015 ug/mL diluído em BSA a 0,5%/PBS e 0,05% de TWEEN®. As placas foram em seguida incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente e lavadas 4X com PBST. Foram adicionados 50 uL/poço de Estreptavidina-HRP, diluição a 1:2000 em BSA a 0,5%/PBS e 0,05% de TWEEN® e as placas incubadas 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 6x com PBST. Foram adicionados 50 uL/poço de substrato de TMB (sigma) para revelação e parou-se, em seguida, adicionando 50 uL/poço de H₂SO₄ 0,2M.

Exemplo 6 Titulação por ELISA: anti-IgE

As placas foram revestidas com 0,25 ug/mL de SE44 (para Fab purificado a 0,1 ug/mL) em tampão de revestimento de carbonato de um dia para o outro a 4 °C. A solução de revestimento foi retirada e as placas foram bloqueadas com 200 uL/poço de BSA a 3 %/PBS durante 1 hora a 37 °C.

As placas foram lavadas 4x com PBS/0,1 % de TWEEN® (PBST). Foram adicionados 50 uL/poço de Fab (a partir da preparação periplasmática de 15 mL) começando com uma diluição de 1:2 e diluindo 3 vezes sucessivamente em BSA a 0,5%/PBS e 0,05% de TWEEN®20. As placas foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente.

As placas foram lavadas 4x com PBST e foram adicionados 50 uL/poço de uma diluição a 1:1000 (0,8 ug/mL) de biotina-anti-Fd humano de ovelha em BSA a 0,5%/PBS e 0,05% de TWEEN® 20. As placas foram novamente incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente.

Após 4 lavagens com PBST, foram adicionados 50 uL/poço de Neutra-avidina-AP 1:2000(0,9 ug/mL) em BSA a 0,5%/PBS e 0,05% de TWEEN® 20 e as placas foram incubadas 1 hora à temperatura ambiente.

As placas foram lavadas 4x com PBST. E reveladas adicionando 50 uL/poço de substrato pNPP. A revelação foi

parada adicionando 50 uL/poço de NaOH 3M. A absorvância de cada poço foi lida a 405 nm ou 410 nm.

Exemplo 7 Protocolo para Purificação por Afinidade de Fab Solúvel Expresso em fago M13

DIA 1

Duas culturas de 500 mL (2xYT) que contêm tetraciclina a 10 mg/mL foram inoculadas com 5 mL de uma cultura-mãe de XL1B de um dia para o outro e cultivadas a 37 °C até A600 = 0,9 a 1,2. Foi adicionada IPTG a uma concentração de 0,5 mM. A cultura de células foi em seguida infectada com 200 µL de fago por cultura e incubada durante 1 hora a 37° C com agitação. Após infecção, as células foram cultivadas a 25 °C de um dia para o outro com agitação.

DIA 2

As células foram sedimentadas a 3500 x g durante 30 minutos a 4 °C em tubos de centrífuga de 250 mL. O meio de cultura foi aspirado e os sedimentos foram ressuspensos num total de 12-15 mL de tampão de lise (Tampão A + cocktail de inibidores de proteases).

Tampão A: (1 litro)

NaH ₂ PO ₄ 50 mM	6,9 g de NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (ou 6 g de NaH ₂ PO ₄)
NaCl 300 mM	17,54 g de NaCl
imidazole 10 mM	0,68 g de imidazole (MM 68,08)
Ajustar o pH a 8,0 utilizando NaOH	

Tampão de lise:

Misturar 25 mL de Tampão A com um comprimido de Cocktail de Inibidores de Proteases Completo (Roche, Basel, Suíça).

As células ressuspensas foram transferidas para um tubo cônico de 50 mL e sujeitas a lise com 100 µL de lisozima a 100 mg/mL, invertendo o tubo várias vezes até a que mistura se mova em uníssono como uma massa (devido à lise). As células foram submetidas a ultrassons sobre gelo seguida da adição de 10 µL de DNase I (cerca de 1000 unidades) e balançada suavemente a 4 °C durante 30 minutos. Os detritos foram sedimentados por centrifugação a 12000 x g durante 30 minutos a 4 °C, utilizando tubos de centrifugadora de 50 mL. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo cônico e armazenados a 4 °C.

Foi utilizada agarose Ni-NT (Qiagen, Valencis, CA) para purificar os Fabs solúveis de acordo com o protocolo do fabricante. O lisado foi misturado com Ni-NTA e carregado numa coluna. O caudal de escoamento foi recolhido para análise por SDS-PAGE. A coluna foi lavada com 20 mL de tampão (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 15 mM, ajustando o pH a 8,0 com NaOH), seguido de uma lavagem de 20 mL com NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 20 mM. Os Fabs foram eluídos com 6 x 500 µL de tampão de eluição (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 450 mM, ajustando o pH a 8,0 com NaOH) e analisados por SDS-PAGE.

As frações da coluna foram armazenadas a 4 °C. As frações da coluna foram analisadas por SDS-PAGE e a fração com a maior quantidade de Fab foi selecionada e submetida a diálise em PBS a 4 °C.

Exemplo 8 Ensaio do Recetor Solúvel

Uma placa de ensaio de 96 poços adequada para ELISA foi revestida com 0,05 mL de tampão de revestimento com a cadeia alfa do recetor FcεRI a 0,5 µg/mL (carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6) durante 12 horas a 4-8 °C. Os poços foram aspirados e foram adicionados 250 µL de tampão de bloqueio (PBS, BSA a 1%, pH 7,2) e incubados durante 1 hora a 37 °C. Numa placa de ensaio separada, as amostras e os MAbS TES-C21 de referência foram titulados desde 200 a 0,001 µg/mL por diluições a 1:4 com tampão de ensaio (BSA a 0,5% e 0,05% de Tween 20, PBS, pH 7,2) e foi adicionado um volume igual de IgE biotinilada a 100 ng/mL e a placa incubada durante 2-3 horas a 25 °C. Os poços revestidos com FcεRI foram lavados três vezes com PBS e 0,05% de TWEEN 20 e foram transferidos 50 µL dos poços da amostra e incubados com agitação durante 30 minutos a 25 °C.

Foram incubados cinquenta µL/poço de Estreptavidina-HRP a 1 mg/mL, diluída a 1:2000 em tampão de ensaio, durante 30 minutos com agitação e, em seguida, a placa foi lavada como antes. Foram adicionados cinquenta

μL /poço de substrato TMB e a cor foi revelada. A reação foi parada adicionando um volume igual de H_2SO_4 0,2 M e a absorvância medida a 450nm.

Exemplo 9 Ligação dos Anticorpos aos Fc ϵ RI carregados com IgE

A ligação do anticorpo à IgE humana associada à subunidade alfa do Fc ϵ RI foi determinada pré-incubando com IgE humana a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 30 min a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes, seguida de uma incubação de uma hora com diferentes concentrações de mAbs murídeos anti-IgE humana E-10-10 ou a variante de Fab humanizada. A ligação de Fabs foi detetada com um anticorpo anti-Fd humano marcado biotina, seguido de SA-HRP. O ab E10-10 murídeo foi detetado por Ab de cabra anti-Fc de Ig murídea conjugado com HRP .

Exemplo 10 Caracterização de Clones

Cada candidato foi analisado quanto à afinidade de ligação e os clones positivos foram sequenciados. As variantes de anticorpo que têm mutações benéficas nas regiões CDR que aumentam a afinidade de ligação foram adicionalmente caracterizadas. Os ensaios incluíram a análise por Biacore; a inibição da ligação da IgE ao seu recetor e a ligação cruzada da IgE ligada ao recetor.

Foi gerada uma biblioteca de variantes. As

sequências de aminoácidos para as várias CDRs que demonstraram afinidade melhorada são representadas na Tabela 1. A Figura 7 apresenta candidatos de alta afinidade que têm combinações de substituições.

TABELA 1.

CDRL1:		CDRH1:	
P RASQSIGTNIH	SEQ ID NO 5	P MYWLE	SEQ ID NO 15
#1 RASRSIGTNIH	SEQ ID NO 6	#1 WYWLE	SEQ ID NO 16
#2 RASQRIGTNIH	SEQ ID NO 7	#2 YYWLE	SEQ ID NO 17
CDRL2:		CDRH2:	
P YASESIS	SEQ ID NO 8	P EISPGTFTTNYNEKFKA	SEQ ID NO 18
#1 YAYESIS	SEQ ID NO 9	#1 EIEPGTFTTNYNEKFKA	SEQ ID NO 19
#2 YASESIY	SEQ ID NO 10	#2 EIDPGTFTTNYNEKFKA	SEQ ID NO 20
#3 YASESDS	SEQ ID NO 11	#3 BSPDTFTTNYNEKFKA	SEQ ID NO 21
#4 YASESES	SEQ ID NO 12	#4 EISPETFTTNYNEKFKA	SEQ ID NO 22
CDRL3:		#5 EISPGTFETNYNEKFKA	SEQ ID NO 23
P QQSDSWPTT	SEQ ID NO 13	#6 EIEPGTFETNYNEKFKA	SEQ ID NO 24
#1 QQASWSWPTT	SEQ ID NO 14	#7 EIDPGTFETNYNEKFKA	SEQ ID NO 25
		CDRH3:	
		P FSHFSGSNYDYFDY	SEQ ID NO 26
		#1 FSHFSGMNYDYFDY	SEQ ID NO 27
		#2 FSHFSGQNYDYFDY	SEQ ID NO 28
		#3 FSHFTGSNYDYFDY	SEQ ID NO 29
P = Parental			

Na Figura 9 são apresentadas dezanove variantes da cadeia pesada e na Figura 8 são apresentadas 35 variantes da cadeia leve. Três candidatos foram adicionalmente caracterizados quanto à afinidade de ligação e estes são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 Afinidade de ligação

MAD	Kd	Aumento em Vezes da Afinidade de Ligação
TES-C21	614 ± 200 pM	
MAb 1 (CL-5A)	0,18 pM	3886
MAb 2 (CL-2C)	1,47 ± 0,5 pM	417
MAb 3 (CL-5I)	3,2 ± 2,2 pM	191

Exemplo 11 Expressão e purificação dos anticorpos anti-IgE e conjugação com HRP

Foram gerados MAb's candidatos de alta afinidade. Para a geração de MAb's anti-IgE intactos, as regiões variáveis das cadeias pesada e leve foram amplificadas por PCR a partir das cadeias molde dos vetores fágicos e subclonadas separadamente nos vetores de expressão das cadeias H e L, sob a expressão de um promotor de CMV. Foram construídos seis clones de anticorpo completos e são representados na Figura 10 A-F. Os plasmídeos apropriados das cadeias pesada e leve foram cotransfetados na linha de células de mieloma de murganho NS0 utilizando eletroporação por técnicas bem conhecidas na matéria. Ver, e.g., Liou et al. J Immunol. 143(12):3967-75 (1989). Os anticorpos foram purificados a partir dos sobrenadantes da linha de células estáveis únicas utilizando sepharose-proteína A (Pharmacia). A concentração do anticorpo foi determinada utilizando espectrofotometria a 280nm e ensaio FCA (IDEXX).

Os anticorpos purificados foram conjugados com

peroxidase de rábano-silvestre (HRP) utilizando o kit de conjugação de peroxidase (Zymed Labs, San Francisco, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. O título de cada MAb anti-IgE conjugado foi determinado utilizando ELISA com placas revestidas com uma IgE humana monoclonal (SE44).

As seguintes culturas foram depositadas junto da American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas Va. 20110-2209 EUA (ATCC):

Hibridoma	NO.ATCC	Data do Depósito
Anti-IgE CL-2C	PTA-5678	3 de dezembro de 2003
Anti-IgE CL-5A	PTA-5679	3 de dezembro de 2003
Anti-IgE CL-5I	PTA-5680	3 de dezembro de 2003

Este depósito foi feito sob as disposições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microrganismos para o Propósito de Procedimento de Patente e Seus Regulamentos (Tratado de Budapeste). Isto assegura a manutenção de uma cultura viável durante 30 anos a partir da data do depósito. O organismo será disponibilizado pelo ATCC nos termos do Tratado de Budapeste, que assegura a disponibilidade permanente e sem restrições da descendência da cultura ao público após emissão da patente pertinente.

O titular do presente pedido concordou que se a cultura em depósito morresse ou fosse perdida ou destruída quando cultivada sob condições adequadas, seria prontamente

substituída após notificação por um espécime viável da mesma cultura. A disponibilidade da estirpe depositada não deve ser interpretada como uma licença para pôr em prática a invenção infringindo os direitos concedidos pela autoridade de qualquer governo de acordo com as suas leis sobre patentes.

Os itens preferidos aqui divulgados são descritos abaixo e são referidos como E1 a E55.

E1. Uma região variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que tem a fórmula: FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4, em que FRL1 consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs: 30-37; CDRL1 consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5-7; FRL2 consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs: 38-39; CDRL2 consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs: 8-12; FRL3 consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs: 40-43; CDRL3 consiste em qualquer de SEQ ID NOs: 13-14; e FRL4 consiste na SEQ ID NO: 44.

E2. A região variável da cadeia leve de E1, que compreende qualquer uma das SEQ ID NOs: 57, 61, 63, 65, 67 e 69.

E3. A região variável da cadeia leve de E1, que compreende ainda uma região constante.

E4. A região variável da cadeia leve de E3, em que o domínio constante tem a SEQ ID NO: 58.

E5. A região variável da cadeia leve de E2, que compreende ainda uma região constante.

E6. A região variável da cadeia leve de E5, em que a região constante tem a SEQ ID NO: 58.

E7. A região variável da cadeia leve de E1, que compreende ainda um péptido sinal.

E8. A região variável da cadeia leve de E7, em que o péptido sinal tem a SEQ ID NO: 56.

E9. Uma região variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que tem a fórmula: FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4, em que FRH1 consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs: 45-46; CDRH1 consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs: 15-17; FRH2 consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs: 47-50; CDRH2 consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs: 18-25; FRH3 consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs: 51-54; CDRH3 consiste em qualquer de SEQ ID NOs: 26-29; e FRH4 consiste na SEQ ID NO: 55.

E10. A região variável da cadeia pesada de E9, que compreende qualquer uma das SEQ ID NOs: 59, 62, 64, 66, 68 e 70.

E11. A região variável da cadeia pesada de E7,

que compreende ainda pelo menos o domínio CH1 de uma região constante.

E12. A região variável da cadeia pesada de E11, que compreende os domínios CH1, CH2 e CH3 de uma região constante.

E13. A região variável da cadeia pesada de E11, em que a região constante é de um anticorpo de IgG.

E14. A região variável da cadeia pesada de E13, em que o anticorpo de IgG é um anticorpo de IgG1, um anticorpo de IgG2, um anticorpo de IgG3 ou um anticorpo de IgG4.

E15. A região variável da cadeia pesada de E13, em que o domínio constante tem a SEQ ID NO: 60.

E16. A região variável da cadeia pesada de E10, que compreende ainda uma região constante.

E17. A região variável da cadeia pesada de E16, em que o domínio constante tem a SEQ ID NO: 60.

E18. A região variável da cadeia pesada de E9, que compreende ainda um péptido sinal.

E19. A região variável da cadeia pesada de E19, em que o péptido sinal tem a SEQ ID NO: 56.

E20. Um anticorpo ou fragmento de anticorpo, que compreende a região variável da cadeia leve de E1, em que o anticorpo liga-se especificamente a IgE.

E21. Um anticorpo ou fragmento de anticorpo, que compreende a região variável da cadeia pesada de E9, em que o anticorpo liga-se especificamente a IgE.

E22. O anticorpo de E20, que compreende uma região da cadeia pesada de E9.

E23. O anticorpo de E22, que compreende uma região variável da cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 57 e uma região variável da cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 59.

E24. O anticorpo de E23, que compreende ainda uma região constante da cadeia leve e uma região constante da cadeia pesada.

E25. O anticorpo de E24, em que a região constante da cadeia leve tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 58 e a região constante da cadeia pesada tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 60.

E26. O anticorpo de E22, que compreende uma

região variável da cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 61 e uma região variável da cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 62.

E 27. O anticorpo de E26, que compreende ainda uma região constante da cadeia leve e uma região constante da cadeia pesada.

E28. O anticorpo de E27, em que a região constante da cadeia leve tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 58 e a região constante da cadeia pesada tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 60.

E29. O anticorpo de E26, o qual é produzido por uma célula possuindo o número de Depósito ATCC PTA-5678.

E30. O anticorpo de E22, que compreende uma região variável da cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 63 e uma região variável da cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 64.

E31. O anticorpo de E30, que compreende ainda uma região constante da cadeia leve e uma região constante da cadeia pesada.

E32. O anticorpo de E31, em que a região

constante da cadeia leve tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 58 e a região constante da cadeia pesada tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 60.

E33. O anticorpo de E30, o qual é produzido por uma célula possuindo o número de Depósito ATCC PTA-5680.

E34. O anticorpo de E22, que compreende uma região variável da cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 65 e uma região variável da cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 66.

E35. O anticorpo de E34, que compreende ainda uma região constante da cadeia leve e uma região constante da cadeia pesada.

E36. O anticorpo de E35, em que a região constante da cadeia leve tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 58 e a região constante da cadeia pesada tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 60.

E37. O anticorpo de E34, o qual é produzido por uma célula possuindo o número de Depósito ATCC PTA-5679.

E38. O anticorpo de E22, que compreende uma região variável da cadeia leve possuindo a sequência de

aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 67 e uma região variável da cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 68.

E39. O anticorpo de E38, que compreende ainda uma região constante da cadeia leve e uma região constante da cadeia pesada.

E40. O anticorpo de E39, em que a região constante da cadeia leve tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 58 e a região constante da cadeia pesada tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 60.

E41. O anticorpo de E22, que compreende uma região variável da cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 69 e uma região variável da cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 70.

E42. O anticorpo de E41, que compreende ainda uma região constante da cadeia leve e uma região constante da cadeia pesada.

E43. O anticorpo de E42, em que a região constante da cadeia leve tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 58 e a região constante da cadeia pesada tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 60.

E44. Uma composição que compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo de E20 ou 21 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

E45. O anticorpo de E20 ou 21 adicionalmente ligado a um marcador.

E46. Um kit de diagnóstico que compreende um anticorpo de E20 ou 21.

E47. Um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica o anticorpo de E22.

E48. Uma célula, que compreende o vetor de E47.

E49. A célula de E48, em que a célula é o número de Depósito ATCC PTA-5678, PTA-5679 ou PTA-5680.

E50. Um método de produção de um anticorpo, que compreende cultivar a célula de E48 sob condições apropriadas para a produção de um anticorpo e isolar o anticorpo produzido.

E51. Um método para medir o nível de IgE num indivíduo, que compreende pôr em contacto uma amostra do indivíduo, amostra essa que compreende moléculas de IgE, com um anticorpo de E22; e determinar o nível de retenção do anticorpo pela amostra relativamente a uma amostra de controlo de um indivíduo de controlo, em que um nível mais alto ou mais baixo de retenção do anticorpo pela amostra do

indivíduo relativamente à amostra de controlo indica que o indivíduo tem um nível mais alto ou mais baixo de moléculas de IgE relativamente àquele no indivíduo de controlo.

E52. Um método para diagnosticar um distúrbio associado a um nível anormal de IgE num indivíduo, que compreende pôr em contacto uma amostra do indivíduo, amostra essa que compreende moléculas de IgE, com um anticorpo de E22; e determinar o nível de retenção do anticorpo pela amostra relativamente a uma amostra de controlo de um indivíduo de controlo, em que um nível mais alto ou mais baixo de retenção do anticorpo pela amostra do indivíduo relativamente à amostra de controlo indica que o indivíduo tem um distúrbio associado a um nível anormal de IgE.

E53. O método de E52, em que o distúrbio associado a um nível anormal de IgE é asma, rinite alérgica, eczema, urticária ou dermatite atópica.

E54. Um método de tratamento de um distúrbio associado a um nível anormalmente alto de IgE num indivíduo, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo de E22, de tal forma que o distúrbio é tratado no indivíduo.

E55. O método de E54, em que o distúrbio é asma, rinite alérgica, eczema, urticária, dermatite atópica ou uma alergia alimentar.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> TANOX, INC.
SINGH, Sanjaya
FOSTER, Catherine
WU, Herren

<120> ANTICORPOS ANTI-IgE HUMANA DE ALTA AFINIDADE

<130> TNX-1010 (2) PCT

<140> PCT/US2004/002894

<141> 2004-02-02

<150> 60/444,229

<151> 2003-02-01

<160> 70

<170> PatentIn versão 3.4

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica_mista

<223> CADEIA LEVE DE TES-C21

<400> 1

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asp Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_mista

<223> cadeia molde da sequência consenso da cadeia leve humana L16/-JK4

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica_mista

<223> Cadeia Pesada de TES-C21

<400> 3

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

```

65              70              75              80

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

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
      100             105             110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
      115              120

```

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_mista

<223> DP88/JH4b cadeia molde da sequência consenso da cadeia pesada humana

<400> 4

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
      20      25      30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50      55      60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80

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

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

```

Ser

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> SEQUÊNCIA DE CDRL1 DE TES-C21 (TABELA 1)

<400> 5

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> SEQUÊNCIA #1 DA VARIANTE DE CDRL1 (TABELA 1)

<400> 6

Arg Ala Ser Arg Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> SEQUÊNCIA #2 DA VARIANTE DE CDRL1 (TABELA 1)

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> SEQUÊNCIA DE CDRL2 DE TES-C21 (TABELA 1)

<400> 8

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE #1 DA CDRL2 (TABELA 1)

<400> 9

Tyr Ala Tyr Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE #2 DA CDRL2 (TABELA 1)

<400> 10

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Tyr
1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE #3 DA CDRL2 (TABELA 1)

<400> 11

Tyr Ala Ser Glu Ser Asp Ser
1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE #4 DA CDRL2 (TABELA 1)

<400> 12

Tyr Ala Ser Glu Ser Glu Ser
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDRL3 DE TES-C21 (TABELA 1)

<400> 13

Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE DE CDRL3 (TABELA)

<400> 14

Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDRH1 DE TES-C21

<400> 15

Met Tyr Trp Leu Glu
1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE #1 DA CDRH1 (TABELA 1)

<400> 16

Trp Tyr Trp Leu Glu
1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDRH1 #2 (TABELA 1)

<400> 17

Tyr Tyr Trp Leu Glu
1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> CDRH2 DE TES-C21 (TABELA 1)

<400> 18

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

Ala

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE #1 DA CDRH2 (TABELA 1)

<400> 19

Glu Ile Glu Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 20

<211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE #2 DA CDRH2 (TABELA 1)

<400> 20
Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE #3 DA CDRH2 (TABELA 1)

<400> 21
Glu Ile Ser Pro Asp Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE #4 DA CDRH2 (TABELA 1)

<400> 22
Glu Ile Ser Pro Glu Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE #5 DA CDRH2 (TABELA 1)

<400> 23
Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Glu Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE #6 DA CDRH2 (TABELA 1)

<400> 24
Glu Ile Glu Pro Gly Thr Phe Glu Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE #7 DA CDRH2 (TABELA 1)

<400> 25
Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Glu Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CDRH3 DE TES-C21 (TABELA 1)

<400> 26
Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE #1 DA CDRH3 (TABELA 1)

<400> 27
Phe Ser His Phe Ser Gly Met Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 28
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE #2 DA CDRH3 (TABELA 1)

<400> 28

Phe	Ser	His	Phe	Ser	Gly	Gln	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5						10			

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE #3 DA CDRH3 (TABELA 1)

<400> 29

Phe	Ser	His	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1					5					10			

<210> 30

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 136 DA FRL1

<400> 30

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
					20	

<210> 31

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 1 DA FRL1

<400> 31

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
					20	

<210> 32

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 2 DA FRL1

<400> 32

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 33

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 4 DA FRL1

<400> 33

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 34

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 13 DA FRL1

<400> 34

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 35

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 18 DA FRL1

<400> 35

Glu Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 36

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 25 DA FRL1

<400> 36

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 37

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 27 DA FRL1

<400> 37

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 136 DA FRL2

<400> 38

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 1 DA FRL2

<400> 39

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15

<210> 40

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 136 DA FRL3

<400> 40

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 41
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE 1 DA FRL3

<400> 41

Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 42
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE 13 DA FRL3

<400> 42

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 43
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE 18 DA FRL3

<400> 43

Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

PE2000481

- 112 -

<220>

<223> VARIANTE DA FRL4

<400> 44

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 45

<211> 30

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 136 DA FRH1

<400> 45

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 2 DA FRH1

<400> 46

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 136 DA FRH2

<400> 47

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 2 DA FRH2

<400> 48

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 8 DA FRH2

<400> 49

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 21 DA FRH2

<400> 50

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 136 DA FRH3

<400> 51

Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 1 DA FRH3

<400> 52

Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

PE2000481

- 114 -

<210> 53
<211> 32
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> VARIANTE 43 DA FRH3

<400> 53
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 54
<211> 32
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> VARIANTE 103 DA FRH3

<400> 54
Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> VARIANTE 136 DA FRH4

<400> 55
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 56
<211> 19
<212> PRT
<213> Bacteriófago M13mp18

<220>
<221> característica_mista
<223> sequência sinal do Gene III

<400> 56
Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser

PE2000481

- 115 -

<210> 57
<211> 107
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE DO CLONE 136

<400> 57
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 58
<211> 106
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> REGIÃO CONSTANTE DA CADEIA LEVE DO CLONE 136

<400> 58
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 59
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA DO CLONE 136

<400> 59
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
 20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 60
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> REGIÃO CONSTANTE DA IgG1 HUMANA

<400> 60

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 61

<211> 107

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE DO CLONE CL-2C

<400> 61

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 62

<211> 123

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA DO CLONE CL-2C

<400> 62

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Trp Tyr
20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE DO CLONE CL-5I

<400> 63

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 64

<211> 123

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA DO CLONE CL-5I

<400> 64

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Glu Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

PE2000481

- 121 -

<210> 65
<211> 107
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE DO CLONE CL-5A

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 66
<211> 123
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA DO CLONE CL-5A

<400> 66

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Trp Tyr
20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Glu Ile Glu Pro Gly Thr Glu Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 67
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE DO CLONE CL-2B

<400> 67
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 68
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA DO CLONE CL-2B

<400> 68

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Tyr
20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69

<211> 107

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE DO CLONE CL-1136-2C

<400> 69

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 70

PE2000481

- 124 -

<211> 123

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA DO CLONE CL-1136-2C

<400> 70

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
20 25 30

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

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

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

Lisboa, 9 de junho de 2016

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo que compreende uma região variável da cadeia leve que compreende CDRL1, CDRL2 e CDRL3, e uma região variável da cadeia pesada que compreende CDRH1, CDRH2 e CDRH3, em que CDRL1 consiste na SEQ ID NO:5, CDRL2 consiste na SEQ ID NO:8, CDRL3 consiste na sequência de aminoácidos QQSWSWPTT, CDRH1 consiste na SEQ ID NO:16, CDRH2 consiste na SEQ ID NO:20 e CDRH3 consiste na SEQ ID NO:26, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo liga-se especificamente à IgE.

2. Anticorpo ou fragmento de ligação ao anti-génio do mesmo da reivindicação 1, que compreende uma região variável da cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:61 ou uma região variável da cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:62, em que o anticorpo liga-se especificamente à IgE.

3. Anticorpo ou fragmento de ligação ao anti-génio do mesmo da reivindicação 2, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreende uma região variável da cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:61 e uma região variável da cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:62.

4. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo da reivindicação 1, 2 ou 3, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreende ainda uma região constante da cadeia leve e uma região constante da cadeia pesada.

5. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo da reivindicação 4, em que a região constante da cadeia leve tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:58 e a região constante da cadeia pesada tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:60.

6. Composição que compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

7. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, adicionalmente ligado a um marcador.

8. Kit de diagnóstico que compreende o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 7.

9. Ácido nucleico que codifica o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

10. Vetor que compreende o ácido nucleico da reivindicação 9.

11. Célula hospedeira isolada que compreende o vetor da reivindicação 10.

12. Célula hospedeira isolada da reivindicação 11, em que a célula é o número de Depósito ATCC PTA-5678.

13. Método de produção de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, que compreende cultivar a célula da reivindicação 11 ou 12 sob condições apropriadas para a produção de um anticorpo, e isolar o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo produzido.

14. Método para medir o nível de IgE num indivíduo, que compreende pôr em contacto uma amostra do indivíduo, amostra essa que compreende moléculas de IgE, com o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 7, e determinar o nível de retenção do anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo pela amostra relativamente a uma amostra de controlo de um indivíduo de controlo, em que um nível mais alto ou mais baixo de retenção do anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo pela amostra do indivíduo relativamente à amostra de controlo indica que o indivíduo tem um nível mais alto ou mais baixo de

moléculas de IgE relativamente àquele no indivíduo de controlo.

15. Método para diagnosticar um distúrbio associado a um nível anormal de IgE num indivíduo, que compreende pôr em contacto uma amostra do indivíduo, amostra essa que compreende moléculas de IgE, com o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 7 e determinar o nível de retenção do anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo pela amostra relativamente a uma amostra de controlo de um indivíduo de controlo, em que um nível mais alto ou mais baixo de retenção do anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo pela amostra do indivíduo relativamente à amostra de controlo indica que o indivíduo tem um distúrbio associado a um nível anormal de IgE.

16. Método da reivindicação 15, em que o distúrbio associado a um nível anormal de IgE é asma, rinite alérgica, eczema, urticária ou dermatite atópica.

17. Utilização do anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 para o fabrico de um medicamento para tratar um distúrbio associado a um nível anormalmente alto de IgE num indivíduo.

18. Utilização da reivindicação 17, em que o

distúrbio é asma, rinite alérgica, eczema, urticária, dermatite atópica ou uma alergia alimentar.

19. Anticorpo ou fragmento de ligação ao anti-génio do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 para utilização num método de tratamento de um distúrbio associado a um nível anormalmente alto de IgE num indivíduo.

20. Anticorpo ou fragmento de ligação ao anti-génio do mesmo para utilização da reivindicação 19, em que o distúrbio é asma, rinite alérgica, eczema, urticária, dermatite atópica ou uma alergia alimentar.

Lisboa, 9 de junho de 2016

Figura 1 Vetor de Fago

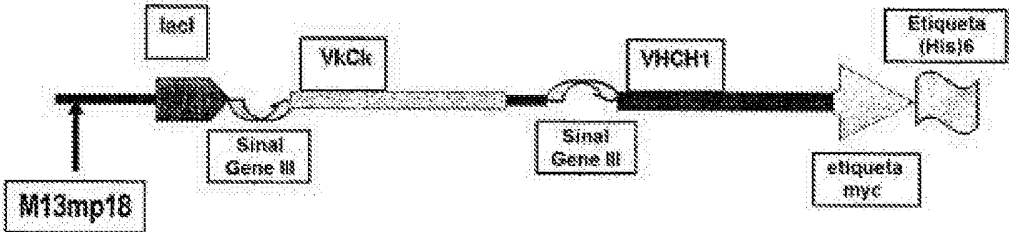


FIGURA 2

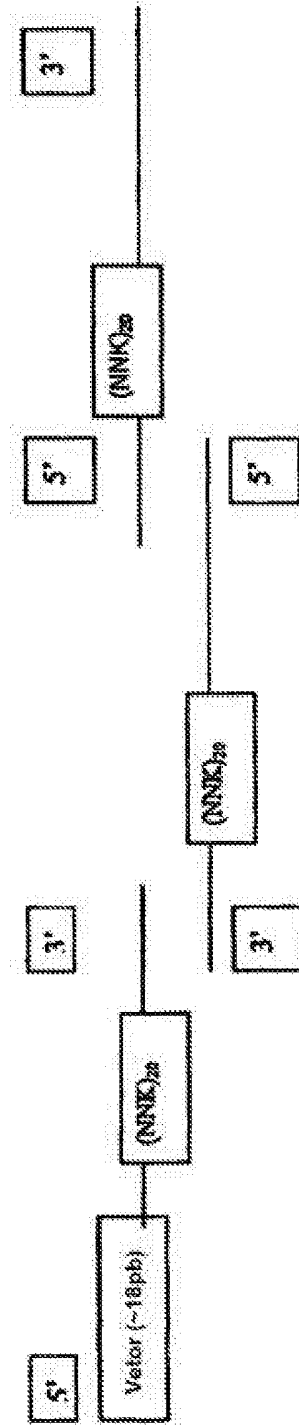


Figura 3 TES-C21 e Comparação de Cadeia Molde

A. Cadeia Leve (Vk) (Sublinhado: CDR de Kubat. Negrito/Itálico: CDR de Chobid) (CADEIA LEVE DE TES-C21 - SEQ ID NO1 L16JK4 - SEQ ID NO2)

TES-C21 Mb: D I L L T Q S P A I L I S V S P G E R V S F S C R A S Q S I G T N I H N Y Q Q
 L16 VK: W V M A T L R A S Q S V S S X L A

TES-C21: R T D G S P R L L I K Y A S E E S I S G I F S R P S G S G S G T E F T L N I M
 L16 VK: K P S Q A Y G A S T R A T A

TES-C21: S V E S E D I A D Y Y C Q Q S D S W P T T F G G Q T K L E I K
 L16 VK-JK4: L Q F V Q Q Y N N W F L T

B. Cadeia Pesada (Vn)
 CADEIA PESADA DE TES-C21 - SEQ ID NO3 DP88/JHb - SEQ ID NO4

TES-C21 Mb: Q V Q L Q Q S G A E L M K P G A S V K I S C K T T E Y F S M Y N L R W V
 DP88 VH: V V K S A S Q S Y A I S

TES-C21: K Q E P G H G L E W V G E I S P Q T F T T N Y N E K F K A K A T F T A D T
 DP88 VH: R A Q M G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V I

TES-C21: S S K T A Y L Q L S G L T S E D S A V Y F C A R F S H F S G S N Y D Y P D Y
 DP88 VH: T E M E S R T

TES-C21: W G Q G T S L T V S S
 DP88-JH4b: L V

Figura 4 Sequências Estruturais de Candidatos de Alta Afinidade*

Posições VK Murginho Humano	1	3	4	40	60	65	Posições VH Murginho Humano	12	27	43	49	67	68
1 (3D do clone)	D	L	M	K	S	V	M	Y	H	M	A	F	
2	D	L	L	K	S	V	K	Y	O	M	V	F	
4	D	L	L	Y	S	V	M	Y	O	M	V	F	
8	D	V	M	Y	S	V	M	Y	O	M	V	F	
13	D	V	L	K	A	D	K	Y	O	M	V	F	
15	D	V	L	Y	A	V	M	Y	O	M	V	F	
18	D	L	M	Y	A	V	M	Y	O	M	V	F	
19	D	L	L	K	A	D	M	Y	O	M	V	F	
21	D	V	L	Y	A	V	M	Y	H	M	V	F	
23	D	V	L	K	A	D	M	Y	O	M	V	F	
25	D	V	L	Y	A	V	M	Y	O	M	V	F	
27	D	V	M	Y	S	D	M	Y	O	M	V	F	
30	E	V	L	Y	A	D	K	Y	O	M	V	F	
31	E	V	L	Y	A	V	M	Y	H	M	V	F	
33	E	V	L	Y	S	V	K	Y	O	M	V	F	
35	E	V	M	Y	A	D	K	Y	H	M	V	F	
38	E	V	M	K	A	D	K	Y	O	M	V	F	
43	E	V	L	Y	S	V	M	Y	H	M	V	F	
44	E	V	L	Y	S	D	M	Y	H	M	V	F	
45	E	V	M	K	A	V	M	Y	O	M	V	F	
46	E	V	L	K	S	V	M	Y	H	M	V	F	
48	E	V	M	Y	A	D	M	Y	H	M	V	F	
49	E	V	M	Y	A	V	M	Y	H	M	V	F	
50	D	L	L	Y	A	D	M	Y	O	M	V	F	
52	D	L	L	Y	A	D	K	Y	O	M	V	F	
53	D	L	L	Y	S	V	M	Y	H	M	V	F	
56	D	V	M	Y	S	V	M	Y	H	M	V	F	
58	D	V	M	K	S	V	M	Y	H	M	V	F	
61	D	V	M	K	S	V	M	Y	H	M	V	F	
63	D	V	M	K	S	V	K	Y	O	M	V	F	
64	D	V	M	K	S	V	M	Y	O	M	V	F	
68	D	V	L	Y	S	D	M	Y	O	M	V	F	
70	D	V	L	Y	A	V	M	Y	O	M	V	F	
72	D	V	L	Y	A	V	K	Y	O	M	V	F	
75	D	V	L	K	S	V	K	Y	O	M	V	F	
78	D	V	M	Y	S	V	M	Y	O	M	V	F	
81	E	V	L	K	S	D	M	Y	O	M	V	F	
83	E	V	L	K	A	D	M	Y	O	M	V	F	
88	E	L	M	K	A	V	M	Y	O	M	V	F	
89	E	L	M	Y	A	V	M	Y	O	M	V	F	
90	D	V	M	Y	A	D	K	Y	H	M	V	F	
93	D	V	M	K	A	V	M	Y	H	M	V	F	
103	D	V	L	Y	A	V	M	Y	O	M	V	F	
109	D	L	L	K	S	V	M	Y	O	M	V	F	
114	D	L	L	Y	S	V	K	Y	O	M	V	F	
124	D	V	L	Y	S	V	K	Y	O	M	V	F	
126	D	V	M	Y	S	V	M	Y	O	M	V	F	
135	D	V	L	K	S	V	M	Y	O	M	V	F	
136	E	V	M	Y	S	V	M	Y	O	M	V	F	
152	E	V	L	Y	S	V	M	Y	H	M	V	F	
153	D	L	L	Y	S	V	K	Y	O	M	V	F	
157	D	L	M	Y	S	D	K	Y	O	M	V	F	
1136-2C	E	V	M	Y	S	D	K	Y	O	M	V	F	

*P=sequência parental; T=sequência de escolha modelo humano; aminoácidos listados a negrito são resíduos mudados.

Figura 5 CURVA DE TITULAÇÃO POR ELISA

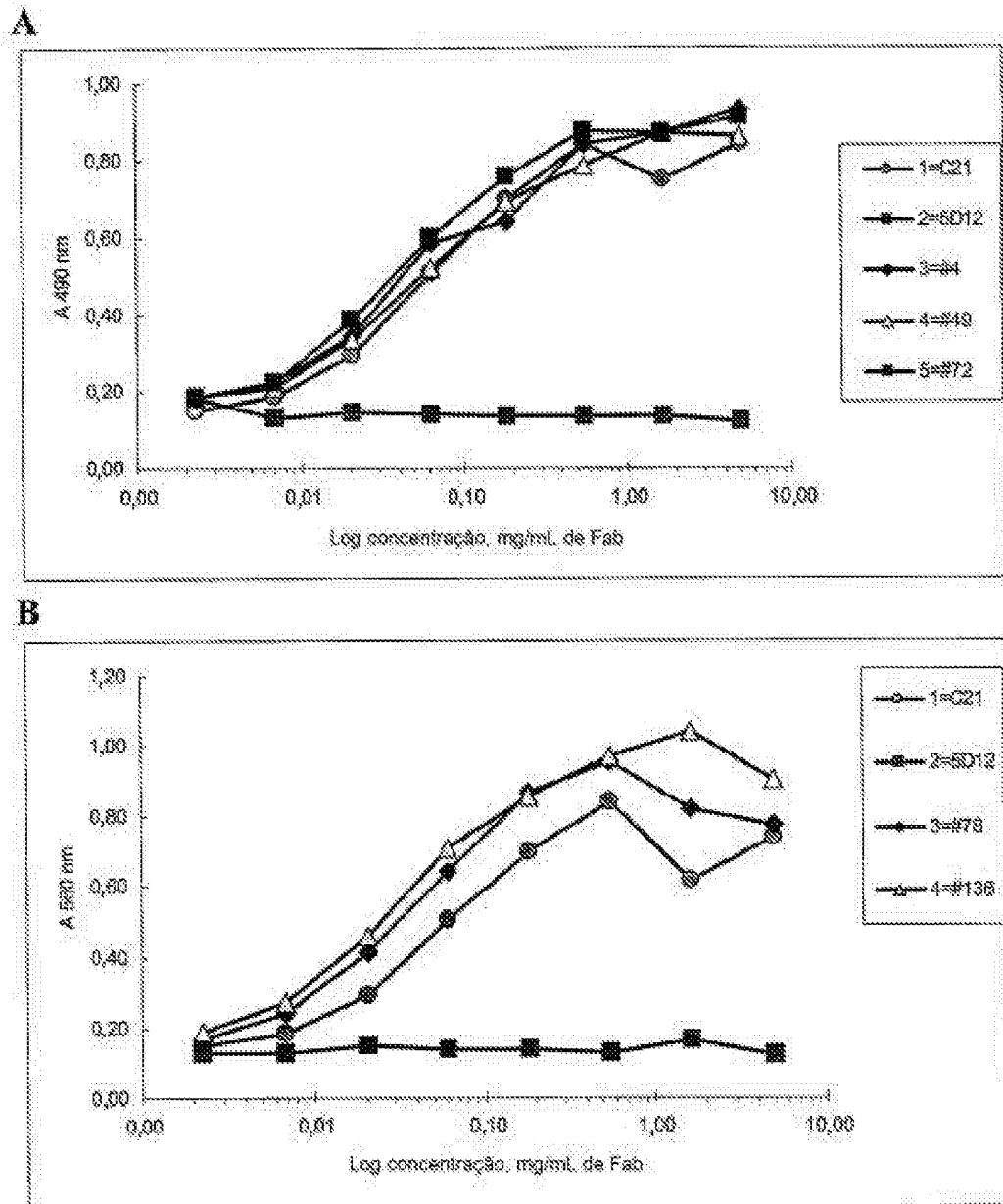


Figura 6 Ensaio de Inibição

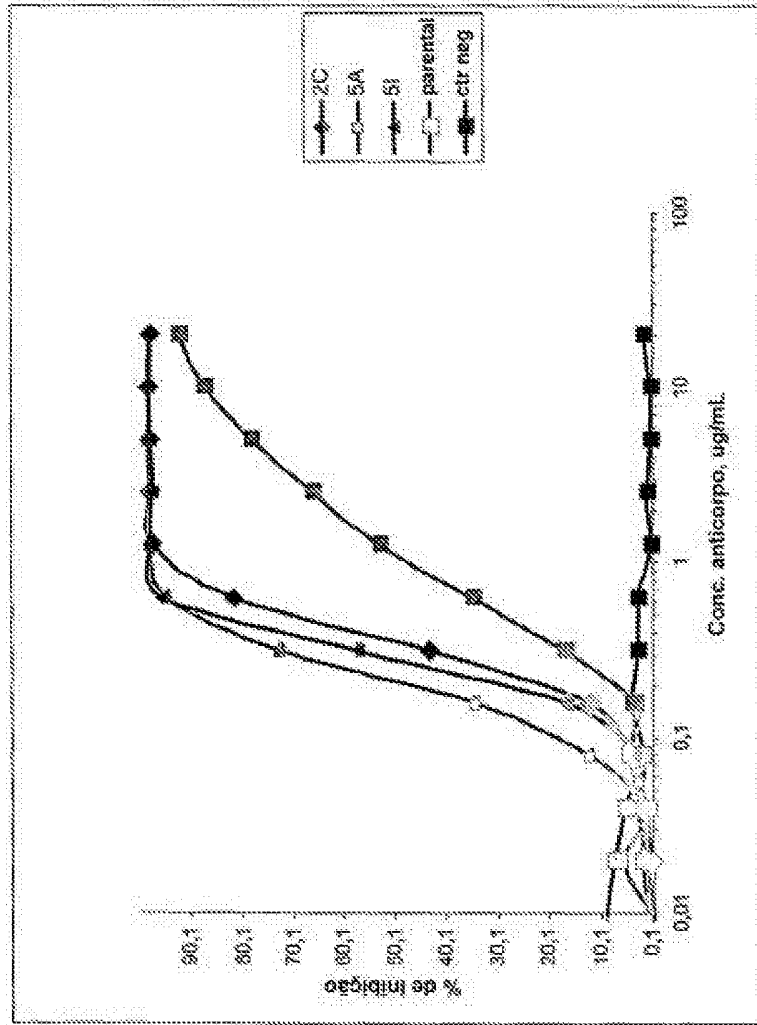


Figura 7: Lista de Candidatos de Alta Afinidade da Biblioteca

Clone	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
136	RASRSIGTNIH	YASESIS	QQSWSWPTI	MYWLE	EISPGIFTTNYNEKFKA	FSHSIGSNYDYFDY
L1-9	wt	wt	QQSWSWPTI	wt	wt	wt
CL-2G	wt	wt	QQSWSWPTI	WYWLE	wt	wt
R5-E	wt	wt	QQSWSWPTI	YYWLE	wt	wt
R87-E	wt	wt	QQSWSWPTI	wt	EIEPGIFTTNYNEKFKA	wt
CL-2I	wt	wt	QQSWSWPTI	wt	EIDFGIFTTNYNEKFKA	wt
R2-C	wt	wt	QQSWSWPTI	WYWLE	EIEPGIFTTNYNEKFKA	wt
CL-2C	wt	wt	QQSWSWPTI	WYWLE	EIDFGIFTTNYNEKFKA	wt
CL-2H	wt	wt	QQSWSWPTI	YYWLE	EIEPGIFTTNYNEKFKA	wt
CL-2B	wt	wt	QQSWSWPTI	YYWLE	EIDFGIFTTNYNEKFKA	wt
CL-3A	wt	wt	QQSWSWPTI	wt	EISPEIFTTNYNEKFKA	wt
R47-E	wt	wt	QQSWSWPTI	wt	EISPDIFTTNYNEKFKA	wt
CL-3G	wt	wt	QQSWSWPTI	YYWLE	EISPEIFTTNYNEKFKA	wt
R3-A	wt	wt	QQSWSWPTI	YYWLE	EISPDIFTTNYNEKFKA	wt
CL-3C	wt	wt	QQSWSWPTI	WYWLE	EISPEIFTTNYNEKFKA	wt
CL-3E	wt	wt	QQSWSWPTI	WYWLE	EISPDIFTTNYNEKFKA	wt
R5-K	wt	wt	QQSWSWPTI	wt	EISPGIFETNYNEKFKA	wt
CL-4B	wt	wt	QQSWSWPTI	WYWLE	EISPGIFETNYNEKFKA	wt
R5-D	wt	wt	QQSWSWPTI	YYWLE	EISPGIFETNYNEKFKA	wt
CL-5G	wt	wt	QQSWSWPTI	wt	EIEPGTFETNYNEKFKA	wt
CL-5I	wt	wt	QQSWSWPTI	wt	EIDPGTFETNYNEKFKA	wt
CL-5A	wt	wt	QQSWSWPTI	WYWLE	EIEPGTFETNYNEKFKA	wt
CL-5H	wt	wt	QQSWSWPTI	WYWLE	EIDPGTFETNYNEKFKA	wt
R5-H	wt	wt	QQSWSWPTI	YYWLE	EIEPGTFETNYNEKFKA	wt
R5-N	wt	wt	QQSWSWPTI	YYWLE	EIDPGTFETNYNEKFKA	wt

As alterações da sequência da aminoácidos parental estão listadas a NEGRITO.

Figura 10A Sequência polipeptídica de Mab 136**CADEIA LEVE****PÉPTIDO SINAL**

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL V_L

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIEHWYQQKP GQAPRLLIYY
 ARESISGIPA RPSGSGSGTE FTLTISLQSE EDFAVYYCQQ SDSWPTTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO 57)

REGIÃO CONSTANTE C_K

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TAVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSYISLST LTLKADYK EKVIACEVTH QGLSPVTKS
 FNEGEC (SEQ ID NO 58)

CADEIA PESADA (IgG1)**PÉPTIDO SINAL**

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL V_H

QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCTASGYTFS MYWLEWVRQA FGHGLEWMGE
 ISPGTFTYNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFSGSNYDYF DYWGQGTLVV VSS (SEQ ID NO 59)

REGIÃO CONSTANTE CHI-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP
 KSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQFENNYKTTTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 CQGNVPSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

Figura 10B Sequência Polipeptídica de MAb CL-2C**CADEIA LEVE****PÉPTIDO SINAL**

MENSQVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL VK

EIVMTQSPAT LSVSPGERAF LSCRASQSIG TNIHWYQOKP GQAPRLLIYY
 ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISLQSE EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO 61)

REGIÃO CONSTANTE CK

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TAVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC (SEQ ID NO 58)

CADEIA PESADA (IgG1)**PÉPTIDO SINAL**

MENSQVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL VH(C)

QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS WYWLEWVROA PGHGLEWMGE
 IDPGTFTTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY NELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFGSGNYDYF DYWGQGTLYT VSS (SEQ ID NO 62)

REGIÃO CONSTANTE CHI-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFF LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSQV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEEP
 KSCDKHTHTCP PCFAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLAQDNLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KARGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTFPV LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFECV MHEALHNHYT QKLSLSLSPGK

Figura 10C Sequência Polipeptídica de MAAb CL-51**CADEIA LEVE****PEPTIDO SINAL**

MEWVSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL VK

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNINHWYQOKP GQAPRLLIYY
 ASESISGIPA RFGSGSGSTE FTLTISSLQD EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO 63)

REGIÃO CONSTANTE CK (SEQ ID NO 58)

TVAADSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCILNN FYPRRAKVQW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLKADYK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC

CADEIA PESADA (IgG1)**PEPTIDO SINAL**

MEWVSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL VH (51)

QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS MYWLEWVRQA PCHGLEWMGE
 IDPGTFETNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY NELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFGSGNYDYF DYWGQGLVYF VSS (SEQ ID NO 64)

REGIÃO CONSTANTE CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVYT VPSSSLGTQT YICNVNKKPS NTKVDEKVEP
 KSCDKHTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
 HEDPEVRFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTLS KARGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
 LVRGFIYFSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDESDEFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFPSCSV MHEALHNHYT QKLSLSLSPGK

Figura 10D Sequência Polipeptídica de MAb CL-5A**CADEIA LEVE****PÉPTIDO SINAL**

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL V_k

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQOKP GOAPRLLIYY
 ASESISGIPA RPSGSGSGTE PTLTISSLQS EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO 65)

REGIÃO CONSTANTE C_k (SEQ ID NO 58)

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCILNN FYPREAKVQN KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC

CADEIA PESADA (IgG1)**PÉPTIDO SINAL**

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL V_H (5A)

QVDLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS WYWLEWVRQA FGHGLEWMGE
 IEPGTETITNY NEKPKARVTF TADTSTSTAY MELGSLRSED TAVYYCARFS
 HPSGGSNYDYF DYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO 66)

REGIÃO CONSTANTE CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSCV
 HTFPVAVLQSE GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEVEP
 KSCDKHTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNQK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYRMTTFPV LQSDGSEFFLY SKLTVDKSEW
 QCGNVFSCSV MHEALHNNYT QKSLSLSPGK

Figura 10E Sequência Polipeptídica de MAAb CL-2B**CADEIA LEVE****PÉPTIDO SINAL**

MHWGVMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL V_k

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKP GOAPRLLIYY
 ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISLQSE EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO 67)

REGIÃO CONSTANTE C_k (SEQ ID NO 58)

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TAVVCLLNN FYPREARVQW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC

CADEIA PESADA (IgG1)**PÉPTIDO SINAL**

MHWGVMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL V_H (2B)

QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS YWLEWVRQA PGHGLEWMGE
 IDFGFTTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFGSGNYDYF DYWGQGLVT VSS (SEQ ID NO 68)

REGIÃO CONSTANTE CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPPPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VESSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
 KSCDKTHTCF PCPAPPELLGG PSVFLFPPKF KDTLMISRTF EVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEETIS KARGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNOVELTC
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSPFLY SKLTVDKSRN
 QGQNVFSCSV MHEALHNYT QKSLSLRNGK

Figura 10F Sequência Polipeptídica de MAb CL-1136-2C**CADEIA LEVE****PEPTIDO SINAL**

MEWSCVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL VK

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIRWYQQKP GQAPRLLIYY
 ASESISGIPA RFGSGSGTE PTLTISLQSG EDPAVYYCQQ SWSWPTTFGG
 GTRVEIK (SEQ ID NO 69)

REGIÃO CONSTANTE CK (SEQ ID NO 58)

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSYISLSST LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC

CADEIA PESADA (IgG1)**PEPTIDO SINAL**

MEWSCVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

REGIÃO VARIÁVEL (VI)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVYV SCKASGYTFS WYWLEWVRQA PGQGLEWMGE
 ISPGTFTTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFGSSNYDYF DYWGQGLVIT VSS (SEQ ID NO 70)

REGIÃO CONSTANTE CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HFFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
 KSCDKTHTCP FCPAPELLGG PSVFLPDPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
 HEDPEVKFSW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNQK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
 LVRGFIYPDI AVEWESNGQP ENNYKRTTPV LQSDGGSFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVPSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

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

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * WO 9062660 A
- * EP 0467392 A
- * US 5449760 A
- * US 6180370 B
- * US 5956708 A
- * US 4816587 A
- * WO 9318185 A
- * EP 239430 B1
- * WO 9013646 A
- * US 4965199 A
- * EP 73667 A
- * US 4416448 A
- * US 4601978 A
- * WO 0411026 A
- * US 4767704 A
- * US 4667866 A
- * US 4560655 A
- * US 5122469 A
- * US 5712163 A
- * US 6048728 A
- * US 3773919 A
- * US 4737456 A
- * US 4378110 A
- * WO 9404188 A
- * US 2004002894 W
- * US 60444229 B

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * HASEGAWA, S. et al. *Hematopoiesis*, 1999, vol. 93, 2543-2551
- * KLUBAL R. et al. *J. Invest. Dermatol.*, 1997, vol. 108 (3), 336-42
- * DIERKS, A.E. et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 150, 2372-2382
- * SANON, A. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, vol. 98, 333-344
- * BONNEFOY, J. et al. *Eur. Resp. J.*, 1996, vol. 9, 835-866
- * SUTTON; GOULD. *Nature*, 1993, vol. 366, 421-428
- * YANG, P.P. *J. Clin. Invest.*, 2000, vol. 106, 879-888 [0094]
- * PRESTA et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 26368-26373
- * HENRY A.J. *Biochemistry*, 1997, vol. 36, 15568-15578
- * SHI, J. et al. *Biochemistry*, 1997, vol. 36, 2112-2122
- * MALVEAUX et al. *J. Clin. Invest.*, 1978, vol. 82, 176
- * MACGLASHAN et al. *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, 1438-1445
- * COME, J. et al. *J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 99, 879-887
- * RACINE-POON, A. et al. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1997, vol. 62, 875-880
- * FAHY, J.V. et al. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 1997, vol. 155, 1824-1834
- * BOULET, L. P. et al. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 1997, vol. 155, 1835-1840
- * MILGROM, E. et al. *N. Engl. J. Med.*, 1999, vol. 341, 1966-1973
- * CHANG et al. *Biotechnology*, 1990, vol. 8, 123-126
- * KOLBINGER et al. *Protein Engineering*, 1993, vol. 6 (8), 871-880
- * Sequences of proteins of immunological interest. KABAT E. A. et al. US department of health and human service. Public health service, National Institute of Health
- * WARD, E. S. et al. *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546
- * CHOTHIA et al. *Nature*, 1989, vol. 342, 887-883
- * QUEEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 10029-10033
- * KABAT et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institute of Health, 1987
- * KOHLER; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 258, 495
- * FIELD et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 2159-2166
- * EVAN et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5 (12), 3610-3616
- * PABORSKY et al. *Protein Engineering*, 1990, vol. 3 (6), 547-553
- * Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- * Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986
- * CHAMPE et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 270, 1368-1394

- * KOHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495
- * GODING, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986, 590-103
- * KOZBAR, *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001
- * BRODEUR et al. *Monoclonal Antibody Production: Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc. 1987, 51-63
- * GODING, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986, 59-103
- * MORRISON et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851
- * JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525
- * RIECHMAN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327
- * VERHOEYENS et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536
- * SIMS et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296
- * CHOITHIA et al. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901
- * CARTER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285
- * PRESTA et al. *J. Immunol.*, 1983, vol. 151, 2623
- * MORIMOTO et al. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117
- * BRENNAN et al. *Science*, 1985, vol. 229, 81
- * CARTER et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 163-167
- * AMIT et al. *Science*, 1988, vol. 233, 747-753
- * CHOITHIA et al. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917
- * STINCHCOMB et al. *Nature*, 1979, vol. 282, 39
- * JONES, *Genetics*, 1977, vol. 85, 12
- * YANIV, *Nature*, 1982, vol. 297, 17-18
- * LUCKOW et al. *BioTechnology*, 1988, vol. 6, 47-55
- * MILLER et al. *Genetic Engineering*, Plenum publishing, 1986, vol. 8, 277-279
- * MISEDAL et al. *Nature*, 1965, vol. 215, 592-594
- * *Tissue Culture*, Academic Press, 1973
- * CHO, URLAUB et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216
- * HAM et al. *Meth. Enzymol.*, 1979, vol. 58, 44
- * BARNES et al. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102, 255
- * LINDMARK et al. *J. Immunol. Meth.*, 1983, vol. 62, 1-13
- * GUSS et al. *EMBO J.*, 1986, vol. 5, 1567-1575
- * *Birmingham's Pharmaceutical Sciences*, 1980
- * *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay*, O'SULLIVAN et al. *Methods in Enzym.* Academic press, 1981, vol. 73, 147-166
- * ZOLA, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc, 1987, 147-158
- * LIU et al. *J. Immunol.*, 1988, vol. 143 (12), 3967-75