República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014029089-0 B1

(22) Data do Depósito: 24/05/2013

(45) Data de Concessão: 25/04/2023

(54) Título: ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSTO, USO E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO

(51) Int.Cl.: C07K 16/40.

(30) Prioridade Unionista: 24/05/2012 GB 1209096.5.

(73) Titular(es): MEDICAL RESEARCH COUNCIL TECHNOLOGY.

(72) Inventor(es): TIM JOHNSON; PHIL WATSON; DAVID MATTHEWS; ALEX BROWN.

(86) Pedido PCT: PCT GB2013051373 de 24/05/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/175229 de 28/11/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/11/2014

(57) Resumo: ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO MESMO; POLINUCLEÓTIDO CODIFICADOR; COMPOSTO; COMPOSIÇÃO/FORMULAÇÃO FARMACEUTICA; KIT; USO; MÉTODO IN VITRO PARA REDUZIR OU INIBIR A ATIVIDADE DA ENZIMA TG2. A invenção proporciona anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam seletivamente a um epítopo dentro da região de núcleo de transglutaminase tipo 2 (TG2). Novos epítopos dentro do núcleo TG2 são fornecidos. A invenção proporciona anticorpos inibitórios TG2 humanos e suas utilizações, particularmente em medicina, por exemplo, no tratamento e / ou diagnóstico de condições, incluindo doença celíaca, cicatrizes, as doenças relacionadas com fibrose, doenças neurológicas e neurodegenerativas/cancer.

“**ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSTO, USO E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO”**

[0001] A presente invenção refere-se aos inibidores de TG2 e métodos para fornecimento e uso de tais inibidores.

[0002] A transglutaminase tipo 2 (TG2; também conhecido como tecido de transglutaminase, TTG) é parte da família mais ampla de transglutaminase 9 membro que inclui o Factor XIII, que é crítica para a coagulação do sangue, bem como de queratinócitos transglutaminase (TG1) e transglutaminase Epidérmico (TG3) que estão envolvidos na diferenciação terminal de queratinócitos. Além disso, há outros membros da família, tais como TG TG tipos 4-7, onde nenhum papel definitivo sido identificados até à data.

[0003] TG2 funções primariamente como uma proteína de enzima de ligação cruzada por catalisar a formação de ε (γ-glutamil) lisina ligações iso-dipéptido. A expressão elevada de TG2 leva a proteína aberrante reticulação que tem sido associado com várias patologias, incluindo vários tipos de tecido cicatricial, a formação de emaranhados neurofibrilares em vários distúrbios cerebrais e resistência à quimioterapia em alguns cancêrs. TG2 também é capaz de deamidate proteínas. TG2 deamidates gliadina e o complexo TG2/gliadina é o auto-antígenoprimário em doença celíaca. Além disso, TG2 tem uma função de ligação a GTP e podem actuar como uma GTPase, embora isto não tenha sido ligada a um papel patológico.

[0004] Atividade elevada TG2 está principalmente associada a cicatrização anormal de feridas [1] que conduz ao fígado [2], pulmonar [3], coração [4] e fibrose renal, [5], bem como aterosclerose [6]. O processo de formação de cicatrizes e fibrose está associada ao aumento da síntese e, mais importante, levantada exportação de TG2 para o espaço intersticial. Uma vez fora da célula, TG2 é capaz de formar ligações cruzadas da matriz extracelular (ECM) proteínas, tais como a fibronectina e colágeno [7], através da incorporação de um ε (γ-glutamil) lisina ligação di-péptido [8]. Estudos têm mostrado que esta pode acelerar a deposição de componentes

ECM disponíveis, enquanto, ao mesmo tempo que confere resistência à depuração proteolítica pela metaloproteinase de matriz do sistema (MMP) [9, 10]. Tomados em conjunto, o que provoca uma acumulação de proteínas da MEC e, assim, o tecido cicatricial [9]. Além disso, TG2 tem um papel emergente na ativação de TGF-β1 no processo de cicatrização [11], e também tem sido associada a vias de ativação de necrose tumoral factor α [13] interleucina-6 [12] e.

[0005] A inibição da TG2 in vitro diminui os níveis de matriz extracelular [14], enquanto as células derivadas de camundongos knockout TG2 têm níveis mais baixos de ECM madura [9]. Na aplicação in vivo de inibidores de TG pan em modelos de doença renal crónica reduzir o desenvolvimento de glomerulosclerose e fibrose tubulointersticial preservação da função renal [15, 16]. Benefícios semelhantes são observados nos ratos knockout TG2 submetido à obstrução ureteral unilateral [17].

[0006] Existem várias doenças neurodegenerativas caracterizadas pela presença de agregados de proteína na região degenerativa do cérebro que TG2 tem sido implicado na formação. A melhor caracterizada na coreia de Huntington. Proteína Huntington (htt) contém expandiu repete poliglutamínicas no seu domínio N-terminal. Do tipo selvagem htt contém menos de 35 glutaminas consecutivos enquanto htt relacionada com a doença geralmente tem mais de 40 glutaminas consecutivos que o torna um excelente substrato TG2. Subsequentemente, os agregados insolúveis são formados no corpo estriado e no córtex de pacientes com doença de Huntington. A frequência de agregados correlaciona-se bem com a gravidade da doença.

[0007] A doença de Alzheimer é caracterizada pela presença de placas senis extracelulares compostas por agregados amilóides β-proteína e emaranhados neurofibrilares intracelulares que consistem de uma forma altamente fosforilada da proteína tau. Estas placas contêm grandes quantidades de ε (γ-glutamil) lisina títulos iso-dipeptídeo.

[0008] Finalmente, uma característica da doença de Parkinson é a presença de agregados de alfa-sinucleína chamada corpos de Lewy no citoplasma de neurónios afectados que contêm novamente ε (γ-glutamil) lisina ligações iso-dipéptido. Todas as proteínas acima mencionadas são bons substratos de TG2 in vitro. Além disso, a região afetada do cérebro contém níveis mais elevados de proteína TG2 de regiões não afetadas do cérebro nos mesmos pacientes. A correlação entre a especificidade de substrato para as proteínas agregadas TG2 relevante doenças e aumento dos níveis de expressão de TG2 sugerem um papel para TG2 enzimaticamente ativa em cada uma das doenças.

[0009] Inibidores de TG foram mostrados para exercer efeitos terapêuticos em vários modelos biológicos de doenças neurodegenerativas. Em um modelo de cultura de células de doenças transfecção de COS-7 de Parkinson células com alfa-sinucleína e TG2 simultaneamente, agregados covalentes -sinuclea, que lembra de corpos de Lewy na doença, a forma de Parkinson e são dependentes TG2 enzimaticamente ativa desde os C277S inativo TG2 mutante não induzir a formação de agregados. O tratamento destas células co-transfectadas com cistamina reduziu significativamente a quantidade de agregados de alfa-sinucleína, bem como a percentagem de células contendo os agregados. Houve outros dois relatórios em que as proteínas com o comprimento normal e proteínas poliglutamínica repetição expandidas, representativo de doenças CAG expandidas, tais como a doença de Huntington, têm sido transfectados em linhas celulares e mostradas para formar agregados. O tratamento destas linhas de células com o TG monodansylcadaverine inibidor competitivo levou a uma diminuição da fragmentação nuclear, enquanto que o tratamento com cistamina chumbo tanto a um decréscimo na fragmentação nuclear, e uma diminuição na formação de agregados de proteína. Um exemplo de um inibidor da pan TG é 1,3-Dimetil-2 - [(2-oxo-propil) tio] imidazólio cloreto de que está disponível a partir de Zedira GmbH e referida em várias publicações como NTU283 ou r283.

[00010] A cistamina tem um efeito terapêutico benéfico quando administrado in vivo em modelos de rato da doença de Huntington. Huntington R6 / 2 ratos que receberam doses de cistamina mostraram melhora da função motora, perda de peso menos grave, e aumento da sobrevida em relação aos controles não-tratados. É importante notar que a atividade ex vivo TG2 em homogeneizados de cérebro era menor após a dosagem com a cistamina, pelo menos, 60 minutos após a injeção. Em um outro modelo de rato da doença de Huntington, a estirpe YAC128, cistamina foi capaz de diminuir o nível de atrofia do estriado, mas incapaz de melhorar o peso do animal ou da função motora, o que indica um efeito benéfico da cistamina no nível celular e tecidual, mas não nos sintomas da doença .

[00011] Provavelmente, a evidência mais convincente de que o efeito terapêutico benéfico da cistamina em ratinhos Huntington é independente da inibição TG2 veio de cruzar a R6/2 Huntington rato com o rato knockout TG2 para criar uma estirpe susceptível a neurodegeneração na ausência de TG2.

[00012] Quando a R6/2 TG2 -/- ratos foram tratados com cistamina, a melhora da função motora e aumento da expectativa de vida não foram estatisticamente diferentes da melhora observada em R6/2 TG2 +/+ camundongos tratados com cistamina. Além disso, R6/1 e R6/2 TG2 -/- ratos tinham níveis aumentados de agregados de proteínas neuronais em comparação com R6/ e R6/2 TG2 +/+ ratinhos, sugerindo um mecanismo de agregação de proteínas independente da atividade de transamidação TG2 nestes modelos. No entanto, é de salientar que R6/2 TG2 -/- ratos mostraram um atraso no aparecimento da disfunção motora e a sobrevivência melhorada em comparação com R6/2 TG2 +/+ ratinhos / implicando um papel para TG2 na patogénese da morte neuronal no R6/2 modelo.

[00013] TG2 também está fortemente implicado na doença celíaca que afeta 1 em cada 100 pessoas na Europa Ocidental. Doença celíaca é uma doença inflamatória mediada por células T do intestino delgado causada por uma classe de proteínas chamadas prolaminas encontrada no trigo, cevada e centeio. O elevado teor de prolina e glutamina destas proteínas tornam resistente aos naturais

gástricos, pancreático, e proteases intestinais, e peptidases durante a digestão. Os fragmentos peptídicos resultantes permanecem assim não digeridos para o intestino delgado e ganhar acesso à lâmina própria do intestino, onde, após a modificação por TG2, eles podem estimular uma resposta imune mediada por células T, levando a uma inflamação e destruição da arquitetura intestinal. Intestinal TG2 deamidates resíduos de glutamina específicas nos péptidos prolamina para resíduos glutamato. Em HLA-DQ2 / 8 indivíduos estes péptidos modificados são apresentados a células T autoreativas correspondente por moléculas MHC classe II. Embora prolaminas tenham um elevado teor de glutamina (cerca de 30-35%), apenas alguns destes resíduos de glutamina são alvo de TG2 humano. Uma excelente correlação entre a especificidade de substrato TG2, afinidade de ligação DQ2, e célula T potencial estimulador das prolaminas tratadas-TG2 sugere fortemente que o péptido é mediada por desamidação TG2 e desempenha um papel significativo na determinação da severidade da doença. Além disso, os pacientes com doença celíaca gerar uma resposta de auto-anticorpos para os complexos TG2-gliadina. Estes anticorpos anti-TG2 são encontrados tanto no intestino delgado, onde eles têm sido mostrados para co-localizar com TG2 extracelular, e no sangue, onde são explorados como marcador de diagnóstico da doença.

[00014] Apesar da falta de modelos animais de doença celíaca, *ex vivo*, as experiências indicam que a inibição TG2 tem o potencial de beneficiar pacientes com doença celíaca. A cultura de celíacos pequenas biópsias intestinais de pacientes tratados com qualquer TG2 (desamidados) ou não-tratada TG2 (não desamidada) glúten digere ambos resultou na geração de linhas de células T de pacientes que preferencialmente reconhecido péptidos desamidados glúten em vez de glúten peptídeos não desamidada. Além disso, bloqueando a atividade de TG2 endógena nas biópsias celíacos com cistamina mais do que metade das linhas de células T resultantes tinham respostas proliferativas reduzida em comparação com os controles não-tratados com cistamina. Linhagens de células não respondem

bem aos resumos não desamidadas. Estes resultados implicam que os glúten responsivo populações de células T em biópsias intestinais celíacos são naturalmente inclinado para reconhecer péptidos desamidados glúten em oposição aos péptidos não desamidada, que a atividade TG2 endógena nestes biópsias pode resultar em glúten péptido desamidação in situ e que o tratamento de biópsias celíacos com inibidores de TG2 pode reduzir a resposta proliferativa de células T reativas com glúten.

[00015] Outro estudo demonstrou que o inibidor da pan-TG 2 - [(2-oxopropil) tio] imidazólio inibidor foi capaz de impedir a reticulação in situ de péptidos do glúten de proteínas endógenas em finas secções de tecido tiradas de ambos os pacientes e controles de vazamento celíacos. Mais importante ainda, os autores demonstraram que a incubação de celíacos intacta pequenas biópsias intestinais com 2 - [(2-oxopropil) tio] imidazólio impedida a ativação de células T induzida pela forma não desamidada de um péptido imunodominante glúten. Em contraste, a inibição TG era ineficaz a controlar a ativação das células T quando as biópsias foram incubados com a versão desamidada do mesmo péptido. Estes resultados sugerem que a inibição da TG2 endógeno em biópsias de pacientes com doença celíaca pode impedir péptido glúten desamidação e, por conseguinte, reduzir a ativação de células-T.

[00016] Várias observações apoiam a hipótese de que TG2 desempenha um papel no desenvolvimento de certos tipos de cancêr. Vários estudos têm mostrado que a proteína TG2 é sobre-regulada no tecido canceroso em relação ao tecido saudável em cancêrs, tais como glioblastomas, melanomas malignos, e os adenocarcinomas do ducto pancreático para citar alguns. Uma correlação positiva entre a resistência e quimioterapêutico potencial metastático de alguns tipos de cancêr, com os níveis de expressão de TG2 foi demonstrada, enquanto que em certos tipos de células TG2 demonstrou exercer efeitos anti-apoptóticos em células siRNA enquanto a sub-regulação dos níveis de TG2 ou tratamento de expressão de proteínas com inibidores de TG2 sensibiliza as células para a apoptose. Por

outro lado, há também relatos de down-regulação da expressão TG2 em certos tipos de câncer [18]. Recentemente, tem sido mostrado que TG2 é um parceiro de ligação para GPR56, uma proteína regulada para baixo em células de cancêr altamente metastáticas, sugerindo que TG2 pode actuar como uma proteína supressora de tumor através da sua interação com GPR56 [18]. Inibidores de transglutaminase atuais caem em três classes principais: 1) inibidores da amina competitivas (por exemplo, cistamina e espermina) que competem com substratos de aminas naturais; 2) inibidores reversíveis alostéricos tais como GTP e uma classe recentemente descoberta de compostos com uma tieno [2,3-d] pirimidin-4-ona acil-hidrazida espinha dorsal; e 3) os inibidores irreversíveis, incluindo 2-[(2-oxopropil) tio] imidazólio derivados (acetilato do local ativo cisteína), 3-halo-4,5-dihydroisoxazoles (formar um iminothioether estável no sítio ativo) e carbobenziloxi-L-glutaminil análogos de glicina com uma variedade de porções reativas inseridos.

[00017] A maioria tem sido utilizado nos sistemas experimentais acima e mostrado resultados benéficos. No entanto, nenhum destes inibidores da isoforma TG mostra especificidade como todos eles têm como alvo a tríade catalítica conservada dentro do núcleo catalítico da família transglutaminase. Por conseguinte, todos potencialmente têm a desvantagem de co-inibição do Factor XIIIa, TG1 e TG3, que impede eficazmente a sua aplicação na doença humana, devido aos efeitos secundários que podem ser esperados.

[00018] O documento WO 2006/100679 descreve um anticorpo específico anti-TG2 produzida por tecnologia recombinante a partir de amostras recolhidas a partir de três pacientes adultos com doença celíaca com títulos elevados de anticorpos anti-TG2.

[00019] Dada a associação de TG2 com numerosos estados de doença e dados convincentes de inibidores não específicos, existe uma necessidade de inibidores de TG2 altamente seletivos e de alta eficácia, com efeitos mínimos fora do alvo.

[00020] A listagem ou discussão de um documento antes aparentemente-publicado nesta especificação não deve, necessariamente, ser tido como um reconhecimento de que o documento faz parte do estado da arte ou de conhecimento geral comum.

[00021] Em um primeiro aspecto, a presente invenção proporciona um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno que se liga seletivamente a um epítopo dentro da região de núcleo de transglutaminase tipo 2 (TG2).

[00022] Em certas formas de realização, prevê-se que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno irá ligar-se seletivamente a um epítopo dentro da região de núcleo de TG2 humano, TG2 de rato, e/ou TG2 um rato. Numa forma de realização particularmente preferida, o TG2 é TG2 humano.

[00023] As sequências de aminoácidos completos TG2 de humano, rato e camundongo podem ser encontradas sob o Genbank números de adesão NM_004613, NM_019386.2 e NM_009373.3. A parte de codificação destas sequências são as seguintes:

[00024] Sequência de nucleótidos TG2 Humano:

atggccgaggagctggtcttagagaggtgtgatctggagctggagaccaatggccgagaccaccacacggccg
acctgtgccgggagaagctggtggtgcgacggggccagcccttctggctgaccctgcactttgagggccgcaact
acgaggccagtgtagacagtctcaccttcagtgtcgtgaccggcccagcccctagccaggaggccgggaccaa
ggcccgttttccactaagagatgctgtggaggagggtgactggacagccaccgtggtggaccagcaagactgca
ccctctcgctgcagctcaccaccccggccaacgcccccatcggcctgtatcgcctcagcctggaggcctccactg
gctaccagggatccagctttgtgctgggccacttcattttgctcttcaacgcctggtgcccagcggatgctgtgtacct
ggactcggaagaggagcggcaggagtatgtcctcacccagcagggctttatctaccagggctcggccaagttca
tcaagaacataccttggaattttgggcagtttgaagatgggatcctagacatctgcctgatccttctagatgtcaaccc
caagttcctgaagaacgccggccgtgactgctcccgccgcagcagccccgtctacgtgggccgggtggtgagtg
gcatggtcaactgcaacgatgaccagggtgtgctgctgggacgctgggacaacaactacggggacggcgtcag
ccccatgtcctggatcggcagcgtggacatcctgcggcgctggaagaaccacggctgccagcgcgtcaagtatg
gccagtgctgggtcttcgccgccgtggcctgcacagtgctgaggtgcctgggcatccctacccgcgtcgtgaccaa
ctacaactcggcccatgaccagaacagcaaccttctcatcgagtacttccgcaatgagtttggggagatccagggt

gacaagagcgagatgatctggaacttccactgctgggtggagtcgtggatgaccaggccggacctgcagccgg
ggtacgagggctggcaggccctggacccaacgccccaggagaagagcgaagggacgtactgctgtggccca
gttccagttcgtgccatcaaggagggcgacctgagcaccaagtacgatgcgccctttgtctttgcggaggtcaatg
ccgacgtggtagactggatccagcaggacgatgggtctgtgcacaaatccatcaaccgttccctgatcgttgggct
gaagatcagcactaagagcgtgggccgagacgagcgggaggatatcacccacacctacaaatacccagagg
ggtcctcagaggagagggaggccttcacaagggcgaaccacctgaacaaactggccgagaaggaggagac
agggatggccatgcggatccgtgtgggccagagcatgaacatgggcagtgactttgacgtctttgcccacatcac
caacaacaccgctgaggagtacgtctgccgcctcctgctctgtgcccgcaccgtcagctacaatgggatcttggg
gcccgagtgtggcaccaagtacctgctcaacctcaacctggagcctttctctgagaagagcgttcctctttgcatcct
ctatgagaaataccgtgactgccttacggagtccaacctcatcaaggtgcgggccctcctcgtggagccagttatc
aacagctacctgctggctgagagggacctctacctggagaatccagaaatcaagatccggatccttggggagcc
caagcagaaacgcaagctggtggctgaggtgtccctgcagaacccgctccctgtggccctggaaggctgcacct
tcactgtggaggggccggcctgactgaggagcagaagacggtggagatcccagaccccgtggaggcaggg
gaggaagttaaggtgagaatggacctgctgccgctccacatgggcctccacaagctggtggtgaacttcgagag
cgacaagctgaaggctgtgaagggcttccggaatgtcatcattggccccgcctaa

Sequência de aminoácidos TG2 Humano:

MAEELVLERCDLELETNGRDHHTADLCREKLVVRRGQPFWLTLHFEGRNYEAS
VDSLTFS
VVTGPAPSQEAGTKARFPLRDAVEEGDWTATVVDQQDCTLSLQLTTPANAPIGL
YRLSLE
ASTGYQGSSFVLGHFILLFNAWCPADAVYLDSEEERQEYVLTQQGFIYQGSAKFI
KNIPW
NFGQFEDGILDICLILLDVNPKFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVVSGMVNCNDDQ
GVLLGR
WDNNYGDGVSPMSWIGSVDILRRWKNHGCQRVKYGQCWVFAAVACTVLRCLG
IPTRVVTN
YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQGDKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEG
WQALDPT

PQEKSEGTYCCGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIQQDDGSVHK
SINRSL
IVGLKISTKSVGRDEREDITHTYKYPEGSSEEREAFTRANHLNKLAEKEETGMAM
RIRVG
QSMNMGSDFDVFAHITNNTAEEYVCRLLLCARTVSYNGILGPECGTKYLLNLNLE
PFSEK
SVPLCILYEKYRDCLTESNLIKVRALLVEPVINSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQ
K
RKLVAEVSLQNPLPVALEGCTFTVEGAGLTEEQKTVEIPDPVEAGEEVKVRMDLL
PLHMG
LHKLVVNFESDKLKAVKGFRNVIIGPA*

Rato sequência TG2 Nucleotide:

Atggccgaggagctgaacctggagaggtgcgatttggagatacaggccaatggccgtgatcaccacacggcc
gacctgtgccaagagaaactggtgctgcggcgaggccagcgcttccggctgacactgtacttcgagggccgtgg
ctatgaggccagcgtggacagacttacatttggtgccgtgaccggcccagatcccagtgaagaggcagggacc
aaggcccgcttctcactgtctgacgatgtggaggagggatcctggtcagcctctgtgctggaccaacaggacaat
gtcctctcgctgcagctctgcaccccagccaatgctcctgttggccagtaccgcctcagcctggagacttctactgg
ctaccaaggctccagcttcatgctgggtcacttcatcctgctcttcaatgcctggtgcccagcggatgacgtgtacct
agattcagaggcggagcgccgggaatacgtcctcacacagcagggcttcatctaccagggctctgtcaagttcat
caagagtgtgccttggaactttgggcagtttgaggatgggatcctggatgcctgcctgatgcttttggatgtgaaccc
caagttcctgaaggaccgtagccgggactgctcacgacgcagcagtcccatctatgtgggccgcgtggtgagcg
gcatggtcaactgcaatgatgaccagggtgtgcttctgggtcgctgggacaacaattatggggacggtatcagtcc
catggcctggattggcagcgtggacattctgcggcgctggaaggaacacggctgtcagcaagtgaagtatggcc
agtgctgggtgtttgcggcggtagcctgcacagtgctgcggtgccttggcatccctaccagagtggtgaccaacta
caactccgcccacgaccagaacagcaacctgctcatcgagtacttccgaaacgagtacggggagctggagag
caacaagagcgagatgatctggaatttccactgctgggtggagtcctggatgaccaggccagacctacagccag
gctatgaggggtggcaggccattgaccccacaccgcaggagaagagcgaaggaacatactgttgtggcccagt
ctcagtgcgggccatcaaggagggtgacctgagcaccaagtatgatgcgtccttcgtgtttgccgaggtcaacgct
gatgtggtggactggatccggcagtcagatgggtctgtgctcaaatccatcaacaattccctggtcgtggggcaga

agatcagcactaagagcgtgggccgtgatgaccgggaggacatcacctatacctacaagtacccagaggggtc
cccagaggagagggaagtcttcaccagagccaaccacctgaacaaactggcagagaaagaggagacaggg
gtggccatgcggatccgagtgggggatggtatgagcttgggcaatgactttgacgtgtttgcccacatcggcaacg
acacctcggagagccgtgagtgccgcctcctgctctgtgcccgcactgtcagctacaacggcgtgctggggcccg
agtgtggcactgaggacatcaacctgaccctggatccctactctgagaacagcatccccccttcgcatcctctacga
gaagtacagcggttgcctgaccgagtcaaacctcatcaaggtgcggggtctcctcgtcgagccagccgctaaca
gctacctgctggctgagagagatctctacctggagaatcctgaaatcaagatccggatcctgggggagcccaag
cagaaccgcaaactggtggctgaggtgtccctgaagaacccactttctgattccctgtatgactgtgtcttcactgtg
gaggggctggcctgaccaaggaacagaagtctgtggaggtctcagaccctgtgccagcaggagatgcggtca
aggtgcgggttgacctgttcccgactgatattggcctccacaagttggtggtgaacttccagtgtgacaagctgaagt
cggtcaagggttaccggaatatcatcatcggcccggcctaag

Rato sequência de aminoácidos TG2:

MAEELNLERCDLEIQANGRDHHTADLCQEKLVLRRGQRFRLTLYFEGRGYEASV
DRLTFG
AVTGPDPSEEAGTKARFSLSDDVEEGSWSASVLDQQDNVLSLQLCTPANAPVG
QYRLSLE
TSTGYQGSSFMLGHFILLFNAWCPADDVYLDSEAERREYVLTQQGFIYQGSVKFI
KSVPW
NFGQFEDGILDACLMLLDVNPKFLKDRSRDCSRRSSPIYVGRVVSGMVNCNDDQ
GVLLGR
WDNNYGDGISPMAWIGSVDILRRWKEHGCQQVKYGQCWVFAAVACTVLRCLGI
PTRVVTN
YNSAHDQNSNLLIEYFRNEYGELESNKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEG
WQAIDPT
PQEKSEGTYCCGPVSVRAIKEGDLSTKYDASFVFAEVNADVVDWIRQSDGSVLK
SINNSL
VVGQKISTKSVGRDDREDITYTYKYPEGSPEEREVFTRANHLNKLAEKEETGVA
MRIRVG

DGMSLGNDFDVFAHIGNDTSESRECRLLLCARTVSYNGVLGPECGTEDINLTLDP
YSENS
IPLRILYEKYSGCLTESNLIKVRGLLVEPAANSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQ
NR
KLVAEVSLKNPLSDSLYDCVFTVEGAGLTKEQKSVEVSDPVPAGDAVKVRVDLF
PTDIGL
HKLVVNFQCDKLKSVKGYRNIIIGPA*X

Rato TG2 sequência de nucleótidos:

atggcagaggagctgctcctggagaggtgtgatttggagattcaggccaatggccgtgaccaccacacggccga
cctatgccaagagaaactggtgctgcgtcgtggtcagcgcttccggctgactctgtacttcgagggccgtggctacg
aggccagcgtggacagcctcacgttcggtgctgtgaccggcccagatcccagtgaagaggcagggaccaagg
cccgcttctcactgtctgacaatgtggaggagggatcttggtcagcctcagtgctggaccaacaggacaatgtcctc
tcgctacagctctgcaccccagccaatgctcctattggcctgtaccgtctcagcctagaggcttctactggctaccag
ggctccagctttgtgctgggccacttcatcctgctctacaatgcctggtgcccagccgatgatgtgtacctagactca
gaggaggagcgacgggaatatgtccttacgcaacagggcttcatctaccaaggctctgtcaagttcatcaagagt
gtgccttggaactttgggcagttcgaggatggaatcctggatacctgcctgatgctcttggatatgaaccccaagttc
ctgaagaaccgtagtcgggactgctcacgccgcagcagtcccatctatgtgggccgcgtggtgagcgccatggtc
aactgcaatgatgaccagggtgtgcttctgggccgctgggacaacaactatggggatggtatcagtcccatggcct
ggattggcagtgtggacattctgcggcgctggaaggaacacggctgtcagcaagtgaagtacgggcagtgctgg
gtgtttgcagcggtggcctgcacagtgctgcggtgcctcggcatccctaccagagtggtgaccaactacaactccg
cccacgaccagaacagcaacctgctcatcgagtacttccgaaatgagttcggggagctggagagcaacaaga
gcgagatgatctggaacttccactgctgggtggagtcctggatgaccaggccagacctacagccgggctatgag
gggtggcaggccattgaccccacaccacaggagaagagcgaagggacatactgttgtggcccagtctcagtgc
gagccatcaaggagggagacctgagtaccaagtatgatgcacccttcgtgtttgccgaggtcaacgctgatgtggt
ggactggatccggcaggaagatgggtctgtgctcaaatccatcaaccgttccttggtcgtggggcagaagatcag
cactaagagtgtgggccgtgatgaccgggaggacatcacccatacctacaagtacccagaggggtcacccga
ggagagggaagtcttcaccaaggccaaccacctgaacaaactggcagagaaagaggagacaggggtggcc
atgcgcatccgagtgggggacagtatgagcatgggcaacgacttcgacgtgtttgcccacatcggcaacgacac
ctcggagactcgagagtgtcgtctcctgctctgtgcccgcactgtcagctacaacggggtgctggggcccgagtgt

ggcactgaggacatcaacctgaccctggatccctactctgagaacagcatcccacttcgaatcctctacgagaag
tacagcgggtgcctgacagagtcaaacctcatcaaggtgcggggccttctcatcgaaccagctgccaacagcta
cctgctggctgagagagatctctacctggagaatcccgaaatcaagatccgggtcctgggagaacccaagcaa
aaccgcaaactggtggctgaggtgtccctgaagaacccactttccgatcccctgtatgactgcatcttcactgtgga
gggggctggcctgaccaaggagcagaagtctgtggaagtctcagacccggtgccagcgggcgatttggtcaag
gcacgggtcgacctgttcccgactgatattggcctccacaagctggtggtgaacttccagtgtgacaagctgaagt
cggtgaagggttaccggaatgttatcatcggcccggcctaa

TG2 sequência de rato de Aminoácidos:

MAEELLLERCDLEIQANGRDHHTADLCQEKLVLRRGQRFRLTLYFEGRGY
EASVDSLTFGAVTGPDPSEEAGTKARFSLSDNVEEGSWSASVLDQQDNVL
SLQLCTPANAPIGLYRLSLEASTGYQGSSFVLGHFILLYNAWCPADDVYL
DSEEERREYVLTQQGFIYQGSVKFIKSVPWNFGQFEDGILDTCLMLLDMN
PKFLKNRSRDCSRRSSPIYVGRVVSAMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDGIS
PMAWIGSVDILRRWKEHGCQQVKYGQCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTN
YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELESNKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPG
YEGWQAIDPTPQEKSEGTYCCGPVSVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNAD
VVDWIRQEDGSVLKSINRSLVVGQKISTKSVGRDDREDITHTYKYPEGSP
EEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVGDSMSMGNDFDVFAHIGNDTS
ETRECRLLLCARTVSYNGVLGPECGTEDINLTLDPYSENSIPLRILYEKY
SGCLTESNLIKVRGLLIEPAANSYLLAERDLYLENPEIKIRVLGEPKQNR
KLVAEVSLKNPLSDPLYDCIFTVEGAGLTKEQKSVEVSDPVPAGDLVKAR
VDLFPTDIGLHKLVVNFQCDKLKSVKGYRNVIIGPA

[00025] Os presentes inventores levantaram a TG2 anticorpos por imunização de murganhos com uma proteína recombinante que abrange os aminoácidos 143-473 do núcleo TG2 humano. O hibridoma foram rastreados quanto à especificidade e TG2 inibição com quaisquer candidatos adequados clonado. IgG foi purificada a partir destes para calcular a eficácia e o epítopo alvo mapeado por rastreio de uma biblioteca humana TG2 por exibição em fagos.

A presente abordagem para a produção de anticorpos contra TG2 usando uma

proteína recombinante núcleo TG2 não foi experimentado antes e surpreendentemente que conduziu ao isolamento e caracterização de anticorpos para TG2 que eram altamente seletivo para TG2 e apresentaram fortes características inibidoras. As tentativas anteriores para aumentar os anticorpos para TG2 levaram ao isolamento de anticorpos relativamente não seletivas que reagem de forma cruzada com outros membros da família de transglutaminase e, portanto, não representaria anticorpos promissores para uso clínico. Os anticorpos da presente invenção por outro lado, são candidatos promissores para ensaios clínicos para doenças ou exacerbadas pela mediadas pela atividade TG2.

[00026] É surpreendente que a abordagem no presente pedido levou à produção de anticorpos muito mais eficazes do que os produzidos anteriormente. Não havia nenhuma garantia de que ele teria sido possível produzir anticorpos que são inibidores eficazes de TG2 por imunização com a região do núcleo. Como indicado acima, os anticorpos que são inibidores eficazes pode não ser suficiente para TG2 específico a ser utilizado eficazmente em medicina. É surpreendente que os anticorpos para as regiões divergentes, em particular, as regiões do núcleo que divergem ligeiramente entre diferentes membros da família de transglutaminase de TG2) são inibidores eficazes e seletivos de TG2.

[00027] Sem estar limitado por qualquer teoria, pensamos que por criar anticorpos para uma proteína menor que cobre apenas o núcleo central, não só eliminam alguns dos epítopos imunológicos favorecidas presentes na proteína de comprimento completo, mas também a força do núcleo de direcionamento. Isto parece aumentar a variedade de anticorpos disponíveis para seleção e fornece uma cobertura mais ampla do núcleo.

[00028] Imunização com apenas o núcleo TG2 removida grande parte da estrutura terciária da enzima (em especial os dois domínios do terminal carboxilo beta barril). É possível que alguns dos epítopos que pode ser inferior, talvez, disponível ou imunogénico dentro de um comprimento completo TG2 molécula nativa podem ser epítopos mais atraentes com o núcleo no formato aqui descrito.

Os anticorpos aqui descritos reconhecem epítopos lineares (isto é, ligados a TG2 num gel de SDS PAGE a redução), enquanto que 80% dos anticorpos isolados que anteriormente usando TG2 comprimento completo como imunogénio foram: conformação dependentes. Fomos capazes de demonstrar que o domínio do núcleo recombinante reteve a atividade da enzima, e assim o isolamento de anticorpos inibitórios foi provavelmente ajudado pela exposição de epítopos menos favoráveis anteriormente localizados em ou perto do local ativo. É interessante e surpreendente que os anticorpos inibitórios para TG2 humano foram criados através da imunização com o núcleo dado que a proteína recombinante de núcleo podem não mostrar as mesmas características de dobragem como a proteína de comprimento completo.

[00029] O núcleo catalítico TG é altamente conservada entre os membros da família TG e entre espécies. Isto sugere que o desenvolvimento de inibidores de moléculas pequenas não só específicas, mas também de inibidores à base de anticorpos pode ser tecnicamente exigente. No entanto, a presente divulgação fornece anticorpos que são altamente seletivos. Que isto seja possível pode refletir o facto de que existem algumas regiões dentro do domínio catalítico TG2 onde existe alguma heterogeneidade. Os presentes anticorpos podem, por conseguinte, explorar estas pequenas diferenças. A seletividade surpreendente dos presentes anticorpos pode permitir o desenvolvimento de agentes terapêuticos que podem interferir com a atividade eficiente TG2 e, assim, proporcionar terapias potencialmente eficazes para as condições exacerbadas ou causadas por atividade por TG2 onde não existe atualmente uma opção terapêutica satisfatória.

[00030] A título de comparação, os anticorpos descritos no documento WO 2006/100679, que foram produzidos por tecnologia recombinante a partir de amostras de três pacientes adultos com doença celíaca com anti-TG2 títulos de anticorpos elevados, provou ser de baixa eficácia, quando testado pelos presentes inventores (Exemplo 2). Os anticorpos da presente invenção eram muito superiores aos de WO 2006/100679, em termos de seletividade para TG2 e em termos de

atividade inibidora. Por exemplo, os presentes inventores geraram um fragmento Fab do anticorpo do documento WO 2006/100679, o qual foi aplicado na mesma concentração em ensaios de inibição de TG2 como os anticorpos da presente invenção. A quantidade fragmento Fab nos testes foi duas vezes molar de sábio que os anticorpos da presente invenção, mas que ainda não conseguiram demonstrar qualquer inibição da atividade de TG2. Quando o comprimento total WO 2006/100679 anticorpo foi testado quanto à inibição no nosso ensaio de incorporação de putrescina padrão não foi encontrada nenhuma inibição da atividade TG2. Assim, os métodos da presente invenção e os anticorpos produzidos por estes métodos são superiores aos anteriormente descritos.
Por "anticorpo", incluímos moléculas de anticorpo substancialmente intactas, bem como anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos (em que pelo menos um aminoácido é mutado em relação aos anticorpos humanos de ocorrência natural), anticorpos de cadeia simples, anticorpos bi-específicos, anticorpos cadeias pesadas, cadeias leves de anticorpos, homodímeros e heterodímeros de anticorpos cadeias pesadas e / ou leves, e fragmentos de antígenode ligação e seus derivados do mesmo. Nós também incluímos variantes, fusões e derivados dos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo dentro do significado dos termos "anticorpo" e "fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos".

[00031] O termo "anticorpo" também inclui todas as classes de anticorpos, incluindo IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Assim, o anticorpo pode ser uma molécula de IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4 molécula. Preferencialmente, o anticorpo da invenção é uma molécula de IgG, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno , ou variante, fusão ou derivado. Mais preferencialmente, o anticorpo é uma molécula de IgG2.

[00032] Os anticorpos, composições, utilizações e métodos da invenção englobam variantes, fusões e derivados dos anticorpos definidos e fragmentos de ligação de antígeno , bem como fusões de um referidas variantes ou derivados,

desde que tais variantes, derivados e fusões de ter especificidade de ligação para TG2.

[00033] Tal como anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno compreender um ou mais componente polipeptídeo, variantes, derivados e fusões de anticorpo e o seu fragmento de ligação ao antígeno como aqui definido, pode ser feita utilizando os métodos de engenharia de proteínas e mutagénese dirigida a um local bem conhecidas na arte usando os polinucleotídeo s recombinantes (ver exemplo, ver Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3ª edição, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, que é aqui incorporado por referência).

[00034] Assim, variantes, derivados e fusões de o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenocomo aqui definido, pode ser feita com base no componente de polipéptido do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno.

[00035] Por "fusão" que incluem o referido polipéptido fundido com qualquer outro polipéptido. Por exemplo, o referido polipeptídeo pode ser fundido com um polipéptido, tais como glutationa-S-transferase (GST) ou proteína A, a fim de facilitar a purificação do referido polipeptídeo. Exemplos de tais fusões são bem conhecidos dos peritos na arte. Do mesmo modo, o referido polipeptídeo pode ser fundido a um tag de oligo-histidina como His6 ou a um epítopo reconhecido por um anticorpo, tal como o bem conhecido epítopo Myc-tag. As fusões para qualquer variante ou derivado do referido polipéptido também estão incluídos no âmbito da invenção. Será apreciado que as fusões (ou variantes ou derivados) que retêm as propriedades desejáveis, tais como ter especificidade de ligação para TG2, são os preferidos.

[00036] A fusão pode compreender ou consistir de uma porção adicional que confere uma característica desejável sobre o referido polipéptido; por exemplo, a porção pode ser útil na detecção ou isolamento do polipéptido, ou promover a absorção celular do polipéptido. A parte pode ser, por exemplo, uma porção de biotina, um radical radioativo, um grupo fluorescente, por exemplo uma pequena

fluoróforo ou um fluoróforo verde proteína fluorescente (GFP), como bem conhecido dos peritos na arte. O radical pode ser um tag imunogénica, por exemplo, um Myc-tag, como é conhecido dos peritos na arte ou pode ser uma molécula lipofílica ou domínio de polipéptido que é capaz de promover a absorção celular do polipeptídeo, como é conhecido dos peritos na art.

[00037] Por "variantes" do referido polipeptídeo nos referimos a um polipéptido, em que em uma ou mais posições houve inserções de amino ácido, deleções e / ou substituições, conservativas ou não conservativas, desde que essas modificações resultam em uma proteína cujas propriedades básicas, por exemplo, propriedades de ligação, estabilidade térmica, a atividade em um determinado alcance pH (pH-estabilidade) significativamente não foram alteradas. "Significativamente" neste contexto significa que um perito na arte seria dizer que as propriedades da variante ainda pode ser diferente, mas não seria óbvia sobre os da proteína original. Assim, incluímos variantes do polipéptido onde tais alterações não alteram substancialmente a atividade do referido polipéptido. Em particular, incluímos variantes do polipéptido onde tais alterações não alteram substancialmente a especificidade de ligação para TG2.

[00038] Por "substituições conservativas" destina-se combinações tais como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; e Phe, Tyr.

[00039] Tais variantes podem ser feitas utilizando os métodos de engenharia de proteínas e mutagénese dirigida ao local.

[00040] A variante de polipéptido pode ter uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 75% de identidade com uma ou mais das sequências de aminoácidos aqui apresentadas, por exemplo, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade com uma ou mais das sequências de aminoácidos aqui especificados.

A percentagem de identidade de sequência entre dois polipéptidos pode ser determinada utilizando programas de computador adequados, por exemplo o

programa GAP do University of Wisconsin Genetic Computing Group e faz-se observar que a percentagem de identidade é calculada em relação a polipéptidos cujas sequências foram alinhadas de forma ótima.

[00041] O alinhamento pode, alternativamente, ser levada a cabo utilizando o programa Clustal W (como descrito em Thompson et ai, 1994, Nucl Acid Res 22:... 4673-4680, que é aqui incorporado por referência).

[00042] Os parâmetros utilizados podem ser como se segue:

[00043] Rápido parâmetros de alinhamento de pares: K-tupla (palavra) tamanho; 1, o tamanho da janela; 5, pena de lacuna; 3, número superior de diagonais; 5.

[00044] Método de classificação: x por cento.

[00045] Vários parâmetros de alinhamento: gap pena aberta; 10, lacuna extensão pena;

[00046] 0,05.

Pontuação matriz: BLOSUM.

[00047] Alternativamente, o programa BESTFIT pode ser utilizado para determinar alinhamentos de sequências locais.

[00048] O anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno variante, ou derivado de fusão utilizado nos métodos ou utilizações da presente invenção pode compreender ou consistir de um ou mais aminoácidos que tenham sido modificados ou derivatizados.

[00049] Os derivados químicos de um ou mais aminoácidos pode ser conseguida por reação com um grupo lateral funcional. Tais moléculas derivatizadas incluem, por exemplo, aquelas moléculas nas quais os grupos amino livres foram derivatizados para formar cloridratos de amina, grupos p-tolueno sulfonilo, grupos carboxybenzoxy, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo ou grupos formilo. Os grupos carboxilo livres podem ser derivados para formar sais, ésteres metílicos e etílicos ou outros tipos de ésteres e hidrazidas. Os grupos hidroxilo livres podem ser derivados para formar S-acilo ou O-alquilo. Também

estão incluídos como derivados químicos estão os péptidos que contêm derivados de aminoácidos dos vinte aminoácidos padrão que ocorrem naturalmente. Por exemplo: 4-hidroxiprolina pode ser substituída por prolina; 5-hidroxilisina pode ser substituída por lisina; 3-metil-histidina pode ser substituída por histidina; homoserina pode ser substituída por serina e a ornitina para a lisina. Os derivados também incluem péptidos contendo uma ou mais adições ou deleções, desde que a atividade requerida seja mantida. Outras modificações estão incluídas amidação, acilação do terminal amino (por exemplo, acetilação, ou amidação de ácido tioglicólico), carboxylamidation terminal (por exemplo, com amónia ou metilamina), e como as modificações do terminal.

[00050] Será ainda apreciado por pessoas peritas na arte que os compostos peptidomiméticos podem também ser úteis. Assim, por "polipéptido" nós peptidomiméticos incluem compostos que são capazes de se ligar a um epítopo dentro da região do núcleo TG2. O termo "peptidomimético" refere-se a um composto que imita a conformação e as características desejáveis de um péptido particular como um agente terapêutico.

[00051] Por exemplo, o referido polipeptídeo inclui não apenas moléculas nas quais os resíduos de aminoácidos estão ligados por péptido (-CO-NH-) mas também moléculas nas quais a ligação peptídica é invertida. Tais peptidomiméticos retro-inversos podem ser feitas utilizando métodos conhecidos na arte, por exemplo tais como os descritos em Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, que é aqui incorporada por referência. Esta abordagem envolve a criação de pseudo-péptidos contendo alterações que envolvem o esqueleto e não a orientação das cadeias laterais. Peptídeos retro-inverso, que contêm ligações NH-CO em vez de CO-NH ligações peptídicas, são muito mais resistentes à proteólise.

[00052] Alternativamente, o referido polipeptídeo pode ser um composto peptidomimético que um ou mais dos resíduos de aminoácidos estão ligados por um i(CH_2NH) - ligação em lugar da ligação amida convencional.

[00053] Em uma outra alternativa, a ligação peptídica pode ser completamente dispensada desde que uma porção ligante adequado que retém o espaçamento entre os átomos de carbono dos resíduos de aminoácido é utilizada; pode ser vantajoso para a porção ligante que tem substancialmente a mesma distribuição de carga e substancialmente a mesma planaridade de uma ligação peptídica.

[00054] Será apreciado que o referido polipéptido pode ser convenientemente bloqueado na sua N- ou C-terminal de modo a ajudar a reduzir a susceptibilidade a digestão exo-proteolitica.

[00055] Uma variedade de ácidos aminados ou modificados codificados por un tais como ácidos e ácidos aminados N-metil-D-aminoácido também têm sido utilizados para modificar os péptidos de mamífero. Além disso, uma conformação bioativa presume pode ser estabilizado por uma modificação covalente, tal como a ciclização ou por incorporação de lactama ou outros tipos de pontes, por exemplo, ver Veber et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 75: 2636 e Thursell et ai, 1983, Biochem.. Biophys. Res. Comm. 111: 166, que são aqui incorporados por referência.

[00056] Um tema comum entre muitas das estratégias sintéticas tem sido a introdução de uma certa porção cíclica num quadro com base em peptídeos. A porção cíclica restringe o espaço conformacional da estrutura do péptido e isto resulta frequentemente num aumento da especificidade do péptido para um receptor biológico específico. Em uma outra vantagem desta estratégia é que a introdução de uma porção cíclica num péptido pode também resultar no péptido possuindo uma sensibilidade diminuída à peptidases celulares.

[00057] Assim, os polipéptidos exemplares úteis nos métodos e utilizações da invenção compreendem ou consistem em aminoácidos cisteína terminais. Um referido polipéptido pode existir numa forma cíclica heterodetic por formação de ligação dissulfeto dos grupos Mercaptide nos aminoácidos cisteína terminais ou numa forma homodetic por formação de amida ligação peptídica entre os

aminoácidos terminais. Como indicado acima, a ciclização de péptidos pequenos, através de dissulfeto ou amida ligações entre as cisteínas N- e C-terminal pode contornar problemas de especificidade e de meia-vida em algum momento observada com péptidos lineares, por proteólise e diminuindo também a aumentar a rigidez da estrutura, o que pode dar origem a compostos de especificidade mais elevadas. Polipéptidos ciclizados através de ligações dissulfeto têm grupos livres amino e carboxi-terminais, que ainda pode ser susceptível a degradação proteolítica, enquanto os péptidos ciclizados através da formação de uma ligação amida entre a amina N-terminal e carboxilo C-terminal e, por conseguinte, já não contêm grupos livres amino ou carboxi Termini. Assim, os péptidos podem estar ligados por uma ligação CN ou uma ligação dissulfeto.

[00058] A presente invenção não se limita de modo algum pelo método de ciclização de péptidos, mas abrange péptidos cuja estrutura cíclica pode ser conseguida por qualquer método apropriado de síntese. Assim, as ligações heterodetic podem incluir, mas não se limitam a formação de dissulfeto através, alquileno ou pontes de sulfureto. Os métodos de síntese de péptidos e os péptidos cíclicos homodetic heterodetic cíclicos, incluindo dissulfeto, e sulfureto de pontes de alquileno, são revelados em US 5.643.872, que é aqui incorporada por referência. Outros exemplos de métodos de ciclização são discutidos e divulgados no documento US 6008058, o qual é incorporado por referência.

[00059] Em uma outra abordagem para a síntese de compostos peptidomiméticos estabilizadas cíclicos é metátese de fecho de anel (RCM). Este método envolve os passos de sintetizar um péptido precursor e contactando-a com um catalisador de RCM para dar um péptido conformacionalmente restrito.

[00060] Precursores peptídicos adequados podem conter duas ou mais ligações CC insaturadas. O método pode ser realizado utilizando técnicas de fase sólida-péptido-síntese.

[00061] Nesta forma de realização, o precursor, que é ancorado a um suporte sólido, é colocado em contacto com um catalisador de RCM e o produto é, então,

clivado a partir do suporte sólido para produzir um péptido conformacionalmente restrito.

[00062] Outra abordagem, divulgado por DH Rico em Inibidores da Protease, Barrett e Selveson, eds., Elsevier (1986), que é aqui incorporada por referência, tem sido a concepção péptido imita através da aplicação do conceito de análogo do estado de transição na concepção de inibidores da enzima. Por exemplo, sabe-se que o álcool secundário de staline mimetiza o estado de transição tetraédrico da ligação amida cindivel do substrato pepsina.

[00063] Em resumo, as modificações terminais são úteis, tal como é bem conhecido, para reduzir a susceptibilidade por digestão com proteinase e, por conseguinte, para prolongar a meia-vida dos péptidos em soluções, particularmente fluidos biológicos em que possam estar presentes proteases.

[00064] Polipéptido ciclização é também uma modificação útil devido às estruturas estáveis formadas por ciclização e com vista às atividades biológicas observadas para péptidos cíclicos.

[00065] Assim, numa forma de realização o referido polipéptido é cíclico. No entanto, numa concretização alternativa, o referido polipeptídeo é linear.

[00066] Por "liga-se seletivamente a um epítopo dentro da região de núcleo de TG2"

[00067] queremos dizer um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que é capaz de se ligar a um epítopo na região central do TG2 seletivamente. Por "capaz de se ligar seletivamente" incluímos tais porções de ligação derivados de anticorpos que se ligam pelo menos 10 vezes mais fortemente ao núcleo TG2 do que a outras proteínas; por exemplo, pelo menos, 50 vezes mais forte, ou pelo menos 100 vezes mais fortemente. A porção de ligação pode ser capaz de se ligar seletivamente a um epítopo no núcleo TG2 sob condições fisiológicas, por exemplo, in vivo.

[00068] Tal especificidade de ligação pode ser determinada por métodos bem conhecidos na arte, tais como ligada ensaio imunoenzimático (ELISA), imuno-histoquímica, imunoprecipitação, western blot e citometria de fluxo utilizando

células transfectadas que expressam TG2 ou o núcleo TG2, ou um seu fragmento. Os métodos adequados para medir forças de ligação relativas incluem imunoensaios, por exemplo, onde a porção de ligação é um anticorpo (ver Harlow e Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Habor Laboratory Press, Nova Iorque, que é aqui incorporado por referência). Como alternativa, a ligação pode ser avaliada por meio de ensaios competitivos ou usando BIAcore® análise (Biacore International AB, Suécia).

[00069] É preferível que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da invenção liga-se exclusivamente ao TG2.

[00070] Será apreciado por pessoas peritas na arte que a especificidade de ligação de um anticorpo ou seu fragmento de ligação do antígeno é conferida pela presença de regiões determinantes de complementaridade (CDR) no interior das regiões variáveis das cadeias pesadas e leves constituintes. Como discutido a seguir, numa forma de realização particularmente preferida dos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno é aqui definido, a especificidade de ligação para TG2 é conferida pela presença de uma ou mais das CDR identificadas. Por exemplo, sequências que podem compreender ou consistem das sequências de CDR de AB-1 de VL e VH incluem KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISVGGGKTYYPDSVKG, e LISLY. Em um outro exemplo, as sequências que podem compreender ou consistem das sequências de CDR de BB-7 VL e VH incluem KASQDINSYLT, LTNRLMD, LQYVDFPYT, SSAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG, e lispy. As sequências que podem compreender ou consistir as sequências de CDR de CC-1 de VL e VH incluem KASQDINSYLT, LVNRLVD, LQYDDFPYT, Thams, TISSGGRSTYYPDSVKG, e Listy. Prefere-se que os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno aqui definidos compreendem ou consistem em sequências de CDR ou sequências de CDR e flanqueando, tal como definido na Tabela 24A. É mais preferido que os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno aqui definidos compreendem ou consistem das sequências de CDR ou sequências de CDR e flanqueando, do anticorpo

exemplar AB-1, ou BB-7, ou CC-1 (tal como definido, por exemplo, na Tabela 24A). É preferível que o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno retém a especificidade de ligação para TG2 do anticorpo original. Por "retém a especificidade de ligação" queremos dizer que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno , é capaz de competir para a ligação a TG2 com os anticorpos exemplificativos da invenção, por exemplo, AB-1, AG-1, AG-9, AH 1, HA-3, 7-BB, CC-1, EH-6, JE-12, AI-12, DF-4, DH-2, DD-6 e / ou DD-9 (veja-se Exemplos que acompanham). Por exemplo, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno podem ligar-se ao mesmo epítopo em TG2 como um anticorpo que compreende as seguintes sequências: KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISVGGGKTYYPDSVKG, e LISLY.

[00071] Por "epítopo" entende-se aqui e destina-se para significar um local de uma molécula à qual um anticorpo se liga, ou seja, uma região molecular de um antígeno . Um epítopo pode ser um epítopo linear, o que é determinado por, por exemplo, a sequência de aminoácidos, ou seja, a estrutura primária, ou um epítopo tridimensional, definido pela estrutura secundária, por ex dobragem de uma cadeia peptídica em folha beta ou alfa helicoidal, ou por a estrutura terciária, por exemplo, maneira que hélices ou folhas são dobradas ou dispostos de modo a dar uma estrutura tridimensional, de um antígeno .

[00072] Métodos para determinar se um anticorpo de teste é capaz de competir para a ligação com o segundo anticorpo são bem conhecidos na arte (tal como, por exemplo, ELISA-sanduíche ou técnicas reversa de ELISA-sanduíche) e descrita, por exemplo, em Antibodies: A Laboratory manual, Harlow & Lane (1988, CSHL, Nova Iorque, ISBN 0-87969-314-2), que é aqui incorporada por referência. O anticorpo ou seu fragmento, com especificidade de ligação para um epítopo na região central do TG2 também pode reter uma ou mais das mesmas propriedades biológicas como o anticorpo original (tais como os anticorpos exemplares fornecidos nos Exemplos) de ligação ao antígeno.

[00073] Como explicado acima, TG2 é uma proteína multi-funcional dependente do cálcio, que catalisa a formação de Nε- (γ glutamil) lisina isopeptídicas ligações entre os resíduos de lisina e glutamina. TG2 compreende um domínio N terminal de beta sanduíche que contém sítios de ligação (por exemplo, fibronectina) e sequências necessárias para a exportação da enzima.

[00074] Esta ligação aponta para o domínio do núcleo catalítico. Central para o domínio é uma tríade catalítica constituída por Cys 277, Asp 358, e seu 355, além de diversos locais putativos de ligação de cálcio. Este link aponta para o terceiro domínio, tambor beta 1, onde um localde ligação GTP reside na transmissão de uma enzima com a atividade GTPase. Barril Beta 1 também contém um local de ligação de integrina utilizados na adesão celular. Beta tambor 1, juntamente com o quarto domínio TG2, barril beta 2, estão envolvidos na mudança conformacional na TG2 necessária para a sua ativação. Em uma alta de cálcio, ambiente de baixa GTP Barrel 1 e 2 balanço para baixo da forma inativa fechado e dobrado para transmitir TG2 com uma estrutura linear de abertura permitindo a ativação do núcleo catalítico (Pinkas et al (2007) PLoS Biol. Transglutaminase 2 sofre uma grande alteração conformacional após ativação 5 (12):. E327).

[00075] Por "a região de núcleo do tipo de transglutaminase 2 (TG2)" que incluem uma região de TG2 compreendendo a tríade catalítica descrita acima, excluindo o domínio sanduíche beta e barris beta 1 e 2. De preferência, a região do núcleo compreende ou consiste nos aminoácidos 143 a 473 de TG2 humano, ou um seu fragmento.

[00076] Os aminoácidos 143-473 da TG2 humano consistem no seguinte seqüência:

CPADAVYLDSEEERQEYVLTQQGFIYQGSAKFIKNIPWNFGQFEDGILDICLILLDV
NPKFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVVSGMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDGVS
PMSWIGSVDILRRWKNHGCQRVKYGQCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTNYNS
AHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQGDKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQ
ALDPTPQEKSEGTYCCGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIQQDD

GSVHKSINRSLIVGLKISTKSVGRDEREDITHTYKYPEGSSEEREAFTRANHLNKL AEKEETGM

[00077] Assim, numa forma de realização da invenção, a região do núcleo pode consistir em aminoácidos 143-473 de TG2 humano. Nesta concretização, o epítopo do anticorpo da invenção pode, assim, ser qualquer epítopo dentro da região definida pelos aminoácidos 143-473 de TG2 humano. Assim, o epítopo pode ser um fragmento desta sequência ou pode ser constituída por vários resíduos de aminoácidos dentro deste fragmento que não podem ser adjacentes um ao outro na estrutura de aminoácidos primária, mas localizam uns com os outros no secundário, terciário ou mesmo estrutura quaternária da proteína, tal como seria entendido por uma pessoa com conhecimentos no estado da técnica.

[00078] Em uma forma de realização da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno podem ligar-se seletivamente no todo ou em parte a uma região que compreende os aminoácidos 304-326 de TG2 humano. Esta região (aminoácidos 304-326 de TG2 humana) é referido como Grupo 1 na Figura 5 e compreende a sequência de aminoácidos AHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQGD.

[00079] Numa outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno podem ligar-se seletivamente no todo ou em parte a uma região que compreende os aminoácidos 351-365 de TG2 humano. Esta região (aminoácidos 351-365 de TG2 humana) é referido como Grupo 2 na Figura 5 e compreende a sequência de aminoácidos YEGWQALDPTPQEKS.

[00080] Numa ainda outra forma de realização da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno podem ligar-se seletivamente no todo ou em parte a uma região que compreende os aminoácidos 450-467 de TG2 humano. Esta região (aminoácidos 450-467 de TG2 humana) é referido como Grupo 3 na Figura 5 e compreende a sequência de aminoácidos SEEREAFTRANHLNKLAE.

[00081] Numa forma de realização preferida de qualquer aspecto da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno inibe a atividade dos mesmos TG2, por exemplo, atividade TG2 humano.

[00082] Em uma forma de realização da invenção, o anticorpo ou seu fragmento pode compreender uma ou mais das seguintes sequências de aminoácidos de ligação ao antígeno :
KASQDINSYLT; e/ou
RTNRLFD; e/ou
LQYDDFPYT; e/ou
SSAMS; e/ou
TISVGGGKTYYPDSVKG; e/ou
LISLY.

[00083] O anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da invenção pode compreender uma ou mais das seguintes sequências de aminoácidos:
TCKASQDINSYLTWF; e/ou
TLIYRTNRLFDGVP ou TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; e/ou
YCLQYDDFPYTFG; e/ou
FTLSSSAMSWVR ou CXAXXFTLSSSAMSWVR; e/ou
WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR ou
WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRXNXXXXL; e/ou
YCAKLISLYWG, onde X é qualquer amino ácido.

[00084] As sequências das formas de realização imediatamente anteriores são consideradas por compreenderem regiões determinantes da complementaridade das regiões variáveis pesada do anticorpo exemplar AB-1 e luz (ver Exemplo 1) e certas variantes humanizadas do anticorpo especificados AB-1. Numa outra concretização, o anticorpo pode compreender a sequência de aminoácidos
KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXFXXXXXX
XXXXXXXXXXLQYDDFPYT; ou
KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXF; ou
RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXF; ou FXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT, onde X é qualquer amino ácido.

[00085] Numa outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode compreender a sequência de aminoácidos
TCKASQDINSYLTWF ou TCKASQDINSYLTWY; e/ou
LLIYRTNRLFDGVP ou SLIYRTNRLFDGVP ou
LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF ou
SLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; e/ou
YCLQYDDFPYTFG; e/ou
FTFSSSAMSWVR ou CXAXXFTFSSSAMSWVR; e/ou
WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR ou
WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRXNXXXXL; e/ou
YCAKLISLYWG, onde X é qualquer amino ácido.

[00086] Assim, numa forma de realização, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo as seguintes sequências de ligação ao antígeno:
KASQDINSYLT; e RTNRLFD; e LQYDDFPYT.

[00087] Em uma outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo as seguintes sequências de ligação ao antígeno :
SSAMS; e TISVGGGKTYYPDSVKG; e LISLY.

[00088] Em uma forma de realização da invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno.
DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK ou
DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEI
K.

[00089] Estas regiões variáveis de cadeia leve de correspondência com a encontrada no anticorpo exemplar AB-1 (Figuras 7 e 18).

[00090] Alternativamente, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno :
EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFD GVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK (AB-1_VK) ou
DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK (AB-1_VK1).
Numa forma de realização particularmente preferida, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno:
EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFD GVPSRFSGSGSGTDFFFTISSLQPEDFGTYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK (hAB-1_RKE); ou
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLF DGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK (hAB-1_RKJ).
[00091] Essas sequências são variantes dos AB-1 humanizados Sequências de Cadeia Leve descritas acima.
[00092] Em uma forma de realização da invenção, o anticorpo ou fragmento fazer mesmo pode ter uma região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoacidos de ligação ao antígeno.
EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQG TTLTVSS ou
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQG TTLTVSS.

[00093] Estas regiões variáveis da cadeia pesada correspondem com a encontrada no anticorpo exemplar AB-1 (Figuras 7 e 18).

[00094] Alternativamente, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno:

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQG TTLTVSS (AB-1_VH).

[00095] Em uma outra forma de realização particularmente preferida, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno :

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVSTISV GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISLYWGQG TLVTVSS (hAB-1_RHA).

[00096] Esta sequência é uma variante humanizado da AB-1 sequência de cadeia pesada descrita acima.

[00097] Assim, prevê-se que numa forma de realização, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ter:

i) pelo menos uma cadeia leve da região variável compreendendo a sequência de aminoácidos

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK ou DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK, ou EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFD GVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK (AB-1_VK), ou

DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK (AB-1_VK1), ou
EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFD
GVPSRFSGSGSGTDFFFTISSLQPEDFGTYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK (hAB-1_RKE), ou
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK (hAB-1_RKJ); e

ii) região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos
EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQG
TTLTVSS ou
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQG
TTLTVSS, ou
EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQG
TTLTVSS (AB-1_VH), ou
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVSTISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISLYWGQG
TLVTVSS (hAB-1_RHA).

[00098] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou seu fragmento pode compreender uma ou mais das seguintes sequências de aminoácidos de ligação ao antígeno :

KASQDINSYLT; e/ou
LTNRLMD; e/ou
LQYVDFPYT; e/ou

SSAMS; e/ou
TISSGGRSTYYPDSVKG; e/ou
LISPY.

[00099] As sequências da forma de realização imediatamente anterior são considerados compreendem regiões determinantes da complementaridade das regiões variáveis leve de e pesada do anticorpo exemplar BB-7 (ver Figura 19). Numa outra concretização, o anticorpo pode compreender a sequência de aminoácidos
KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXLTNRLMDXXXXXXXXXXXXXXXFXXXXXXX
XXXXXXXXXXLQYVDFPYT; ou
KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXF; ou
LTNRLMDXXXXXXXXXXXXXXF; ou FXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYVDFPYT,

[000100] em que X é qualquer aminoácido.

[000101] Assim, numa forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo as seguintes sequências de ligação ao antígeno :
KASQDINSYLT; e LTNRLMD; e LQYVDFPYT.

[000102] Numa outra forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo as seguintes sequências de ligação ao antígeno :
SSAMS; e TISSGGRSTYYPDSVKG; e LISPY.

[000103] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno
AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMD
GVPSRFSGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGTKLEIK

[000104] Esta região variável da cadeia leve corresponde à encontrada no anticorpo exemplar BB-7 (Figura 19).

[000105] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIIFSSSAMSWVRQTPEKRLEWVATISSG GRSTYYPDSVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDTAIYYCAKLISPYWGQGT TLTVSS.

[000106] Esta região variável da cadeia pesada corresponde à encontrada no anticorpo exemplar BB-7 (Figura 19).

[000107] Assim, prevê-se que numa forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ter:

i) pelo menos uma cadeia leve da região variável compreendendo a sequência de aminoácidos

AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMD GVPSRFSGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGTKLEIK;

e,

ii) região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIIFSSSAMSWVRQTPEKRLEWVATISSG GRSTYYPDSVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDTAIYYCAKLISPYWGQGT TLTVSS.

[000108] Ainda é previsto que em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ter:

[000109] região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLTNRLM
DGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTKVEIK ou
DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTNRLM
DGVPSRFSGSGSGQEFLLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTKVEIK;
e/ou região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVSTISS
GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQG
TLVTVSS ou
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVATISSG
GRSTYYPDSVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGT
LVTVSS.

[000110] Estas sequências correspondem às variantes humanizadas de anticorpo BB-7 (ver Quadros 23, 24 e 24A).

[000111] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou seu fragmento pode compreender uma ou mais das seguintes sequências de aminoácidos de ligação ao antígeno:
KASQDINSYLT; e/ou
LVNRLVD; e/ou
LQYDDFPYT e/ou
THAMS; e/ou
TISSGGRSTYYPDSVKG; e/ou
LISTY.

[000112] As sequências da forma de realização imediatamente anterior são considerados compreendem regiões determinantes da complementaridade das regiões variáveis pesada do anticorpo exemplar DC-1 e luz (ver Figura 20). Numa outra concretização, o anticorpo pode compreender a sequência de aminoácidos
KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXLVNRLVDXXXXXXXXXXXXXXXAXXXXXX
XXXXXXXXXXLQYDDFPYT ou

KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXA; ou LVNRLVDXXXXXXXXXXXXXXXA; ou AXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT, : KASQDINSYLT; e LVNRLVD; e em que X é qualquer aminoácido. Assim, numa forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo as seguintes sequências de ligação ao antígenoLQYDDFPYT

[000113] Numa outra forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo as seguintes sequências de ligação ao antígeno : THAMS; e TISSGGRSTYYPDSVKG; e LISTY.

[000114] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno DITMTQSPSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRLVDG VPSRFSGSGSGQDYALTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK. This região variável da cadeia leve corresponde à encontrada no anticorpo exemplar CC-1 (Figura 20).

[000115] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSTHAMSWVRQTPEKRLEWVATISS GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNVKNTLYLQLSSLRSEDTAVYFCARLISTYWGQGT TLTVSS. Esta região variável da cadeia pesada corresponde à encontrada no anticorpo exemplar CC-1 (Figura 20).

[000116] Assim, prevê-se que numa forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ter:

i) região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos DITMTQSPSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRLVDG VPSRFSGSGSGQDYALTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK; e

ii) região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSTHAMSWVRQTPEKRLEWVATISS GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNVKNTLYLQLSSLRSEDTAVYFCARLISTYWGQGT TLTVS.

[000117] Prevê-se ainda que, em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ter:

[000118] i)região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLVNRLV DGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK ou DITMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILIYLVNRLVD GVPSRFSGSGSGQDYALTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK; e/ou

ii) região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHAMSWVRQAPGKGLEWVSTISS GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISTYWGQG TLVTVSS ou EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMSWVRQAPGKGLEWVATISS GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLISTYWGQG TLVTVSS. Essas seqüências correspondem com as variantes humanizadas de DC-1 fornecidos nas Tabelas 23, 24 e 24A.

[000119] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou seu fragmento pode compreender uma ou mais das seguintes sequências de aminoácidos de ligação ao antígeno :

KASQDINSYLT; e/ou
XXNRLXD; e/ou
LQYXDFPYT; e/ou
XXAMS; e/ou
TISXGGXXTYYPDSVKG; e/ou
LISXY, em que X é qualquer aminoácido.

[000120] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou seu fragmento pode compreender uma ou mais das seguintes sequências de aminoácidos de ligação ao antígeno :
(K/Q/R)ASQ(D/G)I(N/S/R)(S/N)YL(T/N/A); e/ou
(R/L/V/D/A)(T/V/A)(N/S)(R/N)L(F/M/V/E/Q)(D/T/S); e/ou
(L/Q)Q(Y/H)(D/V/N)(D/T)(F/Y)P(Y/L/W)T; e/ou
(S/T)(S/H/Y)AMS; e/ou
(T/A)IS(V/S/G)(G/S)G(G/R)(K/S)TYY(P/A)DSVKG; e/ou
(L/D)(I/G)(S/G)(L/P/T/V)Y.

[000121] Numa outra forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno .
QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVDYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAS
GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK.
This light chain variable region corresponds with that found in exemplary antibody DD-9 (Figure 25).

[000122] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno .
QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIY
WDDDKRYNPSLKSRITISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFW

GQGTLVTVSA. Esta região variável da cadeia pesada corresponde à encontrada no anticorpo exemplar DD-9 (Figura 25).

[000123] Assim, prevê-se que numa forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ter:

[000124] i)pelo menos uma cadeia leve da região variável compreendendo a sequência de aminoácidos

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVDYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAS GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK; e

ii)pelo menos uma cadeia pesada da região variável compreendendo a sequência de aminoácidos

QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIY WDDDKRYNPSLKSRITISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFW GQGTLVTVSA.

[000125] Numa outra forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno .

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAS GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK.

Esta região variável da cadeia leve corresponde à encontrada no anticorpo exemplar DH-2 (Figura 26).

[000126] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de ligação ao antígeno:

QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIY WDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYW GQGTLVTVSA. Esta região variável da cadeia pesada corresponde à encontrada no anticorpo exemplar DH-2 (Figura 26).

[000127] Assim, prevê-se que numa forma de realização de qualquer aspecto da presente invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ter:

i) pelo menos uma cadeia leve da região variável compreendendo a sequência de aminoácidos QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAS GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK; e

ii) região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIY WDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYW GQGTLVTVSA.

[000128] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da invenção, é previsto que, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ter:

i) pelo menos uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos correspondente com qualquer uma das sequências VK fornecidos em qualquer das Figuras 18 a 28; e/ou

ii) a região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos correspondente com qualquer uma das sequências de VH fornecidos em qualquer das Figuras 18 a 28 ou um fragmento, variante ou derivado destes.

[000129] Como indicado acima, prevê-se que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno das concretizações anteriores pode compreender uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 75% de identidade com uma ou mais das sequências de aminoácidos acima indicadas, por exemplo, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade com uma ou mais das sequências de aminoácidos acima especificados. Prevê-se igualmente que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode compreender até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

ou mais inserções, exclusões, substituições conservadoras e / ou substituições não conservativas .

[000130] Num segundo aspecto, a invenção proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno , compreendendo uma ou mais das seguintes sequências de aminoácidos:

KASQDINSYLT; e/ou

XXNRLXD; e/ou

LQYXDFPYT; e/ou

XXAMS; e/ou

TISXGGXXTYYPDSVKG; e/ou

LISXY, onde X é qualquer amino ácido

[000131] Numa forma de realização, a invenção proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno , compreendendo uma ou mais das seguintes sequências de aminoácidos:

(K/Q/R)ASQ(D/G)I(N/S/R)(S/N)YL(T/N/A); e/ou

(R/L/V/D/A)(T/V/A)(N/S)(R/N)L(F/M/V/E/Q)(D/T/S); e/ou

(L/Q)Q(Y/H)(D/V/N)(D/T)(F/Y)P(Y/L/W)T; e/ou

(S/T)(S/H/Y)AMS; e/ou

(T/A)IS(V/S/G)(G/S)G(G/R)(K/S)TYY(P/A)DSVKG; e/ou

(L/D)(I/G)(S/G)(L/P/T/V)Y.

[000132] Numa forma de realização, a invenção proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno , compreendendo uma ou mais das seguintes sequências de aminoácidos:

KASQDINSYLT; e/ou

RTNRLFD; e/ou

LQYDDFPYT; e/ou

SSAMS; e/ou

TISVGGGKTYYPDSVKG; e/ou

LISLY.

[000133] Numa forma de realização, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do segundo aspecto pode compreender uma ou mais das seguintes sequências de aminoácidos:
TCKASQDINSYLTWF; e/ou
TLIYRTNRLFDGVP ou TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; e/ou
YCLQYDDFPYTFG; e/ou
FTLSSSAMSWVR ou CXAXXFTLSSSAMSWVR; e/ou
WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR ou
WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRXNXXXXL; e/ou
YCAKLISLYWG, wherein X is any amino acid.
[000134] As sequências da forma de realização anterior são considerados compreendem regiões determinantes da complementaridade das regiões variáveis pesada do anticorpo exemplificado AB-1 e luz.
[000135] Numa outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode compreender a sequência de aminoácidos
KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXFXXXXXX
XXXXXXXXXXLQYDDFPYT; ou
KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXF; ou
RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXF; ou FXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT,
[000136] onde X é qualquer amino ácido.
[000137] Numa outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode compreender a sequência de aminoácidos TCKASQDINSYLTWF ou
TCKASQDINSYLTWY; e/ou
LLIYRTNRLFDGVP ou SLIYRTNRLFDGVP ou
LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF ou
SLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; e/ou
YCLQYDDFPYTFG; e/ou
FTFSSSAMSWVR ou CXAXXFTFSSSAMSWVR; e/ou

WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR ou
WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRXNXXXXL; e/ou
YCAKLISLYWG, onde X é qualquer amino ácido.

[000138] Assim, numa forma de realização, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia leve compreendendo as seguintes CDR de ligação ao antígeno:
KASQDINSYLT; e RTNRLFD; e LQYDDFPYT.

[000139] Numa outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento do mesmo pode ter a região variável de pelo menos uma cadeia pesada compreendendo as seguintes CDR de ligação ao antígeno:
SSAMS; e TISVGGGKTYYPDSVKG; e LISLY.

[000140] Em uma outra forma de realização preferida da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do segundo aspecto pode ter pelo menos uma região variável de uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos:
DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK ou
DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK, ou
EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFD
GVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK (AB-1_VK), ou
DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK (AB-1_VK1), ou
EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFD
GVPSRFSGSGSGTDFFFTISSLQPEDFGTYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK (hAB-1_RKE), ou

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK
(hAB-1_RKJ).

[000141] Numa ainda outra forma de realização do segundo aspecto, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ter pelo menos a região variável de uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos
EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQG
TTLTVSS ou
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQG
TTLTVSS, ou
EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQG
TTLTVSS (AB-1_VH), ou
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVSTISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISLYWGQG
TLVTVSS (hAB-1_RHA).

[000142] A invenção também proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno possuindo pelo menos a região variável de uma cadeia leve tal como resulta do segundo aspecto da região variável e pelo menos uma cadeia pesada tal como resulta do segundo aspecto.

[000143] Para evitar dúvidas, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos do segundo aspecto pode compreender qualquer sequência de aminoácidos apresentada em relação com o primeiro aspecto. Assim, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do segundo aspecto pode incluir qualquer VK e / ou região VK como exemplificado em qualquer das Figuras 18 a 28 ou Tabelas 14 a 24 e 24A, ou qualquer variante, fragmento ou derivado.

[000144] Além disso, o anticorpo de ligação ao antígenoou seu fragmento de qualquer aspecto da invenção pode ser ou compreender qualquer anticorpo humanizado ou quimérico aqui descrito, em particular, o anticorpo ou seu fragmento pode compreender ou consistir em qualquer uma das sequências proporcionadas nas Tabelas de ligação ao antígeno14 a 24 e 24A.

[000145] Prevê-se que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenoda segunda formas de realização e os aspectos relacionados pode compreender uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 75% de identidade com uma ou mais das sequências de aminoácidos acima indicadas, por exemplo, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade com uma ou mais das sequências de aminoácidos acima especificados. Prevê-se igualmente que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode compreender até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais inserções, exclusões, substituições conservadoras e / ou substituições não conservativas.

[000146] Numa forma de realização preferida de qualquer aspecto da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode compreender ou consistir de um anticorpo intacto. Alternativamente, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno podem consistir essencialmente de um anticorpo intacto. Por "consistem essencialmente em" entende-se que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenoconsiste de uma porção de um anticorpo intacto suficiente para exibir especificidade de ligação para TG2.

[000147] O anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenoda invenção pode ser um anticorpo que não ocorre naturalmente. É claro que, quando o anticorpo é um anticorpo que ocorre naturalmente, que é fornecido numa forma isolada (ou seja distinta daquela em que se encontra na natureza).

[000148] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da invenção, o anticorpo ou seu fragmento pode compreender ou consistir de um fragmento de ligação ao antígenoselecionado a partir do grupo que consiste em de ligação ao

antígeno : um fragmento Fv; um fragmento Fab; e um fragmento Fab-like. Numa outra forma de realização, o fragmento Fv pode ser um fragmento Fv de cadeia simples ou um fragmento Fv ligado por dissulfeto. Numa ainda outra forma de realização, o fragmento Fab-like pode ser um fragmento Fab 'ou um fragmento F (ab) 2 fragmento.

A variável pesado (VH) e leve variável (VL) do anticorpo estão envolvidos no reconhecimento do antígeno , um facto primeiro reconhecido por experiências de digestão da protease do início. Outra confirmação foi encontrado por "humanização" de anticorpos de roedores. Os domínios variáveis de origem em roedor podem ser fundidos com domínios constantes de origem humana de tal modo que o anticorpo resultante retém a especificidade antigénica do anticorpo parent-roedor (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 81, 6851-6855).

[000149] Em uma especificidade antigénica preferida é conferida por domínios variáveis e é independente dos domínios constantes, como é conhecido a partir de experiências envolvendo a expressão bacteriana de fragmentos de anticorpos, contendo todos, um ou mais domínios variáveis. Estas moléculas incluem moléculas semelhantes a Fab (Better et al (1988) Science 240, 1041); Moléculas Fv (Skerra et al (1988) Science 240, 1038); Fv de cadeia simples (ScFv) onde os domínios moléculas parceiros VH e VL estão ligados através de um oligopéptido flexível (Bird et al (1988) Science 242, 423;.... Huston et al (1988) Proc Natl Acad Sci EUA 85, 5879) e anticorpos de domínio único (dAb) compreendendo ou consistindo de domínios V isolados (Ward et al (1989) Nature 341, 544). Uma revisão geral das técnicas envolvidas na síntese de fragmentos de anticorpo que mantêm os seus locais de ligação específicos pode ser encontrado em Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299.

[000150] Assim, por "fragmento de ligação ao antígeno " nós incluímos um fragmento funcional de um anticorpo que é capaz de se ligar a TG2. Os fragmentos de ligação ao antígenoexemplificativos podem ser selecionados a partir do grupo que consiste em fragmentos de Fv (por exemplo, cadeia simples Fv

e Fv dissulfeto-ligado), e fragmentos semelhantes a Fab (por exemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab 'e F (ab) 2).

[000151] Numa forma de realização da invenção, o fragmento de ligação ao antígenoé um scFv.

[000152] As vantagens de utilizar fragmentos de anticorpos, em vez de anticorpos inteiros, são várias vezes. O menor tamanho dos fragmentos pode levar a propriedades farmacológicas melhoradas, tais como uma melhor penetração de tecido sólido

[000153] . Além disso, os fragmentos de ligação ao antígeno , tais como Fab, Fv, ScFv e dAb fragmentos de anticorpos podem ser expressos em, e segregados por E. coli, permitindo assim a produção fácil de grandes quantidades dos referidos fragmentos.

[000154] Também incluídos dentro do âmbito da invenção são as versões de anticorpos e fragmentos de ligação a um antígenomodificado da mesma, por exemplo, modificada pela ligação covalente de polietilenoglicol ou outro polímero adequado.

[000155] É particularmente preferido que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenoé uma molécula recombinante.

[000156] Métodos de geração de anticorpos e fragmentos de anticorpos são bem conhecidos na arte. Por exemplo, os anticorpos podem ser gerados por meio de qualquer um dos vários métodos que empregam a indução in vivo da produção de moléculas de anticorpos, o rastreio de bibliotecas de imunoglobulina (Orlandi et al, 1989. Proc Natl Acad Sci EUA 86:.... 3833-3837. .; Winter et al, 1991, Nature 349: 293-299) ou a geração de moléculas de anticorpos monoclonais por linhas de células em cultura. Estes incluem, mas não estão limitadas a, a técnica de hibridoma, a técnica de hibridoma de células B humanas, e o vírus de Epstein-Barr (EBV) -hybridoma técnica (Kohler et ai, 1975. Nature 256: 4950497; Kozbor et al.,. , J. 1985. Immunol Methods. 81: 31-42; Cote et al, 1983. Proc Natl Acad Sci EUA 80:..... 2026-2030; Cole et al, Mol Cell Biol 1984 62 : 109-120).

[000157] Convenientemente, a invenção proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno , em que o anticorpo é um anticorpo recombinante (ou seja, em que ele é produzido por meio recombinante).

[000158] Numa forma de realização particularmente preferida de qualquer aspecto da invenção, o anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal.

[000159] Os anticorpos monoclonais adequados para antígeno s selecionados podem ser preparados por técnicas conhecidas, por exemplo as divulgadas em "Monoclonal Antibodies: A Manual de técnicas", H Zola (CRC Press, 1988) e em "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques e Applications", JGR Hurrell (CRC Press, 1982), que são aqui incorporados por referência. Exemplos de anticorpos monoclonais da invenção e métodos adequados para a sua fabricação são fornecidos nos Exemplos abaixo.

[000160] Os fragmentos de anticorpos também pode ser obtida usando métodos bem conhecidos na arte (ver, por exemplo, Harlow & Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque, que é aqui incorporado por referência). Por exemplo, os fragmentos de anticorpos da presente invenção podem ser preparados por hidrólise proteolítica do anticorpo ou por expressão em E. coli ou células de mamíferos (por exemplo, cultura de células de ovário de hamster chinês ou outros sistemas de expressão de proteína) de DNA que codificam para o fragmento. Alternativamente, os fragmentos de anticorpo podem ser obtidos por digestão com pepsina ou papaína de anticorpos inteiros através de métodos convencionais.

[000161] Em uma forma de realização de qualquer aspecto da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ser um anticorpo humano ou um anticorpo humanizado.

[000162] Será apreciado por pessoas peritas na arte que, para a terapia humana ou de diagnóstico, podem ser utilizados anticorpos humanizados. Formas humanizadas de anticorpos não humanos (por exemplo murinos) são geneticamente modificadas anticorpos quiméricos ou fragmentos de anticorpos que

possuem o mínimo de porções derivadas de anticorpos não humanos. Os anticorpos humanizados incluem anticorpos em que as regiões determinantes de complementaridade de um anticorpo humano (anticorpo receptor) são substituídos por resíduos de uma região determinante de complementaridade de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, rato ou coelho, possuindo a funcionalidade desejada. Em alguns casos, resíduos de estrutura Fv do anticorpo humano são substituídos pelos correspondentes resíduos não humanos. Os anticorpos humanizados podem também compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo receptor nem na determinação de complementaridade importada ou sequências da região de enquadramento. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as regiões determinantes de complementaridade correspondem às de um anticorpo não humana e todas, ou substancialmente todos, de as regiões estruturais correspondem às de uma sequência de consenso humana relevante.

[000163] Os anticorpos monoclonais humanizados optimamente adequados também incluem pelo menos uma porção de uma região constante de anticorpo, tal como uma região Fc, tipicamente derivada de um anticorpo humano (ver, por exemplo, Jones et ai, 1986. Nature 321:. 522-525; Riechmann et ai, 1988, Nature 332:. 323-329; Presta, 1992, Curr Op Struct Biol 2: 593-596, que são aqui incorporados por referência).....

[000164] Os métodos para humanizar anticorpos não humanos são bem conhecidos na arte. Em geral, o anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos nele de uma fonte que é não humana. Estes resíduos de aminoácidos não-humanos, frequentemente referidos como resíduos importados, são tipicamente tomados de um domínio variável importado. A humanização pode ser efectuada essencialmente como descrito (ver, por exemplo, Jones et al, 1986, Nature 321:.. 522-525; Reichmann et ai, 1988. Nature 332:. 323-

327; Verhoeyen et ai, 1988, Science 239 : 1534-1536l; US 4,816,567, que são aqui incorporadas por referência) substituindo pelo humana regiões determinantes de complementaridade com as correspondentes regiões determinantes de complementaridade de roedores. Assim, tais anticorpos humanizados são anticorpos quiméricos, em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados podem ser anticorpos tipicamente humanos nos quais alguns resíduos da região determinantes de complementaridade e possivelmente alguns resíduos da estrutura são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedores.

[000165] Os anticorpos humanos também podem ser identificados utilizando várias técnicas conhecidas na arte, incluindo bibliotecas de exibição em fagos (ver, por exemplo, Hoogenboom & Winter, 1991, J. Mol Biol 227:. 381; Marks et al, 1991, J. Mol. . Biol. 222: 581; Cole et al, 1985, In: Os anticorpos monoclonais e Câncer Therapy, Alan R. Liss, pp 77; Boerner et al, 1991. J. Immunol 147:.... 86-95, Söderlind et al, 2000, Nat Biotechnol. 18: 852-6 e WO 98/32845, que são aqui incorporados por referência).

[000166] O termo "aminoácido", tal como aqui utilizado, inclui os vinte aminoácidos padrão geneticamente codificados e os seus estereoisómeros correspondentes em forma de "D" (em comparação com a forma natural "L"), omega-aminoácidos de ocorrência natural outros ácidos aminados , aminoácidos não convencionais (por exemplo, aminoácidos α dissubstituído-α, ácidos N-alquil-amino, etc.) e ácidos aminados derivatizados quimicamente.

[000167] Quando um aminoácido está a ser especificamente enumerado, tal como "alanina" ou "Ala" ou "A", o termo refere-se tanto a L-alanina e D-alanina, a menos que explicitamente indicado em contrário. Outros aminoácidos não convencionais podem também ser componentes adequadas para polipéptidos do presente invento, desde que a propriedade funcional desejada seja retida pelo polipéptido.

[000168] Para os péptidos apresentados, cada resíduo de aminoácido codificado, quando apropriado, é representado por uma designação de letra única correspondente ao nome trivial do aminoácido convencional.

[000169] Numa concretização, os polipéptidos como aqui definidos compreender ou consistir de L-aminoácidos.

[000170] Uma vez que os anticorpos adequados são obtidos, eles podem ser testados quanto à atividade, tal como especificidade ou uma atividade biológica de ligação do anticorpo, por exemplo, por ELISA, imuno-histoquímica, citometria de fluxo, imunoprecipitação, Western blot, etc. A atividade biológica pode ser testado em diferentes ensaios com leituras para essa função específica.

[000171] Num outro aspecto, o presente invento proporciona um polinucleotídeo que codifica um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígenode acordo com o segundo aspecto e as formas de realização relacionadas do segundo aspecto.

[000172] Deste modo, numa forma de realização, a invenção proporciona um polinucleotídeo isolado compreendendo ou consistindo em sequências de nucleótidos:

i)

GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGA
GAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGG
TTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAG
ATTGTTTGATGGGGTCCCATCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGAT
TTTTTTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATTATTGT
CTACAGTATGATGACTTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAACTGGAAA
TAAAA; e/ou

ii)

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTC
CCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTTCCTCTGCCATGT
CTTGGGTTCGCCAGACTCCGGACAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTA

GTGTTGGTGGTGGTAAAACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGCTTCAC
CATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGA
GGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAAACTAATCAGTCTCTACTG
GGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA.

[000173] Numa outra forma de realização, a invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo ou consistindo em qualquer uma das sequências de ácido nucleico incluídas em qualquer das Figuras 18 a 28.

[000174] Assim, numa forma de realização, a invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo ou consistindo em sequências de nucleótidos:

i) GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGA
GAGAGAGTCATCATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATAAATAGTTATTTAAC
CTGGTTCCAACAGAAACCAGGAAAGTCTCCTAAGACCCTGATCTATCTTACAA
ATAGATTGATGGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCA
AGAATTTTTACTCACCATCAGCGGCCTGGAACATGAAGATATGGGCATTTATT
ATTGTCTCCAGTATGTTGACTTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCT
GGAAATAAAA; e/ou

ii) GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAG
GGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCATTTTCAGTTCCTCTGCC
ATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACTA
TTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATT
CACCGTCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACACCCTATACCTGCAAATGGACAGT
CTGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCAAAACTAATCAGTCCCTA
CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA.

[000175] Numa outra forma de realização, a invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo ou consistindo em sequências de nucleótidos:

i) GACATCACGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTGGGA
GAGAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAAC

CTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGATCCTGATCTATCTTGTAA
ATAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCA
AGATTATGCTCTCACCATCAGCAGTCTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATT
ATTGTCTACAATATGATGACTTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCT
GGAAATAAAA; e/ou

ii) GAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGG
GTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTACCCATGCC
ATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACC
ATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGAT
TCACTATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCTATATCTGCAACTGAGCAGT
CTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCAAGACTAATCAGTACCT
ACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA.

[000176] É preferível que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos da invenção inibe a atividade TG2. Assim, prefere-se que o anticorpo da invenção inibe a atividade enzimática TG2 e, assim, impede-a de funcionar a ligação cruzada de lisina e glutamina resíduos com Nε- (γ ligações glutamil) lisina isopeptídicas. Prefere-se que a atividade enzimática da TG2 é completamente abolida, mas prevê-se que a inibição pode ser a inibição parcial nos casos em que esta inibição parcial é suficiente para proporcionar um resultado terapêutico ou não terapêutico útil. O perito na especialidade seria capaz de determinar se a extensão da inibição é eficaz para conseguir o resultado desejado.

[000177] É preferível que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenoé específico para a inibição TG2. Assim, é preferível que o anticorpo ou fragmento do mesmo não inibe TG1, TG3, TG13 e / ou atividade TG7 de ligação ao antígeno.

[000178] Prevê-se que um anticorpo que inibe eficazmente a atividade TG2 mas é suficientemente seletivo de modo a que não inibe significativamente TG1, TG3, TG13 e/ou atividade TG7 pode ser particularmente útil em medicina. Assim, prefere-se que o anticorpo inibe a atividade exclusivamente TG2.

[000179] Num outro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenocuja ligação a TG2 (por exemplo, humano TG2) é inibida ou reduzida quando um anticorpo de acordo com qualquer aspecto precedente é obrigado a TG2 (por exemplo, humano TG2) .

[000180] Assim, a invenção inclui qualquer anticorpo que se liga seletivamente a um epítopo dentro da região de TG2 de tal modo que podem competir com e perturbem a ligação de qualquer anticorpo dos aspectos precedentes.

[000181] Num outro aspecto, o presente invento proporciona um composto compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto precedente e uma outra porção.

[000182] Numa forma de realização, a porção posterior pode ser uma porção directamente ou indiretamente citotóxica.

[000183] Por "directamente citotóxico" incluímos o significado de que o radical é aquele que por si só é citotóxica. Por "indiretamente citotóxica" que incluem o sentido de que o grupo é aquele que, embora não seja em si citotóxico, pode induzir citotoxicidade, por exemplo, sua ação sobre uma nova molécula ou por outra ação sobre ele.

[000184] A porção citotóxica pode ser selecionado a partir de, mas não se limita a, o grupo que compreende um agente quimioterapêutico directamente citotóxico, um polipéptido directamente citotóxico, uma porção que é capaz de converter uma prodroga relativamente não tóxica numa droga citotóxica, um radiossensibilizador, um citotóxica directa de ácido nucleico, uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipéptido directamente ou indiretamente citotóxica, uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipéptido terapêutico, ou um átomo radioativo. É ainda previsto nesta invenção que o átomo radioativo pode ser qualquer um de fósforo-32, iodo-125, iodo-131, índio-111, rénio-186, rénio-188 ou ítrio-90.

[000185] Agentes quimioterapêuticos citotóxicos, tais como agentes anticancêr, incluem:

[000186] agentes alquilantes incluindo mostardas de azoto tais como mecloretamina (HN2), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano (L-sarcolisina) e clorambucilo; etileniminas e metilmelaminas tais como hexametilmelamina, tiotepa; sulfonatos de alquilo tais como bussulfano; nitrosoureias tais como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU) e estreptozocina (estreptozotocina); e triazenos tais como decarbazina (DTIC; dimethyltriazenoimidazole-carboxamida); Os anti-metabolitos incluindo análogos de ácido fólico tais como metotrexato (ametopterina); análogos de pirimidina tais como fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUdR) e citarabina (arabinósido de citosina); e análogos de purina e inibidores relacionados tais como mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) e pentostatina (2'-desoxicoformicina). Produtos naturais incluindo alcalóides de vinca tais como vinblastina (VLB) e vincristina; epipodofilotoxinas tais como etoposido e teniposido; antibióticos tais como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorrubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) e mitomicina (mitomicina C); enzimas tais como L-asparaginase; e modificadores da resposta biológica tais como interferão alphenomes. Agentes diversos incluindo complexos de coordenação de platina, tais como cisplatina (cis-DDP) e a carboplatina; antracenodiona tal como mitoxantrona e antraciclina; ureia substituída tal como hidroxiureia; derivado de metil hidrazina tais como procarbazina (N-metil-hidrazina, MIH); e supressor adrenocortical tais como mitotano (o, p'-DDD) e aminoglutetimida; taxol e análogos/derivados; e agonistas/antagonistas da hormona tais como flutamida e tamoxifeno.

[000187] Vários destes agentes foram previamente ligados a anticorpos e outros agentes de entrega local-alvo e, assim, os compostos da invenção compreendendo estes agentes podem ser facilmente feita pela pessoa especialista na técnica. Por exemplo, (70 Bauminger & Wilchek (1980) Methods Enzymol, 151-159.; Aqui incorporada por referência) carbodiimida conjugação pode ser utilizado para conjugar uma variedade de agentes, incluindo a doxorrubicina, a anticorpos.

[000188] Péptidos citotóxicos ou porções polipeptídicas incluem qualquer porção que leva à morte celular. Citotóxicos peptídicos e porções de polipéptidos são bem conhecidos na arte e incluem, por exemplo, ricina, abrina, exotoxina de Pseudomonas, factor tecidual e semelhantes. Os métodos para a sua ligação aos porções de direcionamento, tais como anticorpos também são conhecidos na arte. O uso da ricina como agente citotóxico é descrito em Burrows & Thorpe (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90, 8996-9000, aqui incorporada por referência, e à utilização de factor de tecido, o que leva a localizada a coagulação do sangue e enfarte de um tumor, foi descrita por Ran et al (1998) Cancer Res. 58, 4646-4653 e Huang et al (1997) Science 275, 547-550. Tsai et al (1995) Dis. Colon Rectum 38, 1067-1074 descreve a abrina, cadeia conjugado com um anticorpo monoclonal e é aqui incorporada por referência. Outras proteínas de inativação de ribossomas são descritos como agentes citotóxicos em WO 96/06641. Exotoxina de Pseudomonas também pode ser utilizado como a porção citotóxica polipéptido (ver, por exemplo, Aiello et al (1995) Proc Natl Acad Sci EUA 92, 10457-10461; Aqui incorporado por referência).

[000189] Algumas citocinas, tais como TNFa e IL-2, podem também ser úteis como agentes citotóxicos.Determinados átomos radioativos podem também ser entregues citotóxica se em doses suficientes. Assim, a porção citotóxica pode compreender um átomo radioativo que, em uso, proporciona uma quantidade suficiente de radioatividade ao local alvo de forma a ser citotóxico. Átomos radioativos adequados incluem fósforo-32, iodo-125, iodo-131, índio-111, rénio-186, rénio-188 ou ítrio-90, ou qualquer outro isótopo que emite energia suficiente para destruir as células vizinhas, organelos ou de ácido nucleico. De preferência, os isótopos e densidade de átomos radioativos no composto da invenção são tais que uma dose superior a 4000 cGy (preferencialmente pelo menos 6000, 8000 ou 10.000 cGy) é entregue no local alvo e, de preferência, às células a o local alvo e seus organelos, particularmente o núcleo. O átomo radioativo pode ser ligado ao anticorpo de formas conhecidas. Por exemplo, o EDTA ou outro agente quelante

pode ser ligado ao anticorpo e utilizado para fixar o ^{111}In ou ^{90}Y. Resíduos de tirosina podem ser rotulados com ^{125}I ou ^{131}I.

[000190] A porção citotóxica pode ser um polipéptido indiretamente citotóxico adequado. Numa forma de realização particularmente preferida, o polipéptido indiretamente citotóxica é um polipéptido que tem atividade enzimática e pode converter uma prodroga relativamente não tóxica numa droga citotóxica. Quando a porção de direcionamento é um anticorpo deste tipo de sistema é muitas vezes referido como ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy). O sistema requer que o grupo de direcionamento localiza a porção enzimática para o local desejado no corpo do paciente (isto é, o local que expressa MR, tal como novo tecido vascular associado a um tumor) e depois de dar tempo para que a enzima se localize no local, a administração de um pró-fármaco que é um substrato para a enzima, o produto final da catálise um composto citotóxico ser. O objectivo da abordagem consiste em maximizar a concentração de droga no local desejado e minimizar a concentração de droga nos tecidos normais (ver Senter, PD et al (1988) "Os efeitos anti-tumor de conjugados de fosfatase alcalina-anticorpos em combinação com fosfato de etoposido "...., Proc Natl Acad Sci EUA 85, 4842-4846; Bagshawe (1987) Br J. Cancer 56, 531-2;. e Bagshawe, KD et al (1988)" Um agente citotóxico pode ser gerado seletivamente em locais de câncer "Br. J. Cancer. 58, 700-703.)

[000191] A substância citotóxica pode ser qualquer droga anti-cancêr existente, tal como um agente alquilante; um agente que se intercala no ADN; um agente que inibe quaisquer enzimas chave como a di-hidrofolato-redutase, timidina-sintetase, a ribonucleótido-redutase, nucleósido-quinases ou topoisomerase; ou um agente que efectua a morte celular ao interagir com qualquer outro constituinte celular. O etoposido é um exemplo de um inibidor da topoisomerase.

[000192] Sistemas pró-fármaco relatados incluem: uma prodroga de mostarda de fenol ativada por uma coli β-glucuronidase de E. (Wang et al, 1992 e Roffler et al, 1991); uma prodroga de doxorrubicina ativada por uma β-glucuronidase humana

(Bosslet et al, 1994); doxorrubicina ainda pró-drogas ativadas por grãos de café α-galactosidase (Azoulay et al, 1995); prodrogas de daunorubicina, ativadas por grãos de café α-D-galactosidase (Gesson et al, 1994); um pró-fármaco 5-fluorouridina ativada por uma E. coli β-D-galactosidase (Abraham et al, 1994); e prodrogas de metotrexato (por exemplo, metotrexato-alanina) ativadas por carboxipeptidase A (Kuefner et al, 1990, Vitols et al, 1992 e Vitols et al, 1995).

[000193] Estes e outros estão incluídos na Tabela 1.

Tabela 1

Enzima	Pró-droga
Carboxipeptidase G2	Os derivados de ácido L-glutâmico e mostardas de ácido benzóico, mostardas de anilina, mostardas de fenol e mostardas de fenilenodiamina; derivados fluorados destes
Fosfatase alcalina	Fosfato de etoposido
	Fosfato de mitomicina
Beta-glucuronidase	*p*- Hidroxianilina de mostarda-glucuronido
	Epirrubicina-glucuronida
Penicilina-V-amidase	Adriamicina-N fenoxiacetilo
Penicilina-G-amidase	N- (4'-hidroxifenil acetil) palitoxina
	Doxorrubicina e melfalano
Beta-lactamase	Nitrogênio mostarda-cefalosporina *p*-fenilenodiamina; derivados doxorrubicina; vinblastina derivado-cefalosporina, mostarda de cefalosporina; um derivado de taxol
Beta-glucosidase	Ácido cianofenilmetil-beta-D-gluco-piranosidurônico
Nitrorredutase	5- (Azaridin-1-il -) - 2,4-dinitrobenzamida
Citosina deaminase	5-Fluorocitosina
Carboxipeptidase A	Metotrexato-alanina

[000194] (Esta tabela é adaptada de Bagshawe (1995) Drug Dev Res 34, 220-230, a partir do qual podem ser obtidas referências completas destes vários

sistemas;.. O derivado de taxol é descrito em Rodrigues, ML et al (1995) Chemistry & Biology 2, 223).

[000195] As enzimas adequadas para fazer parte da porção enzimática da invenção incluem: exopeptidases, como as carboxipeptidases G, G1 e G2 (para prodrogas mostarda glutamylated), as carboxipeptidases A e B (para prodrogas baseadas em MTX) e aminopeptidases (para 2-α- pró-drogas aminocyl MTC); endopeptidases, como, por exemplo thrombolysin (para prodrogas de trombina); hidrolases, tal como fosfatases (por exemplo, fosfatase alcalina) ou sulfatases (por exemplo, aril sulfatases) (para prodrogas phosphylated ou sulfatados); amidases, tais como penicilina-amidases e arilacilo amidase; lactamases, tais como β-lactamases; glicosidases, como β-glucuronidase (para antraciclinas β-glucuronomide), α-galactosidase (para amigdalina) e β-galactosidase (para antraciclina β-galactose);

[000196] desaminases, como a citosina-desaminase (para 5FC); quinases, tais como a uroquinase e a timidina-quinase (para ganciclovir); redutases, como a nitro-redutase (para CB1954 e análogos), azoreductase (para mostardas de azobenzeno) e DT-diaforase (para CB1954); oxidases, tais como glucose-oxidase (para glucose), xantina-oxidase (para xantina) e lactoperoxidase; DL-racemases, anticorpos catalíticos e ciclodextrinas.

[000197] A pró-droga é relativamente não-tóxico em comparação com o fármaco citotóxico. Tipicamente, tem menos de 10% da toxicidade, preferencialmente menos de 1% da toxicidade, como medida num teste de citotoxicidade adequado in vitro. É provável que a porção que é capaz de converter um pró-fármaco de um fármaco citotóxico será ativa isolada do resto do composto, mas é necessário apenas para que seja ativa quando (a) está em combinação com o resto o composto e (b) o composto está ligado a, adjacente a ou internalizado nas células-alvo.

[000198] Quando cada fração do composto é um polipéptido, as duas porções podem ser ligadas entre si por qualquer das maneiras convencionais de

polipéptidos de ligação cruzada, tais como os geralmente descritos em O'Sullivan et al (1979) Anal. Biochem. 100, 100-108. Alternativamente, o composto pode ser produzido como um composto de fusão por técnicas de ADN recombinante em que um comprimento de ADN compreende as respectivas regiões que codificam as duas porções do composto da invenção ou um adjacente outra ou separadas por uma região que codifica um péptido ligante que não destrói as propriedades desejadas do composto. É concebível que as duas porções do composto podem sobrepor-se total ou parcialmente.

[000199] A porção citotóxica pode ser um radiossensibilizador. Os radiossensibilizadores incluem fluoropirimidinas, análogos de timidina, hidroxiureia, gemcitabina, fludarabina, nicotinamida, pirimidinas halogenadas, 3-aminobenzamida, 3-aminobenzodiamide, etanixadole, pimonidazole e misonidazol (ver, por exemplo, McGinn et al (1996) J. Natl. Cancer Inst. 88, 1193-11203; Shewach & Lawrence (1996) Invest New Drugs 14, 257-263;. Horsman (1995) Acta Oncol 34, 571-587;. Shenoy e Singh (1992) Clin Invest 10, 533-551. ; Mitchell et al (1989) Int J. Radiat Biol 56, 827-836;... Iliakis & Kurtzman (1989) Int J. Radiat Oncol Biol Phys 16, 1235-1241;..... Brown (1989) Int . J. Biol Phys Radiat Oncol 16, 987-993;.... Brown (1985) Cancer 55, 2222-2228).

[000200] Além disso, a entrega de genes em células pode radiosensitise-los, por exemplo, a entrega do gene de p53 ou de ciclina D (Lang et al (1998) J. Neurosurg 89, 125-132;.. Coco Martin et al (1999) Cancer Res 59, 1134-1140).

[000201] A outra porção pode ser um que se torna citotóxica, ou liberta uma porção citotóxica, após irradiação. Por exemplo, o boro-isótopo 10, quando adequadamente irradiado, liberta partículas α que são citotóxicas (ver, por exemplo, US 4348376 para Goldenberg; Primus et al (1996) Bioconjug Chem 7, 532-535..).

Da mesma forma, a porção citotóxica pode ser um que seja útil em terapia fotodinâmica, tais como photofrin (ver, por exemplo, Dougherty et al (1998) J. Natl. Cancer Inst. 90, 889-905).

[000202] A porção citotóxica pode ser uma molécula de ácido nucleico que é directamente ou indiretamente citotóxica. Por exemplo, a molécula de ácido nucleico pode ser um oligonucleótido antisentido que, após localização no local alvo é capaz de entrar nas células e provocar a sua morte. O oligonucleótido, por conseguinte, pode ser uma que previne a expressão de um gene essencial, ou um que conduz a uma mudança na expressão do gene que provoca a apoptose. Os exemplos de oligonucleidos adequados incluem aqueles dirigidos para bcl-2 (Ziegler et al (1997) J. Natl. Cancer Inst. 89, 1027-1036), e α polimerase de ADN e a topoisomerase IIα (Lee et al (1996) Anticancer Res 16. , 1805-1811.

[000203] Os ácidos nucleicos de péptidos podem ser úteis no lugar de ácidos nucleicos convencionais (veja Knudsen & Nielsen (1997) *Anticancer Drugs* 8, 113-118).

[000204] Em uma forma de realização do composto da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno e a porção citotóxica pode ser polipéptidos que estão fundidos. Assim, a invenção proporciona ainda um polinucleotídeo que codifica um tal composto.

[000205] Numa outra forma de realização, a porção posterior pode ser uma porção facilmente detectável. Prevê-se que a porção prontamente detectável pode compreender uma quantidade adequada de qualquer um de iodo-123, iodo-131, índio-111, flr-19, carbono-13, azoto-15, oxigénio-17, Technitium-99m, gadolínio, manganês ou ferro.

[000206] Por um "radical facilmente detectável" incluímos o significado de que o radical é aquele que, quando localizado no sítio alvo, após a administração do composto da invenção a um paciente, pode ser detectado, tipicamente de forma não invasiva a partir do exterior do corpo eo local do alvo localizado. Assim, os compostos desta configuração da invenção são úteis em imagem e diagnóstico.

[000207] Tipicamente, a porção prontamente detectável é ou compreende um átomo radioativo que é útil na criação de imagens. Átomos radioativos adequados incluem tecnécio-99m ou iodo-123 para estudos de cintilografia. Outras porções

prontamente detectáveis incluem, por exemplo, marcadores de spin para imagiologia de ressonância magnética (MRI), tal como iodo-123 novamente, iodo-131, índio-111, flr-19, carbono-13, azoto-15, oxigénio-17, gadolínio , manganês e ferro. Claramente, o composto da invenção deve ser suficiente dos isótopos atómicos apropriados para que a molécula seja facilmente detectável.

[000208] Os radiomarcadores ou outros marcadores podem ser incorporados no composto da invenção de maneiras conhecidas. Por exemplo, se o anticorpo é um polipeptídeo que pode ser biossintetizado ou pode ser sintetizado por síntese química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adequados envolvendo, por exemplo, flúor-19 em vez de hidrogénio. Marcadores tais como ^{99m}Tc, ^{123}I, ^{186}Rh, ^{188}Rh e ^{111}In podem, por exemplo, serem fixados em resíduos *via* cisteína em anticorpos. Yttrium-90 pode ser fixado via um resíduo de lisina. O Método IODOGEN (Fraker *er al* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 80, 49-57) pode ser usado para incorporar iodine-123. Referencia ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989) descreve outros métodos em detalhes.

[000209] Num outro aspecto, a presente invenção proporciona um vetor que compreende qualquer polinucleotídeo da invenção.

[000210] Vetores Plasmídeos típicos procarióticos são: pUC18, pUC19, pBR322 e pBR329 disponíveis a partir de Biorad Laboratories (Richmond, CA, USA); p*Trc*99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 e pRIT5 disponíveis a partir da Farmácia (Piscataway, NJ, USA); vetores pBS, vetores Phagescript, vetores Bluescript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A disponíveis a partir de Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA).

[000211] Um vetor plasmídico de célula de mamífero típico pSVL está disponível a partir da Farmácia (Piscataway, NJ, USA). Um exemplo de um vetor de expressão de mamífero indutível é pMSG, também disponível em Pharmacia (Piscataway, NJ, EUA).

[000212] Vetores de plasmídeo de levedura úteis são pRS403-406 e pRS413-416 e estão geralmente disponíveis em Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, EUA). Os plasmídeos pRS403, pRS404, pRS405 e pRS406 são levedura Integrando plasmídeos (YIps) e incorporar as leveduras marcadores selecionáveis HIS3, TRP1, LEU2 e URA3. Os plasmídeos pRS413-416 são plasmídeos de Centrómeros de Levedura (Ycp).

[000213] Métodos bem conhecidos dos peritos na arte pode ser utilizado para construir vetores de expressão contendo a sequência de codificação e, por exemplo controles de transcrição ou da tradução adequada.

[000214] Ainda para além disso, a invenção proporciona uma célula hospedeira compreendendo qualquer polinucleotídeo ou vetor da invenção.

[000215] Muitos sistemas de expressão são conhecidos, incluindo o emprego de sistemas de: (bactérias. Por exemplo E. coli e Bacillus subtilis) transformadas com, por exemplo, bacteriófago recombinante, o plasmídeo ou DNA de cosmídeo vetores de expressão; leveduras (por exemplo Saccharomyces cerevisiae.) transformadas com, por exemplo, vetores de expressão de levedura; sistemas de células de insectos transformadas com, por exemplo, vetores de expressão virais (por exemplo, baculovírus.); sistemas de células de plantas transfectadas com, por exemplo, expressão de vetores virais ou bacterianas; sistemas de células animais transfectadas com, por exemplo, vetores de expressão de adenovírus.

[000216] Os vetores podem incluir um replicão procariótico, tal como o Col E1 ori, para propagação num procariota, mesmo que o vetor é para ser utilizado para expressão noutros tipos de células, não procarióticas. Os vetores podem também incluir um promotor apropriado tal como um promotor procariótico capaz de dirigir a expressão (transcrição e tradução) dos genes numa célula hospedeira bacteriana, tal como E. coli, transformada com ele.

[000217] Um promotor é um elemento de controle de expressão formado por uma sequência de ADN que permite a ligação de ARN polimerase e a transcrição ocorram. As sequências promotoras compatíveis com hospedeiros bacterianos

exemplares são tipicamente proporcionadas em vetores plasmídeos contendo locais de restrição convenientes para inserção de um segmento de ADN do presente invento.

[000218] O polinucleotídeo numa célula hospedeira adequada pode ser expresso para produzir o anticorpo ou o composto da invenção. Assim, o polinucleotídeo pode ser utilizado de acordo com técnicas conhecidas, apropriadamente modificadas tendo em conta os ensinamentos aqui contidos, para construir um vetor de expressão, que é então utilizado para transformar uma célula hospedeira apropriada para a expressão e produção do anticorpo ou do composto de a invenção . Tais técnicas incluem as divulgadas em Patentes US Nos 4440859.; 4.530.901; 4.582.800; 4.677.063; 4.678.751; 4.704.362; 4.710.463; 4.757.006; 4.766.075; e 4810648, todas as quais são aqui incorporadas por referência.

[000219] O polinucleotídeo pode ser unido a uma grande variedade de outras sequências de ADN para introdução num hospedeiro apropriado. O ADN companheiro dependerá da natureza do hospedeiro, do modo de introdução do ADN no hospedeiro e de se a manutenção episssomal ou integração for desejado. Geralmente, o polinucleotídeo é inserido num vetor de expressão, tal como um plasmídeo, em orientação adequada e quadro de leitura correcto para expressão. Se necessário, o ADN pode ser ligado para a transcrição adequada e sequências nucleotídicas de controle de regulação da tradução reconhecidas pelo hospedeiro desejado, embora tais controles estejam geralmente disponíveis no vetor de expressão. Assim, a inserção de DNA pode ser operacionalmente ligado a um promotor apropriado. Promotores bacterianas incluem a E. coli lacl e lacZ promotores, o T3 e T7, o promotor gpt, o PR do fago λ e promotores PL, o promotor phoA e o promotor trp. Os promotores eucarióticos incluem o promotor imediato precoce de CMV, o promotor da cinase de timidina de HSV, os promotores SV40 precoces e tardios e os promotores de LTRs retrovirais. Outros promotores adequados serão do conhecimento dos peritos na arte. As construções de expressão irão também desejavelmente conter locais para iniciação e terminação

da transcrição, e na região transcrita, local de ligação ao ribossoma para a tradução. (Hastings et al, Patente Internacional No. WO 98/16643, publicada em 23 de Abril de 1998).

[000220] O vetor é então introduzido no hospedeiro através de técnicas padrão. Geralmente, nem todos os hospedeiros serão transformados pelo vetor e, portanto, será necessário selecionar para células hospedeiras transformadas. Uma técnica de selecção envolve a incorporação no vetor de expressão de um marcador de sequência de ADN, com quaisquer elementos de controle necessários, que codifica para uma característica selecionável na célula transformada. Esses marcadores incluem di-hidrofolato redutase, G418 ou resistência à neomicina para cultura de células eucarióticas, e tetraciclina, canamicina ou genes de resistência à ampicilina para cultura em E. coli e outras bactérias. Alternativamente, o gene para tal característica selecionável pode estar noutro vetor, que é utilizado para co-transformar a célula hospedeira desejada.
As células hospedeiras que foram transformadas pelo ADN recombinante da invenção são então cultivadas durante um tempo suficiente e sob condições apropriadas conhecidas dos peritos na arte tendo em vista os ensinamentos aqui divulgados para permitir a expressão do polipéptido, que pode então ser recuperada.

[000221] O anticorpo ou o composto pode ser recuperado e purificado a partir de culturas de células recombinantes por métodos bem conhecidos, incluindo precipitação com sulfato de amónio ou etanol, extração com ácido, cromatografia de permuta aniónica ou catiónica, cromatografia com fosfocelulose, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de afinidade, cromatografia de hidroxilapatite e cromatografia de lectina. Mais preferencialmente, a cromatografia líquida de alto desempenho ("HPLC") é utilizada para a purificação.

[000222] Ainda para além disso, a invenção proporciona uma linha de célula hospedeira estável que produz um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto anterior ou um composto da invenção

resultante da incorporação na linha de células de um polinucleotídeo exógeno ou vetor da invenção.

[000223] A célula hospedeira pode ser ou procariótica ou eucariótica. As células bacterianas são células hospedeiras procarióticas preferidas e tipicamente são uma estirpe de Escherichia coli tal como, por exemplo, a estirpes de E. coli DH5 disponível de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EUA, e RR1 disponível da American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EUA (ATCC n 31343). As células hospedeiras eucarióticas preferidas incluem leveduras e células de mamífero, de preferência células de vertebrado tais como as de um ratinho, rato, macaco ou linha de células fibroblásticas humana. As células hospedeiras de levedura incluem YPH499, YPH500 e YPH501 que se encontram geralmente disponíveis de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EUA. As células hospedeiras de mamífero preferidas incluem de ovário de hamster chinês (CHO) disponíveis da ATCC como CCL61, células NIH Swiss embrião de ratinho NIH/3T3, disponíveis da ATCC como CRL 1658, e derivadas de rim de macaco COS-1 a partir de células disponíveis da ATCC como CRL 1650.

[000224] Para além das próprias células hospedeiras transformadas, o presente invento contempla também uma cultura dessas células, preferivelmente uma cultura monoclonal (clonalmente homogénea) cultura, ou uma cultura derivada de uma cultura monoclonal, num meio nutriente.

[000225] Num outro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição/formulação farmacêutica compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção, ou de um polinucleotídeo de acordo com a invenção, ou um composto de acordo com a invenção, em mistura com um excipiente farmaceuticamente aceitável, um adjuvante, diluente ou veículo.

[000226] Por "farmaceuticamente aceitável" é incluído na formulação que é estéril e isenta de pirogénios. Os veículos farmacêuticos adequados são bem conhecidos na arte da farmácia. O transportador (es) devem ser "aceitáveis" no

sentido de serem compatíveis com o composto da invenção e não serem prejudiciais para os seus receptores. Tipicamente, os transportadores serão água ou solução salina que será estéril e isenta de pirogénios; no entanto, podem ser utilizados outros veículos aceitáveis.

[000227] Numa forma de realização, a composição farmacêutica / formulação da invenção pode ainda compreender um ingrediente ativo adicional, isto é, um agente terapeuticamente ativo que não seja o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos da presente invenção. Prevê-se que um ou mais agentes ativos adicionais podem aumentar a eficácia farmacêutica da composição/ formulação contra a doença alvo, conforme apropriado. Numa forma de realização, o outro ingrediente ativo pode ser um agente terapêutico selecionado a partir de um agente envolvido na redução da formação de cicatrizes do tecido, reduzindo os emaranhados neurofibrilliary, e/ou reduzindo a resistência à quimioterapia.

[000228] Numa forma de realização preferida, a composição farmacêutica/formulação pode ser formulada para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea ou entrega a um paciente.

[000229] É preferível que a composição/formulação farmacêutica compreende uma quantidade do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenoda invenção eficaz para tratar as várias condições descritas acima e mais abaixo.

[000230] Um outro aspecto da invenção proporciona um kit de partes compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção, ou de um polinucleotídeo de acordo do inveniton, ou um composto da invenção; e um ou mais agentes adicionais. Prevê-se que os agentes adicionais podem ser qualquer um dos outros ingredientes ativos anteriormente descritos, ou qualquer outro agente adequado.

[000231] Ainda num outro aspecto, a invenção proporciona uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção, ou um polinucleotídeo da invenção, ou

um composto, composição farmacêutica / formulação, ou o kit de componentes da invenção, para utilização em medicina.

[000232] TG2 é claramente uma enzima multifuncional e tem sido associada a uma variedade de funções celulares, incluindo a estabilização e o transporte nuclear [28, 29], endocitose [30, 31], de sinalização GTPase [32-34], apoptose [35, 36], de células adesão [37-39], a integridade do citoesqueleto [28, 29] e ECM estabilização [9]. Uma pequena molécula inibidora pode impedir em todas essas funções, como, em geral, eles têm livre acesso ao espaço extracelular e interior da célula. Um anticorpo não pode entrar na célula e, como tal, as funções intracelulares de TG2 não seria afectado por um anticorpo específico TG2 administrado in vivo.

[000233] É importante notar a maior parte dos papéis patológicos de TG2 parecem ser extracelular, tais como o seu papel na cicatrização de tecidos e fibrose, doença celíaca e cancêr. Assim, utilizando um anticorpo que se liga seletivamente TG2 em medicina traria um grau adicional de seletividade prevenção de efeitos indesejáveis intracelulares que poderiam traduzir-se em efeitos colaterais indesejáveis da terapia.

[000234] Por conseguinte, os anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno da invenção iria oferecer vantagens clinicas em relação aos medicamentos anteriormente disponíveis, por exemplo, no bloqueio de TG2 em cicatrizes e doenças fibróticas onde TG2 ligações cruzadas de proteínas da MEC, em doença celíaca, onde gliadina é desamidada no espaço extracelular e na quimio-resistência em cancêr onde a adesão das células parece ser o factor de protecção. Além disso, os pequenos fragmentos de anticorpo da invenção , por exemplo os fragmentos Fab poderia atravessar a barreira sanguínea do cérebro e inibem TG2 no cérebro e, potencialmente, oferecer terapias eficazes para patologias com envolvimento de TG2 neurológicas.

[000235] Assim, um aspecto adicional da invenção proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção, ou um polinucleotídeo da invenção, ou um composto, composição

farmacêutica/formulação, ou o kit de partes da invenção , para usar na redução ou inibição da atividade da enzima TG2 num indivíduo que dele necessite.

[000236] A invenção proporciona ainda a utilização de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção, ou um polinucleotídeo da invenção, ou um composto, composição farmacêutica / formulação, ou o kit de componentes da invenção, na fabrico de um medicamento para reduzir ou inibir a atividade da enzima TG2 num indivíduo que dele necessite. A invenção também proporciona um método de redução ou inibição da atividade da enzima TG2 num indivíduo com necessidade do mesmo, compreendendo o método o passo de administração de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno , ou uma variante, a fusão ou derivado, de acordo com qualquer aspecto da invenção, ou um polinucleotídeo da invenção, ou um composto, composição farmacêutica/formulação, ou o kit de partes da invenção , para o indivíduo.

[000237] Um outro aspecto da invenção proporciona uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção, ou um polinucleotídeo da invenção, ou um composto, composição farmacêutica/formulação, ou o kit de partes do invenção, para utilização no tratamento e/ou diagnóstico de doença celíaca, cicatrização anormal de feridas, cicatrizes, esclerodermia, quelóides e cicatrizes hipertróficas, cicatriz ocular, doença inflamatória do intestino, degeneração macular, oftalmopatia de Graves, ergotismo induzida por drogas, psoriase, fibrosis- doenças relacionadas (por exemplo, fibrose hepática, fibrose pulmonar tal como doença intersticial pulmonar e doença pulmonar fibrótica, fibrose cardíaca, fibrose da pele, mielofibrose, fibrose renal tais como glomerulosclerose e fibrose tubulointersticial), aterosclerose, restenose, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas/neurológica doenças (por exemplo, a doença de Huntington, a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença polyglutamine, espinobulbar atrofia muscular, atrofia dentatorubral-pallidoluysian, ataxias espinocerebelares 1, 2, 3, 6, 7 e 12, atrofia rubro pallidal, paralisia espinocerebelares), e/ou câncer

(por exemplo glioblastomas, tais como: glioblastoma na síndrome de Li-Fraumeni e glioblastoma esporádica, melanomas malignos, adenocarcinomas do ducto pancreático, leucemia mielóide, leucemia mielóide aguda, síndrome mielodisplásica, síndroma mieloproliferativo, ginecológico, sarcoma de Kaposi, doença de Hansen, colite colagenosa).

[000238] A invenção também prevê a utilização de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção, ou um polinucleotídeo da invenção, ou um composto, composição farmacêutica/formulação, ou o kit de partes de a invenção, na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou diagnóstico de doença celíaca, cicatrização anormal de feridas, cicatrizes, esclerodermia, quelóides e cicatrizes hipertróficas, cicatriz ocular, doença inflamatória do intestino, degeneração macular, oftalmopatia de Graves, ergotismo induzida por drogas, psoriase, doenças relacionadas com fibrose (por exemplo, fibrose hepática, fibrose pulmonar tal como doença intersticial pulmonar e doença pulmonar fibrótica, fibrose cardíaca, fibrose da pele, mielofibrose, fibrose renal tais como glomerulosclerose e fibrose tubulointersticial), aterosclerose, restenose, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, neurodegenerativas/doenças neurológicas (por exemplo, a doença de Huntington, a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença polyglutamine, espinobulbar atrofia muscular, atrofia dentatorubral-pallidoluysian, ataxias espinocerebelares 1, 2, 3, 6, 7 e 12, atrofia rubropallidal, spinocerebellar paralisia), e/ou cancêr (por exemplo, glioblastomas, tais como glioblastoma na síndrome de Li-Fraumeni e glioblastoma esporádica, melanomas malignos, adenocarcinomas do ducto pancreático, leucemia mielóide, leucemia mielóide aguda, síndrome mielodisplásica, síndrome mieloproliferativo, ginecológico, sarcoma de Kaposi, doença de Hansen, colite colagenosa).

[000239] A invenção também fornece um método de tratamento e / ou diagnóstico de doença celíaca, cicatrização anormal de feridas, cicatrizes, esclerodermia, quelóides e cicatrizes hipertróficas, cicatriz ocular, doença

inflamatória do intestino, degeneração macular, oftalmopatia de Graves, ergotismo induzida por drogas, psoriase, fibrosis- doenças relacionadas (por exemplo, fibrose hepática, fibrose pulmonar tal como doença intersticial pulmonar e doença pulmonar fibrótica, fibrose cardíaca, fibrose da pele, mielofibrose, fibrose renal tais como glomerulosclerose e fibrose tubulointersticial), aterosclerose, restenose, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas / neurológica doenças (por exemplo, a doença de Huntington, a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença polyglutamine, espinobulbar atrofia muscular, atrofia dentatorubral-pallidoluysian, ataxias espinocerebelares 1, 2, 3, 6, 7 e 12, atrofia rubropallidal, spinocerebellar paralisia), e/ou câncer (por exemplo, glioblastomas, tais como glioblastoma na síndrome de Li-Fraumeni e glioblastoma esporádica, melanomas malignos, adenocarcinomas do ducto pancreático, leucemia mielóide, leucemia mielóide aguda, síndrome mielodisplásica, síndroma mieloproliferativo, ginecológico, sarcoma de Kaposi, doença de Hansen, colite colagenosa) em um paciente, o método compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção, ou um polinucleotídeo da invenção, ou um composto, composição farmacêutica/formulação, ou o kit de partes da invenção , para o paciente.

[000240] Por "tratamento", incluímos tanto o tratamento terapêutico e profilático de um sujeito / paciente. O termo "profilática" é utilizada para abranger a utilização de um anticorpo, medicamento, composto, composição ou kit aqui descrito que ou evita ou reduz a probabilidade da ocorrência ou desenvolvimento de uma condição ou desordem (por exemplo, um distúrbio relacionado à fibrose) em um indivíduo.

[000241] Prefere-se que o paciente é um ser humano, mas o paciente pode ser qualquer outro mamífero que podem beneficiar do tratamento. Por exemplo, o paciente pode ser um rato, um rato, um hamster, um coelho, um gato, um cão, uma cabra, uma ovelha, um macaco ou um macaco.

[000242] Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou "quantidade eficaz", ou "terapeuticamente eficaz", tal como aqui utilizado, refere-se à quantidade que proporciona um efeito terapêutico para uma dada condição e regime de administração. Esta é uma quantidade pré-determinada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o aditivo e o diluente requerido, ou seja, um veículo transportador ou administração. Além disso, pretende-se significar uma quantidade suficiente para reduzir ou prevenir um défice clinicamente significativo na atividade, função e resposta do hospedeiro. Alternativamente, uma quantidade terapeuticamente eficaz é suficiente para provocar um melhoramento num estado clinicamente significativo em um hospedeiro, por exemplo, um mamífero.

[000243] Os agentes (isto é, anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno, variantes, derivados do mesmo ou de fusão), os medicamentos, os compostos, composições farmacêuticas e kits/formulações da invenção podem ser entregues usando um sistema de entrega de droga de libertação controlada injectável. Estes são projetados especificamente para reduzir a freqüência de injeções. Um exemplo de um tal sistema é Nutropin Depot que encapsula a hormona de crescimento humano recombinante (rhGH) em microesferas biodegradáveis que, uma vez injectada, a libertação de rhGH lentamente ao longo de um período sustentado. De preferência, a entrega é realizada por via intramuscular (im) e / ou sub-cutânea (sc) e / ou por via intravenosa (iv).

[000244] Os agentes, os medicamentos, os compostos, composições farmacêuticas e kits / formulações da invenção podem ser administrados por um dispositivo implantado cirurgicamente que liberta o fármaco directamente para o local desejado. Por exemplo, Vitrasert libera ganciclovir diretamente no olho para tratar a retinite por CMV. A aplicação directa deste agente tóxico para o local da doença atinge uma terapia eficaz, sem significativos efeitos secundários sistémicos da droga.

[000245] De preferência, os medicamentos e/ou composições farmacêuticas/formulações do presente invenção é uma unidade de dosagem contendo uma dose diária ou unidade, sub-dose diária ou uma sua fração apropriada, do ingrediente ativo(s).

[000246] Os agentes, os medicamentos, os compostos, composições farmacêuticas e kits da invenção serão normalmente administrados por qualquer via parentérica, na forma de uma composição farmacêutica compreendendo o ingrediente ativo(s), opcionalmente na forma de um orgânico não-tóxico, ou inorgânico, ácido, ou base, sal de adição, numa forma de dosagem farmaceuticamente aceitável. Dependendo da doença e do doente a ser tratado, bem como, da via de administração, as composições podem ser administradas em doses variadas.

[000247] Em terapia humana, os agentes, os medicamentos, os compostos, composições farmacêuticas / formulações, e kits da invenção podem ser administrados isoladamente, mas serão geralmente administrados em mistura com um excipiente farmacêutico apropriado, diluente ou veículo selecionado com respeito à via de administração pretendida e a prática farmacêutica padrão.

[000248] Os agentes, os medicamentos, os compostos, composições farmacêuticas e kits/formulações da referida invenção podem ser administrados por via parentérica, por exemplo, por via intravenosa, intra-arterial, intra-peritoneal, intra-tecal, intra-muscularmente ou subcutaneamente, ou eles podem ser administrados por técnicas de infusão. Considera-se como a melhor utilização na forma de uma solução aquosa estéril que pode conter outras substâncias, por exemplo, sais ou glucose suficientes para tornar a solução isotónica com o sangue. As soluções aquosas devem ser adequadamente tamponadas (preferencialmente a um pH de 3 a 9), se necessário. A preparação de formulações parentéricas adequadas sob condições estéreis é prontamente realizada por técnicas farmacêuticas padrão bem conhecidas dos peritos na arte.

[000249] Os medicamentos e composições farmacêuticas adequadas para administração parentérica incluem soluções para injeção estéreis aquosas e não-aquosas que podem conter anti-oxidantes, tampões, bacteriostatos e solutos que tornam a formulação isotónica com o sangue do receptor pretendido; e aquosa e não-aquosa suspensões estéreis que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. Os medicamentos e composições farmacêuticas podem ser apresentadas em recipientes de dose unitária ou multi-dose, por exemplo ampolas e frascos selados, e podem ser armazenadas numa condição seca por congelação (liofilizada) requerendo apenas a adição do veículo líquido estéril, por exemplo água para injectáveis, imediatamente antes da utilização. As soluções para injeção extemporâneas e suspensões podem ser preparadas a partir de pós estéreis, grânulos e comprimidos do tipo anteriormente descrito.

[000250] Para administração parentérica a pacientes humanos, o nível de dosagem diária dos agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção serão normalmente de 1 ug a 10 mg por adulto por dia, administrada em doses únicas ou divididas. O médico em qualquer evento determinará a dosagem actual que será mais adequada para qualquer paciente individual e ela variará com a idade, peso e resposta do paciente particular. As dosagens anteriores são exemplares do caso médio. Podem, evidentemente, haver casos individuais em que gamas de dosagem mais altas ou mais baixas são merecidas e todas elas estão dentro do âmbito da presente invenção.

[000251] Tipicamente, os medicamentos, composições farmacêuticas e kits/formulações da invenção conterão o agente da invenção a uma concentração de entre cerca de 2 mg/ml e 150 mg/ml, ou entre cerca de 2 mg/ml e 200 mg/ml.

[000252] Numa forma de realização preferida, os medicamentos, composições farmacêuticas e kits / formulações da invenção conterão o agente da invenção a uma concentração de 10 mg / ml.

[000253] Geralmente, em humanos, a administração parentérica dos agentes, os medicamentos, os compostos, composições farmacêuticas e kits / formulações da invenção é a via preferida, sendo a mais conveniente.

[000254] Para utilização veterinária, os agentes, os medicamentos, os compostos, composições farmacêuticas/formulações, e kits da invenção são administrados como uma formulação adequadamente aceitável de acordo com a prática veterinária normal e o cirurgião veterinário determinará o regime de dosagem e via de administração que será mais apropriada para um animal em particular.

[000255] A presente invenção também inclui composições farmacêuticas/formulações compreendendo sais de ácido ou de adição de base farmaceuticamente aceitáveis dos radicais da presente invenção ligação de polipéptido. Os ácidos que são usados para preparar os sais de adição de ácido farmaceuticamente aceitáveis dos compostos básicos acima mencionados úteis na presente invenção são aqueles que formam sais de adição de ácido não tóxicos, isto é, sais contendo aniões farmacologicamente aceitáveis, tais como o cloridrato, bromidrato, iodidrato, nitrato , sulfato, bissulfato, fosfato, fosfato ácido, acetato, lactato, citrato, citrato ácido, tartarato, bitartarato, succinato, maleato, fumarato, gluconato, sacarato, benzoato, metanossulfonato, etanossulfonato, benzenossulfonato, p-toluenossulfonato e pamoato [isto é, (2-hidroxi-3 naftoato)] 1,1'-metileno-bis-, entre outros.

[000256] Os sais de adição de base aceitáveis também pode ser utilizado para produzir formas farmaceuticamente aceitáveis de sais dos agentes (ou seja, de anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno) de acordo com a presente invenção.

[000257] As bases químicas que podem ser usadas como reagentes para preparar sais de base farmaceuticamente aceitáveis dos presentes agentes que são de natureza ácida são aqueles que formam sais de base não-tóxicos com tais compostos. Tais sais de base não tóxicos incluem, mas não estão limitados aqueles derivados de tais catiões farmacologicamente aceitáveis tais como catiões de

metais alcalinos (por exemplo, potássio e sódio) e catiões de metais alcalino-terrosos (por exemplo cálcio e magnésio), amónio ou de adição de amina solúveis em água sais, tais como N-metilglucamina- (meglumina), e o alcanolamónio inferior e outros sais de base de aminas orgânicas farmaceuticamente aceitáveis, entre outros.

[000258] As porções de agentes e / ou polipéptido de ligação da invenção podem ser liofilizados para armazenamento e reconstituídos num transportador adequado antes da utilização. Qualquer método de liofilização adequada (por exemplo, secagem por aspersão, a secagem do bolo) e / ou técnicas de reconstituição pode ser empregue. Será apreciado por aqueles peritos na arte que a liofilização e reconstituição pode conduzir a vários graus de perda de atividade do anticorpo (por exemplo, com imunoglobulinas convencionais, os anticorpos IgM tendem a ter maior perda de atividade do que os anticorpos IgG) e que os níveis de utilização podem ter de ser ajustados para cima para compensar. Numa forma de realização, o liofilizado (seco por congelação) polipéptido porção de ligação não perde mais do que cerca de 20%, ou não mais do que cerca de 25%, ou não mais do que cerca de 30%, ou não mais do que cerca de 35%, ou não mais do que cerca de 40%, ou não mais do que cerca de 45%, ou não mais do que cerca de 50% da sua atividade (antes da liofilização) quando re-hidratados.

[000259] De preferência, a invenção proporciona um anticorpo, composto, composição farmacêutica / formulação, kit, a utilização ou o método em que a quantidade eficaz do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenoé entre cerca de 0,0001 mg / kg a 50 mg / kg do anticorpo ou antígenoligaï¿½o ao seu fragmento.

[000260] Como é apreciado por aqueles peritos na arte, a quantidade exacta de um composto pode variar em função da sua atividade específica. As quantidades de dosagem adequadas podem conter uma quantidade pré-determinada de composição ativa calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o diluente requerido. Nos métodos e utilização para o fabrico de composições da invenção, uma quantidade terapeuticamente eficaz do

componente ativo é proporcionado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser determinada pelo profissional médico ou veterinário especialista normal com base em características do doente, tais como idade, peso, sexo, condição, complicações, de outras doenças, etc, como é bem conhecido na arte.

[000261] Um outro aspecto da invenção proporciona um método in vitro para reduzir ou inibir a atividade da enzima TG2, o método compreendendo a administração de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção, ou de um polinucleotídeo de acordo com a invenção, ou um composto ou kit da presente invenção, a uma amostra que compreende TG2.

A "amostra" pode ser qualquer amostra obtida a partir de uma fonte apropriada, por exemplo uma fonte de mamífero. Por exemplo, a amostra pode ser uma amostra de tecido ou célula compreendendo TG2. Tecidos exemplificativos incluem tecido obtido a partir do cérebro de um paciente, do tracto gastro-intestinal, pulmão, pâncreas, fígado, pele, rim, olho, coração, vasos sanguíneos, nódulos linfáticos, coluna vertebral, e no músculo esquelético ou lisa.

A invenção também proporciona um método de redução ou inibição da atividade da enzima TG2 num indivíduo com necessidade do mesmo, compreendendo o método a administração de uma quantidade eficaz de um polinucleotídeo que codifica um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção , ao indivíduo.

[000262] Um aspecto adicional proporciona a utilização de um polinucleotídeo que codifica um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção , no fabrico de um medicamento para reduzir ou inibir a atividade da enzima TG2 num indivíduo que dele necessite.

A invenção também fornece um método in vitro para reduzir ou inibir a atividade da enzima TG2, o método compreendendo a administração de um polinucleotídeo que codifica um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção, a uma amostra que compreende TG2, por exemplo, um tecido

ou amostra de células compreendendo TG2In Ainda num outro aspecto, a invenção proporciona um método de produção de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com o segundo aspecto da invenção, ou um composto da invenção compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com a segunda aspecto da invenção, o método compreendendo a expressão de um polinucleotídeo da invenção, ou a cultura de uma linha celular hospedeira estável da invenção.

[000263] Num outro aspecto, a invenção proporciona um método de selecção de um anticorpo ou seu fragmento que se liga seletivamente a uma proteína transglutaminase de ligação ao antígeno, compreendendo o método o passo de selecionar um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenoque se liga seletivamente a um poliptido compreendendo uma transglutaminase região central/domínio catalítico, mas não compreende o barril transglutaminase ou domínio sanduíche.

[000264] Num outro aspecto, a invenção proporciona um método de selecção de um anticorpo ou seu fragmento de acordo com o primeiro ou segundo aspectos da invenção, ou um composto da invenção compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com o primeiro ou de ligação ao antígenosegundo aspecto da invenção, o método compreendendo o passo de selecionar um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenoque se liga seletivamente a uma sequência de polipéptido que consiste na sequência de aminoácidos do polipéptido 143-473 de TG2 humana ou um seu fragmento. Numa forma de realização, o método pode ser realizado utilizando exibição em fagos de anticorpos. É preferível que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenoé um anticorpo inibidor que inibe a atividade catalítica da proteína transglutaminase.

[000265] Num outro aspecto, a invenção proporciona um método de produção de um anticorpo ou seu fragmento que se liga seletivamente a uma proteína

transglutaminase de ligação ao antígeno, compreendendo o método a administração a um animal não-humano compreendendo um composto:

i) um polipéptido compreendendo uma região de núcleo de transglutaminase/domínio catalítico, mas que não compreende um tambor de transglutaminase ou o domínio de sanduíche, ou um seu fragmento; e, opcionalmente,

ii) um adjuvante.

[000266] Prevê-se que o polipéptido compreende uma região de núcleo de transglutaminase/domínio catalítico, mas que não compreende um tambor de transglutaminase ou sanduíche de domínio compreenderá a tríade catalítica descrita acima, e, opcionalmente, também o local de ligação de GTP da proteína transglutaminase.

Numa forma de realização, o método pode ainda compreender o passo de selecionar um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenosobre a base da sua ligação seletiva a uma proteína transglutaminase.

[000267] Num outro aspecto, a invenção proporciona um método de selecção de um anticorpo ou seu fragmento que se liga seletivamente a uma proteína transglutaminase de ligação ao antígeno, compreendendo o método o passo de selecionar um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenoque se liga seletivamente a uma sequência polipeptídica que consiste em a sequência polipeptídica dos aminoácidos 143-473 de TG2 humana ou um seu fragmento.

[000268] Ainda num outro aspecto, a invenção proporciona um método de produção de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenode acordo com qualquer aspecto da invenção , compreendendo a administração a um animal não-humano compreendendo um composto:

i) uma sequência de polipéptido que consiste na sequência de aminoácidos do polipéptido 143-473 de TG2 humana ou um seu fragmento; e, opcionalmente,

ii) um adjuvante.

[000269] Numa forma de realização, o método pode ainda compreender o passo de selecionar um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígenosobre a base da sua ligação seletiva ao TG2, por exemplo TG2 humano.

[000270] Num outro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ser obtida por qualquer um dos métodos anteriores de produção ou selecionar um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno.

Por "adjuvante" incluímos qualquer um agente farmacológico ou imunológica que aumenta a resposta imune do receptor para o polipéptido da invenção. Os adjuvantes imunológicos são adicionados às vacinas para estimular a resposta do sistema imunitário para o antígenoalvo, mas não em si próprios conferir imunidade. Exemplos de adjuvantes incluem emulsões de óleo, compostos inorgânicos tais como sais de alumínio, por exemplo, hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, compostos orgânicos, tais como esqualeno, virossomas, ou qualquer outro composto adequado ou compostos, como seria compreendido por uma pessoa com conhecimentos na arte.

[000271] Num outro aspecto, a invenção proporciona um polipéptido isolado constituído por:

i) a sequência polipeptídica dos aminoácidos 143-473 de TG2 humana;

ii) a sequência polipeptídica dos aminoácidos 304-326 de TG2 humana;

iii) a sequência polipeptídica dos aminoácidos 351-365 de TG2 humana;

iv) a sequência polipeptídica dos aminoácidos 450-467 de TG2 humana; ou

[000272] um fragmento, derivado ou mimetizar polipéptido da mesma.

[000273] A invenção também proporciona um polinucleotídeo isolado que codifica o polipéptido do aspecto imediatamente anterior.

[000274] A invenção proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos para uso no tratamento de uma condição associada com atividade TG2 substancialmente como descrito aqui com referência à descrição e figuras.

[000275] A invenção também proporciona a utilização de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno como aqui substancialmente descrita com referência à descrição e figuras.

[000276] Tal como aqui utilizado, as formas singulares "um", "e", e "o" incluem referentes plurais a menos que o contexto indique claramente o contrário. Assim, por exemplo, a referência a "um anticorpo" inclui uma pluralidade de tais anticorpos e a referência a "dosagem" inclui referência a uma ou mais dosagens e seus equivalentes conhecidos dos peritos na arte, e assim por diante.

[000277] Todos os documentos aqui referidos são aqui incorporados por referência.

[000278] A invenção é agora descrita em maior detalhe por referência aos seguintes, não limitativos, Figuras e Exemplos.

[000279] Figura 1: Geração de uma proteína recombinante humana TG2

[000280] **A:** TG2 núcleo catalítico de cDNA foi gerado por PCR a partir do vetor pCIineo-hTG2 e inserido no plasmídeo pET 21a. Após a amplificação em E.Coli este foi digerido com Nhe I e Hind III para libertar o núcleo de cDNA TG2 e corridos num gel de agarose 1% (pista 3). As bandas foram dimensionados por referência a uma escada de 100 pb (pista 1) e λ ADN marcador de peso molecular (pista 2).

[000281] **B:** O núcleo vetor pET21a TG2 foi usada para transformar a estirpe de E. coli BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL. A expressão foi induzida utilizando IPTG durante 4 horas. Proteína do núcleo TG2 formado corpos insolúveis que foram recuperadas a partir de lisados por centrifugação. Estes foram re solubilizado, e o seu núcleo 37 kDa TG2 marcaram purificado sobre uma coluna de níquel. 10 ng foi separada por SDS-PAGE, Western borrada e sondadas com CUB7402 anticorpo anti TG2 (pista 2) com referência a uma precisão mais marcador de peso molecular (pista 1).

[000282] Figura 2: Resposta Imunológica em ratinhos a proteína do núcleo rhTG2

[000283] R: Teste de sangrias foram tomadas a partir de ratinhos imunizados 4 do núcleo catalítico no dia 45 após a primeira imunização e 10 dias após o segundo reforço. O soro foi diluído em série e reatividade verificada por meio de ELISA contra a proteína imobilizada núcleo TG2.

[000284] B reatividade foi ainda verificada por rastreados contra TG2 rh rh humana e TG2 domínio do núcleo catalítico. 20, 40, 80 ng de proteína foi fraccionado por SDS-PAGE e western transferidas para uma membrana de PVDF. Este foi immunoprobed com uma diluição 1: 1.000 de soro. O anticorpo de ligação foi revelada usando HRP específico anti-ratinho-γ cadeia. Para referência a um tamanho mais precisão marcador de peso molecular foi utilizado.

[000285] **Figura 3: Hybridoma Reatividade contra membros da família TG**

[000286] **A:** ELISA foram realizados utilizando placas revestidas com proteína recombinante TGs (100 ng / poço) para determinar a especificidade de tipo em TG 109 sobrenadantes de hibridoma que apresentaram uma boa reatividade para TG2. O anticorpo de ligação foi revelada usando HRP específico anti-ratinho-γ cadeia. A seleção aleatória dos selecionados é mostrado incluindo EF4, CG9 & FD8 que mostrou reatividade cruzada.

[000287] **B:** Nove hibridomas selecionados foram duplo clonado. IgG foi purificada e testada para a reatividade em 0.1ug / ml contra humana recombinante TG1, TG2, TG3, TG7 e Fator XIII utilizando ELISA com placas revestidas com 100 ng de cada TG. Os dados representam valor médio de 3 ELISA separado ± SEM.

[000288] Fator XIII é denotada em gráficos como TG13.

[000289] Figura 4: Identificação de hibridoma com atividade inibidora contra TG2

[000290] O meio condicionado a partir de 32 poços de hibridoma com especificidade para TG2 foram rastreados para os seus efeitos sobre a atividade de 100 ng rhTG2 utilizando o ensaio de incorporação de ^{3}H putrescina. A panela química TG2 inibidor 1,3-Dimetil-2 - [(2-oxo-propil) tio] imidazólio cloreto foi utilizado como um controle positivo para a inibição. RPMI (meio não condicionado) foi

utilizado um controle negativo. 500 ng de um anticorpo inibidor TG2 pilotado por Quark biotecnologia foi incluído para comparação. Os dados representam CPM constituída em 30 minutos a partir de pelo menos três experimentos realizados em duplicata ± SEM dizer. Bares mostrados em cinza mostram significativa inibição TG2 ($p < 0,05$).

[000291] **Figura 5: Mapeamento de epítopos do anticorpo inibitório**.

[000292] Cada anticorpo monoclonal inibidor estava ligado a uma placa de ELISA e garimpou contra uma biblioteca de fagos TG2 humano. De ligação ao anticorpo de fago foram resgatadas, amplificado e sujeito a mais quatro rondas de panning.

[000293] TG2 em fragmentos de bibliotecas de fagos foram então os sequenciados e as sequências que se sobrepõem utilizados para determinar o epítopo para cada anticorpo. Sequências comuns entre anticorpos foram então usados para determinar uma sequência de consenso para um epítopo inibitório e em particular anticorpos agrupadas em conformidade. Foram identificados três epítopos inibitórios.

[000294] **Figura 6: localização estrutural da Inibitória Epitopes com o Núcleo catalítico TG2**

[000295] A sequência de aminoácidos foi TG2 entrou em PyMOL e uma representação gráfica da estrutura 3D gerada na sua aberta, Ca2 + estado ativado com locais putativos de ligação do cálcio (turquesa) e a tríade catalítica (cinzento) mostrada para a referência (painel da esquerda). Os epítopos inibitórios de consenso foram então adicionados em azul (grupo Antibody 1 - local AB1), vermelho (grupo anticorpo 2 - local DF4) e amarelo (grupo anticorpo 3, local DD9).

[000296] Figura 7: Sequência de VL de anticorpos inibitórios ARN de cada hibridoma

[000297] inibitória foi extraída, a transcrição reversa e amplificado por PCR utilizando iniciadores degenerados FR1 um, MH1 e MH2 e iniciadores da região

constante 3 iniciadores para amplificar genes VH. As sequências de VH e VK resultantes são exibidas por AB1.

[000298] **Figura 8. Eficácia da AB1 para inibir a atividade TG2 num homogenato celular**

[000299] A: células Hep2G foram lisadas e 45 ug de proteína misturada com 750 ng de IgG de AB1, DH2, DD9, BB7, DC1 e EH6 durante 20 minutos. Este foi subsequentemente ensaiada usando o ensaio de atividade de TG ^{3}H putrescina incorporação com recolha de amostras durante 1 hora. A velocidade da reação foi calculada e expressa como uma percentagem do mesmo lisado incubado com um anticorpo aleatório (MAB002). Os dados representam a percentagem de inibição média ± EPM de duas experiências separadas realizadas em duplicado. * P <0,05 **B:** células HepG2 foram expostos a concentrações crescentes de glicose por 96 horas para regular-se a expressão TG2. As células foram recolhidas, lisadas e 25 ug de lisado fraccionadas por SDS-PAGE, Western borrada e, em seguida, com uma solução immunoprobed ml de 1 ng / AB1 de IgG utilizando um ponto final chemiluminesant.

[000300] Figura 9. (Tabela 1): comparativo Os valores de IC50 para os anticorpos inibitórios TG2.

[000301] Para determinar um valor de IC50 para cada um dos anticorpos contra o ser humano, rato e ratinho o ensaio de ^{3}H putrescina foi utilizado. 100 ng de TG2 humano ou 25 ng de ratinho e rato TG2 foi utilizado para gerar uma reação onde aproximadamente 3000 cpm de putrescina foram incorporados por hora em 10 ul da mistura de reação. As diluições em série de cada anticorpo foram, em seguida, aplicado a partir de adição de 500 ng (5 ug / ml de concentração final) à mistura de reação e incubado com a TG2 durante 20 minutos antes de ativar a reação. Os valores de IC50 foram calculados através da determinação da concentração para a qual a taxa de reação enzimática foi reduzida em 50% usando uma curva de ajuste apropriado no GraphPad Prism. Os valores são expressos como a quantidade de IgG em mg / ml na reação que iria inibir a 1 ng de TG2.

[000302] Figura 10. Atividade Extracelular TG em HK2 células em resposta à inibição TG2.

[000303] HK2 células foram plaqueadas em fibronectina e incubados durante 2 horas na presença de 0,1 M de cadaverina com biotina ou 4 ng/mL de anti-anticorpo humano TG2 (AB1) (parte A), 4 ng / mL de anti-anticorpo humano TG2 (DC1) (parte B) ou 400 micras da panela site-specific TG inibidor 1,3-Dimetil-2-[(2-oxo-propil) tio] imidazólio cloreto. Atividade extracelular TG foi medida pela incorporação de biotina cadaverina em fibronectina com incorporação revelada utilizando extravadin-HRP e substrato TMB. As alterações na densidade óptica foram medidas a 450 nm num leitor de placa de 96. Os dados representam média OD a 450 nm corrigida para 1 mg de proteína celular. n = 6 poços por grupo experimental.

[000304] **Figura 11. Comparação da inibição pelo anticorpo TG2 AB1 a um fragmento Fab de anticorpo TG2 inibidora da Quark usando um ensaio de incorporação de ^{3}H putrescina**.

[000305] 100 ng de hTG2 foi testado para a atividade TG2 baseado na incorporação de ^{3}H putrescina em dimetil caseina ao longo de um período de 60 minutos com a adição de 1 ug ou de um fragmento Fab de um anticorpo descrito por Quark em WO2006 / 100679 e sintetizado na Universidade de Sheffield ou de 500 ng AB1.

[000306] Dados representa a atividade TG média como a incorporação de ^{3}H putrescina (CPM) ± SEM de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

[000307] **Figura 12. Porcentagem de inibição comparação TG2 pelo anticorpo AB1 com um fragmento fab de TG2 anticorpo inibidor da Quark usando um ensaio de incorporação putrescina** ^{3}H

[000308] Os dados da Figura 11 é alternativamente expressa como uma percentagem de atividade de TG em cada ponto de tempo para exibir a queda da atividade comparativa relativa ao TG2 por aplicação de AB1 e o fragmento de anticorpo Fab Quark.

[000309] Figura 13. Comparação da inibição TG2 por AB1 a um anticorpo IgG de rato recombinante de TG2 anticorpo inibidor da Quark usando um ensaio de incorporação de ^{3}H putrescina

[000310] 100 ng de hTG2 foi testado para a atividade TG2 baseado na incorporação de ^{3}H putrescina em dimethylcasein ao longo de um período de 60 minutos com a adição quer de 500 ng de uma versão recombinante de rato de um anticorpo inibidor descrita por TG2 Quark em WO2006 / 100679 e sintetizado em Medicina Pesquisas Tecnológicas Conselho ou 500 ng de AB1.

[000311] Dados representam a atividade média do TG como a incorporação de ^{3}H putrescina (CPM) ± SEM de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

[000312] Figura 14. Porcentagem de inibição comparação TG2 pelo anticorpo IgG AB1 a um rato recombinante de TG2 anticorpo inibidor da Quark usando um ensaio de incorporação putrescina ^{3}H

[000313] Os dados da Figura 13 é alternativamente expressa como uma percentagem de atividade de TG em cada ponto de tempo para exibir o knockdown comparativa relativa de atividade TG2 por aplicação de AB1 e da Quark IgG de rato recombinante.

[000314]

Figura 15. Efeito da AB1 sobre os níveis de ECM em células HK2.

[000315] Níveis de colágeno maduras em HK-2 foram medidos por incorporação de ^{3}H prolina na ECM ao longo de um período de 76 horas com ou sem a adição de TG2 anticorpo inibidor AB1. Os dados representam a incorporação de ^{3}H prolina por mg de proteína celular expressa como uma percentagem do nível médio nas células não tratadas ± SEM. N = 2.

[000316] Figura 16. Ligação de ELISA de versões humanizadas de anticorpos.

[000317] Os sobrenadantes de células HEK293F co-transfectadas com diferentes combinações de cadeias leves humanizadas e vetores da cadeia pesada

foram ensaiadas numa ELISA de IgG anti-humana para determinar a concentração e num ELISA anti huTG2. Cada sobrenadante foi ensaiada em triplicado e IC50 do determinado. A combinação mais potente foi selecionada para estudos posteriores e que o anticorpo humanizado candidato.

[000318] Figura 17. Ensaios MRC Quark CTD190 em Tg2 humana por ELISA.

[000319] Placas de 96 poços foram semeadas com hTG2 (1 ug/ml) em tampão de carbonato durante a noite e detecção ELISA realizado utilizando 100 ng / ml de anticorpo primário. A detecção foi realizada utilizando anti-IgG de ratinho (SIGMA 3673) para CUB e anti-IgG de rato (Sigma A5795) para o Quark (ambos a 1: 5000). O anticorpo Quark feita por MRC T reage com TG2 humano.

[000320] Figura 18: RNA a partir do hibridoma AB1 foi extraída, a transcrição reversa e amplificado por PCR usando a sequência iniciadora degenerada sinal MHV4 com região constante da cadeia pesada iniciador MHCG1, ou usando a sequência iniciadora degenerada sinal MKV4 com uma cadeia leve kapa região constante iniciador MKC. As sequências de VH e VK resultantes são mostrados.

[000321] Figura 19: RNA a partir do hibridoma BB7 foi extraída, a transcrição reversa e amplificado por PCR usando a sequência iniciadora degenerada sinal MHV4 com região constante da cadeia pesada iniciador MHCG1, ou usando a sequência iniciadora degenerada sinal MKV4 com uma cadeia leve kapa região constante iniciador MKC. As sequências de VH e VK resultantes são mostrados.

[000322] Figura 20: RNA a partir do hibridoma DC1 foi extraída, a transcrição reversa e amplificado por PCR usando a sequência iniciadora degenerada sinal MHV4 com região constante da cadeia pesada iniciador MHCG1, ou usando a sequência iniciadora degenerada sinal MKV4 com uma cadeia leve kapa região constante iniciador MKC. As sequências de VH e VK resultantes são mostrados.

[000323] Figura 21: RNA a partir do hibridoma JE12 foi extraída, a transcrição reversa e amplificado por PCR usando um 5 'RACE PCR com região constante da cadeia pesada iniciador MHCG1, ou utilizando o iniciador MKV1 sequência de sinal

com uma cadeia leve kapa região constante iniciador MKC. As sequências de VH e VK resultantes são mostradas.

[000324] Figura 22: RNA a partir do hibridoma EH6 foi extraída, a transcrição reversa e amplificado por PCR usando um 5 'RACE PCR com região constante da cadeia pesada iniciador MHCG2B, ou utilizando o iniciador MKV sequência de sinal com uma cadeia leve kapa região constante iniciador MKC. As sequências de VH e VK resultantes são mostrados.

[000325] Figura 23: RNA a partir do hibridoma AG9 foi extraída, reverso transcrito e amplificado por PCR usando a sequência iniciadora degenerada sinal MHV7 com região constante da cadeia pesada iniciador MHCG1, ou utilizando uma mistura de iniciadores de sequência degenerada de sinal MKV1 - 11 com uma constante de cadeia leve kapa região cartilha MKC. As sequências de VH e VK resultantes são mostrados.

[000326] Figura 24: RNA a partir do hibridoma AH3 foi extraída, a transcrição reversa e amplificado por PCR usando a sequência iniciadora degenerada sinal MHV7 com região constante da cadeia pesada iniciador MHCG2B, ou utilizando o iniciador MKV1 sequência de sinal com uma cadeia leve kapa região constante iniciador MKC. As sequências de VH e VK resultantes são mostrados.

[000327] Figura 25: RNA a partir do hibridoma DD9 foi extraída, a transcrição reversa e amplificado por PCR usando um 5 'RACE PCR com região constante da cadeia pesada iniciador MHCG2A, ou usando a sequência iniciadora degenerada sinal MKV5 com uma cadeia leve kapa região constante iniciador MKC. As sequências de VH e VK resultantes são mostrados.

[000328] Figura 26: RNA a partir do hibridoma foi extraída DH2, transcrição reversa e amplificado por PCR usando um 5 'RACE PCR com região constante da cadeia pesada iniciador MHCG2B, ou usando a sequência iniciadora degenerada sinal MKV45with um kappa de cadeia leve da região constante iniciador MKC. As sequências de VH e VK resultantes são mostrados.

[000329] Figura 27: RNA a partir do hibridoma DD6 foi extraída, a transcrição reversa e amplificado por PCR usando um 5 'RACE PCR com região constante da cadeia pesada iniciador MHCG2B, ou utilizando uma 5' RACE PCR com uma cadeia leve lambda região constante iniciador MLC. As sequências de VH e VL resultantes são mostrados.

[000330] Figura 28: RNA a partir do hibridoma IA12 foi extraída, a transcrição reversa e amplificado por PCR usando a sequência iniciadora degenerada sinal MHV9 com região constante da cadeia pesada iniciador MHCG1, ou usando a sequência iniciadora degenerada sinal CL14 com uma cadeia leve kapa região constante iniciador MKC. As sequências de VH e VK resultantes são mostrados.

[000331] Figura 29. Curvas de resposta dose e valores de IC50 para a inibição enzimática de humano recombinante TG2 por anticorpos anti-TG2 quiméricos, (a) cAB003, (b) cBB001, (c) cDC001, (d) cDD9001, (e) cDH001 e (f) o anticorpo comercial CUB7402 TG2. Os valores de IC50 são a média de três experiências independentes.

[000332] Figura 30. Curvas de resposta à dose e os valores de IC50 para a inibição enzimática de macaco cynomogulus TG2 recombinante por anticorpos anti-TG2 quiméricos (a) cDC001 e (b) o anticorpo comercial TG2 CUB7402.

[000333] Figura 31. Curvas de resposta à dose e os valores de IC50 para a inibição enzimática de humano recombinante TG2 por anticorpos anti-TG2 humanizados, (a) hBB001AA, (b) hBB001BB, (c) hAB005 e (d) hAB004.

[000334] Figura 32. Curvas de resposta à dose e os valores de IC50 para a inibição enzimática de macaco cynomogulus TG2 recombinante por anticorpos anti-TG2 humanizados (a) hBB01AA e (b) hAB004.

[000335] Figura 33. Curvas de resposta à dose e os valores de IC50 para a inibição enzimática de humano recombinante TG2 por anticorpos monoclonais de murino anti-TG2, (a) mAB003, (b) mBB001, (c) mDC001, (d) mDD9001, (e) e mDH001 (f) mDD6001.

[000336] Figura 34 - Ligação de ELISA de versões humanizadas de anticorpos AB1.

[000337] Os sobrenadantes de células HEK293F co-transfectadas com diferentes combinações de cadeias leves humanizadas AB1 e AB1 vetores da cadeia pesada foram ensaiadas numa ELISA de IgG anti-humana para determinar a concentração e num ELISA anti huTG2. Cada sobrenadante foi ensaiada em triplicado e IC50 do determinado. A combinação mais potente foi selecionado para estudos posteriores e que o anticorpo humanizado candidato.

[000338] E as curvas de ligação de dados de EC50

[000339] Figura 35. Resposta da dosagem de ELISA para detecção de anticorpos que se ligam a TG2 (a) anticorpos quiméricos cDD9001, cDH001, cDC001, comercial e TG2 CUB7402 anticorpo controle do mesmo isotipo, (b) anticorpo quimérico cBB001 e controle do mesmo isotipo humano e (c) anticorpo quimérico cAB003 e controle pareados por isótopo.

[000340] E as curvas de ligação de dados de EC50

[000341] Figura 36. Resposta da dosagem de ELISA para detecção de anticorpos que se ligam a macaco cinomólogo TG2 (a) anticorpos quiméricos cDD9001, cDH001, cDC001, comercial e TG2 CUB7402 anticorpo controle do mesmo isotipo, (b) anticorpo quimérico cBB001 e controle do mesmo isotipo e (c) anticorpo quimérico cAB003 e controle equiparado-isótopo.

[000342] Figura 37: resposta à dose de ELISA curvas de ligação e os dados de EC50 para os anticorpos que se ligam a TG2 humana (a) anticorpos humanizados hBB001AA, HBB001BB, TG2 e comercial CUB7402 anticorpo de controle de isotipo e (b) o anticorpo humanizado hAB004.

[000343] As curvas e os dados de EC50 para os anticorpos de macaco que se ligam a cynomogulus TG2 (a) controle os anticorpos humanizados hBB001AA, HBB001BB, TG2 e comercial CUB7402 anticorpo controle do mesmo isotipo e (b) o anticorpo humanizado hAB004 e combinou-isótopo de ligação

[000344] Figura 38. Resposta à dosagem ELISA.

[000345] **Figura 39: atividade de ligação AB1 Humanizado com TG2 extracelular**

[000346] A inibição da atividade extracelular TG2 produzido por células HK2 foi ensaiada utilizando um ensaio ELISA medindo a incorporação de biotina cadaverina em fibronectina. Uma curva exemplar que mostra a inibição da atividade TG2 por humanizado AB1 (hAB005) e o IC obtido é apresentado.

[000347] Figura 40: atividade de ligação Humanizado BB7 com TG2 extracelular.

[000348] A inibição da atividade extracelular TG2 produzido por células HK2 foi ensaiada utilizando um ensaio ELISA medindo a incorporação de biotina cadaverina em fibronectina. Uma curva exemplar que mostra a inibição da atividade TG2 por versões de BB7 humanizado (hBB001AA e hBB001BB) e os CIs obtidos é mostrada.

[000349] Figura 41: Citocalasina D, controle R281 e ZDON resultados do ensaio cicatrização e anticorpo CUB7402 resultados do ensaio de cicatrização.

[000350] Os ensaios de zero feridas foram realizadas utilizando WI-38 de células, após o plaqueamento e crescimento durante a noite, as células foram lavadas em meio sem soro e uma ferida zero gerado usando um Essen Ferida Maker. Meio foi removido e substitui com 95 ul / meio livre bem soro contendo anticorpos controles e testes. A placa foi colocada num Essen Incycte e o fechamento da ferida analisados usando o software Incucyte. Densidade Relativa ferida foi representada graficamente contra o tempo para os controles de citocalasina D, R281 e Z -Don (painel A) e o anticorpo CUB7402 comercial e citocalasina (painel B).

[000351] Figura 42: resultados do ensaio de cicatrização BB7 humanizado.

[000352] Os ensaios de cicatrização de feridas foram realizados utilizando WI-38 de células, após o plaqueamento e crescimento durante a noite, as células foram lavadas em meio sem soro e a cicatrização da ferida gerada usando um Essen

Ferida Maker. O meio foi removido e substituido com 95 ul / meio livre sem soro contendo anticorpos controles e testes. A placa foi colocada em um Essen Incycte e a cicatrização da ferida analisada usando o software Incucyte. Densidade Relativa ferida foi representada graficamente contra o tempo para o AA hBB001 humanizado e o controle citocalasina D (painel A) e hBB001BB e o controle citocalasina D (painel B).

[000353] Figura 43: resultados do ensaio de cicatrização AB1 humanizado.

[000354] Os ensaios de zero feridas foram realizadas utilizando WI-38 de células, após o plaqueamento e crescimento durante a noite, as células foram lavadas em meio sem soro e uma ferida zero gerado usando um Essen Ferida Maker. Meio foi removido e substitui com 95 ul / meio livre bem soro contendo anticorpos controles e testes. A placa foi colocada num Essen Incycte e o fechamento da ferida analisados usando o software Incucyte. Densidade relativa foi ferida em função do tempo para o hAB005 humanizado eo controle citocalasina D

[000355] Figura 44: resultados do ensaio quiméricos DC1 zero.

[000356] Os ensaios de zero feridas foram realizadas utilizando WI-38 de células, após o plaqueamento e crescimento durante a noite, as células foram lavadas em meio sem soro e uma ferida zero gerado usando *Essen Wound Maker*. Meio foi removido e substituiu com 95 ul/meio livre bem soro contendo anticorpos controles e testes. A placa foi colocada num *Essen Incycte* e o fechamento da ferida analisados usando o software Incucyte. Densidade Relativa ferida foi representada graficamente contra o tempo para o anticorpo quimérico cDC001 e o controle de citocalasina D

[000357] Figura 45: ligação TG2 Humano à cAB003 anticorpo imobilizado por Biacore. As fases de associação de injecções TG2 humanos sobre o biossensor cAB003-revestidos com 25, 50, 100 e 200 nM, incluindo em duplicado, em 50 nM, estão apresentados no lado esquerdo. Da mesma experiência, duas fases de dissociação de comprimento foram recolhidas, como mostrado à direita. Ajustes

são mostrados como linhas pretas cheias e os resultados são apresentados na Tabela 25.

[000358] **Figura 46: ligação Macaco cinomolgos TG2 para hAB004 anticorpo imobilizado por Biacore.** As fases de associação do macaco cinomolgo TG2 injecções ao longo do biossensor hAB004-revestidos com 25, 50, 100, 200 e 400 nM, incluindo em duplicado, em 50 nM, estão apresentados no lado esquerdo. Da mesma experiência, duas fases de dissociação de comprimento foram recolhidas, como mostrado à direita. Ajustes são mostrados como linhas pretas cheias e os resultados são apresentados na Tabela 26.

[000359] **Figura 47: ligação TG2 humano para o anticorpo imobilizado cDH001 por Biacore, na ausência de cálcio.** As fases de associação de injecções TG2 humanos sobre o biossensor cDH001-revestidos com 25, 50, 100 e 200 nM, incluindo em duplicado, em 50 nM, estão apresentados no lado esquerdo. Da mesma experiência, duas fases de dissociação de comprimento foram recolhidas, como mostrado à direita. Ajustes são mostrados como linhas pretas cheias e os resultados são apresentados na Tabela 25.

[000360] Exemplo 1: Desenvolvimento de um anticorpo inibidor TG2 adequado para uso terapêutico no homem com a identificação de três inibidores de epítopos específicos.

[000361] A transglutaminase tipo 2 (TG2) catalisa a formação de um ε- (γ-glutamil) lisina ligação isopéptido entre péptidos ou proteínas adjacentes, incluindo aqueles da matriz extracelular (ECM). TG2 extracelular elevada leva à deposição de ECM acelerado e redução da depuração que subjaz tecido cicatricial e fibrose. Ela também está ligada à doença celíaca, doenças neurodegenerativas e alguns cânceres. Enquanto numerosos compostos têm sido desenvolvidos que inibem as transglutaminases, nenhuma destas são específicas para TG2, inibindo todas as transglutaminases em alguma extensão. Embora estes tenham permitido a prova de conceito estudos para o papel da TG2 nestas patologias, a falta de especificidade da isoforma tem impedido a sua aplicação no homem. Para resolver

isso, nos propusemos a desenvolver uma alta afinidade TG2 anticorpo específico que inibisse única atividade TG2.

[000362] Uma proteína recombinante englobando os aminoácidos 143-473 do núcleo TG2 humana foi produzida em Escherichia coli, redobrada e 100 ug injectados em ratos com quatro impulsos a 2, 5, 7, e 10 semanas. Os baços foram recuperados 4 dias após o reforço final e os esplenócitos fundidos com células SP2 / 0-Ag-14 células de mieloma. Setenta e cinco sobrenadantes dos hibridomas revelou a especificidade TG2. Estes sobrenadantes de hibridoma foram rastreados quanto à sua capacidade para inibir a atividade TG2 em um ensaio de incorporação de putrescina contendo 100 ug de TG2. Dez TG2 sobrenadantes foram inibidoras específicas. Estes foram posteriormente duplo clonado. Usando de apresentação de fagos para rastrear uma biblioteca de fragmentos de TG2, cada anticorpo foi mapeado para um epítopo preciso no domínio do núcleo TG2 e três epítopos distintos inibitórios determinados. A quantidade de anticorpo para reduzir a atividade a partir de 100 ng de TG2 em 50% foi determinada.

[000363] A dois anticorpos mais eficazes, AB1 e DC1 ligado aos aminoácidos 304-327 e tinha um IC50 de 1,1 x 10-5 mg/ml de IgG por ng de recombinante TG2. Aplicação de AB1 & DC1 foi capaz de inibir TG2 com sucesso em células Hep2G humanos e TG2 extracelular em humanos HK-2 células quando aplicada ao meio de cultura.

[000364] Assim, a imunização de ratinhos com o domínio do núcleo TG2 surpreendentemente permitiu a geração de anticorpos monoclonais que têm como alvo previamente epítopos não declarada dentro do núcleo catalítico. Estes anticorpos são específicos, inibir a atividade de forma eficaz e TG2 são adequados para aplicação in vivo.

[000365] Materiais e Métodos

[000366] Transglutaminase 2 produção domínio núcleo catalítico

[000367] O domínio do núcleo catalítico de TG2 humanos (resíduos Cys143 - Met 473 de TG2) foi expressa, redobrada e purificada para permitir que a imunização em ratinhos. O domínio do núcleo catalítico (PCR iniciador com sentido GCG CGC TGC AGC TGC GCG CCA GAT GCT GTG TAC CTG GAC, anti-sentido GCG CGC CTT AAG CAT CCC TGT CTC CTC CTT CTC GGC CAG) foi clonado no vetor de expressão pET21a (+) e expressa como corpos de inclusão insolúveis em E. coli estirpe BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL (Agilent Technologies). Em resumo, 50 ul de BL21 competentes (DE3) pLysS foram transformadas com 1 ul do plasmídeo de expressão (30 ng / ul) e plaqueada em placas de ágar LB contendo os antibióticos seletivos (100 ug / ml de ampicilina, 34 ug / ml de cloranfenicol) e 1% de glucose e incubadas durante a noite a 37 ° C. Uma única colónia foi escolhida para semear 10 ml de meio LB fresco contendo 100 ug / ml de ampicilina, 34 ug / ml de cloranfenicol e 1% de glucose em agitação numa estufa a 37 ° C e a 200 rpm. Após crescimento durante a noite, as culturas foram transferidas em 100 ml de YT 2 × meios de comunicação com glicose a 1% e cresceu a uma DO600nm de 0,8 e, em seguida, transferidos para o meio 2xYT 1L até a DO600nm atingiu 0,8 again.After indução de 4 horas sob 1 mM de IPTG para estimular a expressão, e sedimentadas bactérias foram lisadas por sonicação em tampão A (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; DTT 10 mM; PMSF 1 mM; 0,5 mg / ml de lisozima comprimidos inibidores da protease (Roche), pH 8,0). Os corpos de inclusão foram colhidos por centrifugação a 40.000 x g e lavou-se três vezes em tampão de lavagem B (Tris 50 mM; EDTA 1 mM; DTT 10 mM; desoxicolato de sódio a 2%, pH 8,0) antes de uma lavagem final em água desionizada.

[000368] Os corpos de inclusão foram solubilizados em tampão de 3.5mls ressolubilização (40 mM Tris-HCl, ureia 8 M, DTT 10 mM e pH 12) e redobrado ao longo de um período de 16 horas em tampão de re-enrolamento (40 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 20% glicerol; 5 mM de cisteína; 0,5 mM de cistina pH 8) a 4 ° C no escuro.

[000369] Os corpos de inclusão foram resolubilised carregado numa coluna de níquel de 1 ml. Resumidamente, a coluna foi pré-equilibrada com tampão de ligação (40 mM Tris; NaCl 300 mM; imidazole 10 mM) e os corpos de inclusão aplicadas. A coluna foi extensivamente lavada (40 mM Tris; NaCl 300 mM; imidazole 30 mM). A proteína recombinante foi eluída por tampão de imidazol alta concentração (40 mM Tris; NaCl 300 mM; imidazole 300 mM). Frações de proteínas contendo eluídas foram reunidas e dialisadas durante a noite contra um tampão apropriado (40 mM Tris; 300 mM de NaCl, pH 8). A proteína foi avaliada utilizando o ensaio de proteína de Bradford

[000370] HepG2 cultura celular e lisados

[000371] As células HepG2 foram gentilmente fornecidos por Richard Ross (Universidade de Sheffield). As células foram rotineiramente cultivadas a 37 ° C numa atmosfera humidificada de 95% de 5% de CO2 em DMEM / 4,5 g por litro de glucose suplementado com 10% de soro fetal de vitelo (FCS), 100 UI de penicilina e 100 ug / ml de estreptomicina, 2 mM de L -glutamina (todos GIBCO). Dois milhões de células foram semeadas em pratos de 10 centímetros e crescido durante 48 horas. As células foram lisadas em 250 ul de tampão STE (0,32 M de sacarose, Tris a 5 mM, EDTA 1 mM contendo inibidores de protease fluoreto de fenilmetilsulfonilo (1 mM), benzamidina (5 mM), leupeptina e (10 ug / ml) e sonicada em gelo para produzir um ligado de células utilizável em ensaio da atividade de TG2.

[000372] Rim humano (células 2 HK2):

[000373] HK-2 (células de rim do epitélio tubular proximal) foram adquiridos a partir da colecção de culturas de células Europeia na passagem 3. As células foram rotineiramente cultivadas a 37 ° C numa atmosfera humidificada de 95% de 5% de CO2 em meio isento de soro de queratinócitos (KSFM, Gibco 17005 -042) com L-glutamina, suplementado com EGF recombinante (0.1-0.2ng / ml) e extracto de pituitária bovina (20-30ug / ml). Para passagem, os meios foram removidos e lavados uma vez com 1 x PBS antes trypsinising com 1 ml de 0,25% de tripsina /

EDTA (frasco T75), durante 1 minuto a 37 ° C. As células foram ressuspensas em 10 ml de KSFM e centrifugado a 400 g durante 1 minuto. O meio foi removido e as células semeadas em KSFM (1: 3-1: 5 divisão é normal). As células foram utilizadas experimentalmente em passagens 14/05. As células cresceram bem tipicamente a 95% de confluência.

[000374] Coloração com Coomassie e transferência de western.

[000375] A pureza das proteínas recombinantes foi verificada passando 5 ug da proteína recuperada em 10% (w / v) de poliacrilamida desnaturante em gel e coloração com uma solução de Azul Brilhante de Coomassie R coloração (Sigma).

[000376] Confirmação de TG2 síntese de proteínas do núcleo, bem como os níveis de reatividade do núcleo TG2 e TG2 após imunização foram todos medidos por transferência Western. As proteínas recombinantes (10-80 ng) foram carregados em um 10% (w / v) de desnaturação de poliacrilamida ou em gel não desnaturante, conforme necessário e transferidas para membranas de PVDF (Transblot SD, Biorad, Reino Unido) durante uma hora a 100 V. As membranas eram bloqueadas durante a noite a 4 ° C com 3% (w / v) BSA em TBS / 0,1% (v / v) de Tween 20. As membranas foram então lavadas e sondadas com anticorpos monoclonais de ratinho anti-transglutaminase em TBS / Tween contendo BSA a 1% . Para a prova de proteína recombinante núcleo TG2 e como um controle positivo para o rastreio de anticorpos os anticorpos comercial Cub7402 (NeoMarkers) foi utilizado a uma diluição de 1: 1000. A ligação do anticorpo primário foi detectado com o anti-rato-cadeia gama-HRP ligada anticorpo secundário (Sigma, Poole, Reino Unido). As bandas foram visualizadas usando o sistema de detecção quimioluminescente ECL (Amersham, Reino Unido).

[000377] Rato de imunização e de fusão

[000378] Cada ratinho foi imunizado com uma mistura de 50 ug de antígeno(fez-se a um volume de 50 ul com PBS estéril) e 50 ul de adjuvante completo de Freund. Quatro (8-12 semanas de idade) ratinhos BALB / C foram injectados. Duas imunizações foram realizadas de impulso (dia 14 e dia 35), usando

o mesmo procedimento com a excepção de que o adjuvante incompleto de Freund foi utilizado para estas injecções. No dia 45, os sangramentos de ensaio foram obtidas de todos os animais e avaliada quanto a reatividade por ELISA para TG2.

[000379] Os dois melhores respondedores foram ainda potenciado pela injeção de 100 ug de proteína do núcleo (em PBS) de novo misturado com adjuvante incompleto de Freud às 10 semanas e 4 dias mais tarde os animais foram sacrificados para a recuperação de esplenócitos e de fusão com células Sp2 / 0-Ag-14 As células de mieloma. A partir desta fusão, cerca de 1000 poços foram pesquisados quanto à reatividade à proteína TG2 por ELISA.

[000380] Triagem para TG2 especificidade

[000381] O meio condicionado ou IgG purificada foram testadas quanto à reatividade com os membros da família de transglutaminase. A capacidade de cada um para se ligar a cada transglutaminase (TG1, TG2, TG3, TG5, TG7 e Factor XIIIa; todos Zedira) foi determinada usando um ensaio de ligação do prato. As placas de microtitulação (Costar, Cambridge, Reino Unido) foram revestidas com recombinante TG (Zedira, Darmstadt, Alemanha) em 50 ul de 0,1 M de bicarbonato / tampão de carbonato (pH 9,6) durante a noite a 4 ° C. As placas foram bloqueadas durante 2 h a 37 ° C com 200 ul de PBS contendo 3% w / v BSA. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (tampão de lavagem) e 100 ul de meio condicionado diluído (diluição 1: 5 a 1:20) ou purificada anti-TG2 núcleo catalítico mAbs foi adicionado. As placas foram incubadas durante mais 1 h à temperatura ambiente. O passo de lavagem foi repetido e anti-ratinho cadeia gama-peroxidase de rábano (1: 5000) em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (v: v) e 1% de BSA (w: v) (Sigma, Poole, Reino Unido) foi adicionado durante 1 h. Após oito lavagens, a ligação foi revelada com 50 ul de substrato 3,3 ', 5,5'-tetrametilbenzidina. A reação foi parada pela adição de 25 ul de 0,1 M de H_2SO_4 e a absorvância a 450 nm foi determinada.

[000382] Triagem para inibição TG2

[000383] TG atividade é medida pela incorporação de Ca2 + dependentes de ^{3}H-putrescina em N ', N'-dimethylcasein. TG2 humana recombinante (100 ng) foi pré-incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente com a amostra de ensaio (meio condicionado ou IgG purificada) antes de iniciar a reação. Vinte e cinco ul de mistura reaccional (5 ul de CaCl2 25 mM, 5 ul de 40 mM ditiotreitol, 5 ul mistura de ^{3}H-putrescina, e 10 uL de 25 mg / ml de N, N dimethylcasein '(substituir CaCl2 25 mM com 100 mM EDTA para um controle não-enzimática) foi adicionado para iniciar a reação e as amostras incubadas a 37 ° C durante até 1 hora. Alíquotas de 10 ul foram vistos numa tira de papel de filtro 3 MM Whatman e imediatamente mergulhados em gelo-frio 10% de ácido tricloroacético (TCA), a fim de precipitar as proteínas de ligação cruzada, tipicamente no tempo 0, 10, 30 e 60 minutos de reação. Depois de três lavagens extensas em gelada TCA a 5%, seguido por 3 lavagens com gelada etanol a 95%, secou-se o filtro de ar foi contado em 2 ml de fluido de cintilação (Packard Ultima Gold, Perkin Elmer). a velocidade da reação foi calculada. 1 unidade de TG é equivalente à incorporação de 1 nmol de putrescina por hora a 37oC.

[000384] O mesmo protocolo foi utilizado para avaliar a inibição TG em lisados celulares, substituindo os 25 ul de proteína recombinante com 25 ul de lisado de células.

[000385] Hibridoma clonagem e purificação de anticorpos a partir de meio condicionado

[000386] Isolamento anticorpo monoclonal foi realizada a partir dos hibridomas inibitórios clonados. Inicialmente poços de hibridoma duplamente clonadas foram identificados por um processo de diluição limitada (para assegurar a estabilidade e clonalidade) de acordo com métodos convencionais (Loirat MJ et al, 1992) com sub-clones testados, tal como descrito por ELISA e telas de atividade. Os clones que produzem anticorpo selecionadas foram expandidas em 25 e 75 cm2 frascos e alimentadas com meio isento de soro (Hyclone, Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido). Como as células foram expandidas, o meio condicionado foi

recolhido para purificação de IgG utilizando cromatografia de afinidade em coluna de proteína G (Amersham Life Sciences). O meio condicionado foi diluído em igual volume de fosfato de sódio 10 mM, pH 7,25, e aplicado à coluna de proteína G, a uma taxa de fluxo de 1,0 a 2,0 ml / min. A coluna foi extensivamente lavada com 10 volumes de coluna do mesmo tampão. O anticorpo ligado foi eluído em solução de glicina (0,1 M; pH 2,7) e neutralizou-se em 0,15% volumes de 1M Tris/HCl, pH 9. As amostras foram dialisadas contra 1000 volumes de solução salina tampão de fosfato, durante 24 horas, com duas mudanças de tampão.

[000387] Mapeamento de epítopos de anticorpos exibição de fagos

[000388] A sequência de codificação de comprimento completo de TG2 humana foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase, utilizando os seguintes iniciadores; 5 'ATGGCCGAGGAGCTGGTCTTAGAGA 3' e TG2-FL-2 5 'GGCGGGGCCAATGATGACATTCCGGA 3' TG2-1-FL. O produto de amplificação de cerca de 2 kb foi purificado utilizando o kit de limpeza de PCR Qiagen (Qiagen) e digerido em fragmentos aleatórios utilizando RQ DNAse I (Promega). A reação RQ DNAse foi tratado com o fragmento Klenow da polimerase I de ADN e ADN-polimerase de T4 para gerar fragmentos de extremidades lisas. Estes foram purificados por electroforese em gel, e fragmentos na gama de 50-150 pb extraído utilizando kit de recuperação de gel Qiagen (Qiagen, Crawley Reino Unido).

[000389] Um vetor que apresenta o fago foi digerido com EcoRV, tratado com fosfatase alcalina e purificado por electroforese em gel e o kit de recuperação de gel da Qiagen. 100 ng do vetor purificado foi ligado a 15 ng dos fragmentos preparados sem corte de cDNA humano TG2. A ligadura resultante foi electroporado em células XL1-Azul electrocompetentes (Agilent Technologies) e a biblioteca de fragmentos resgatados com fago ajudante VCSM13 (Agilent). As partículas fágicas foram precipitadas com 2% de glucose e 4% de PEG 6000 e ressuspensas em PBS 0,1% Tween 20 (v: v) de BSA a 1% (w: v).

[000390] **Mapeamento de epítopos foi realizado utilizando o seguinte procedimento.** Poços de ELISA foram revestidos durante a noite a 4 ° C com 30

ug de anticorpo monoclonal em 100 ul de tampão de revestimento. O poço revestido foi lavada com PBS / Tween e bloqueados com 400 ul de 3% BSA em PBS (w: v) durante 1 h à temperatura ambiente. Aproximadamente 1010 partículas de fagos (100 ul) foram adicionados ao poço do bloqueados e incubados à temperatura ambiente durante 1 h. A cavidade foi lavada 8 vezes com 400 ul de PBS / Tween a 0,5% (v: v) e os fagos aderentes eluída com 0,2 M de glicina pH 2,2. Os fagos eluídos foram utilizados para infectar um hospedeiro ml de XL1-Blue e amostras semeada em agar LB (60 ug / ml de ampicilina, 15 ug / ml de tetraciclina), o hospedeiro remanescente foi adicionado a 100 ml de meio LB (60 ug / ml de ampicilina, 15 ug / ml de tetraciclina) e crescidas durante a noite a 37 ° C numa incubadora com agitação a 200 rpm para gerar a biblioteca enriquecida de fragmentos selecionados. Este processo de enriquecimento foi repetido cinco vezes e colônias aleatórios da rodada final foram selecionados para o seqüenciamento.

[000391] Determinação da sequência da região VL de anticorpo

[000392] primers

[000393] Iniciadores de sentido da cadeia pesada - Um par de iniciadores altamente degenerados FR1, MH1 e MH2 (Wang et al 2000), foram combinadas com os iniciadores da região constante 3 para amplificar genes VH.

MH1 5’ CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGTC 3’

MH2 5’CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC 3’

Camundongo-G1 5’

AGGCGCAGTACTACAATCCCTGGGCACAATTTTCTTGTCCACC 3’

Camundongo -G2a 5’

AGGCGCAGTACTACAGGGCTTGATTGTGGGCCCTCTGGG 3’

Camundongo -G2b 5’

AGGCGCAGTACTACAGGGGTTGATTGTTGAAATGGGCCCG 3’

Kappa primários

VK1 5’ CGCTGCGAGCTCGATATTGTGATGACBCAGDC 3’

VK2 5’ CGCTGCGAGCTCGAGRTTKTGATGACCCARAC 3’
VK3 5’ CGCTGCGAGCTCGAAAATGTGCTCACCCAGTC 3’
VK4 5’ CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGATGACACAGTC 3’
VK5 5’ CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACACAGAC 3’
VK6 5’ CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGCTSACYCARTC 3’
VK7 5’ CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACYCARTC 3’
VK8 5’ CGCTGCGAGCTCCAAATTGTTCTCACCCAGTC 3’
K-CONST 5’ GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCCTGTTGAA 3’

[000394] O RNA total foi extraído a partir de células de hibridoma monoclonais (~ 105 células) utilizando Trizol (GIBCO), de acordo com o protocolo do fabricante e quantificados por A260nm. cDNA foi sintetizada usando transcriptase reversa ImProm II (Promega) e iniciadores de hexâmeros aleatórios. A mistura de reação foi como se segue; 1 ug de RNA total, 0,1 ug de oligo (dN) 6, 12 ul de tampão ImProm II, 1 ul de dNTPs 10 mM (Promega), 8 ul de MgCl2 25 mM, 4 ul ImProm II de transcriptase reversa (Promega), tratada com DEPC-H2O até volume de reação total de 60 ul. A mistura de ARN e iniciador aleatório foi aquecida a 70°C durante 10 min e, em seguida, colocados em gelo. Os restantes componentes da reação foram adicionados e, em seguida, incubadas a 20°C durante 10 min, depois a 40°C durante mais 40 min.

[000395] A amplificação dos genes VH e VK foi realizada com GoTaq polimerase (Promega). Cada reação de 50 ul continha o seguinte; 2 ul de cDNA, 20 pmol de iniciadores sentido e anti-sentido, GoTaq tampão de reação de 10 ul, 1 ul de dNTPs 10 mM, MgCl2 5 mM 25 ul, 2,5 u da polimerase GoTaq, H2O para um volume final de 50 ul. As reações foram repetido 35 vezes usando as seguintes condições: desnaturar inicial 95 ° C 2 min; desnaturar a 94 ° C 1 min, 56°C recozimento 1 min, extensão a 72 ° C 1 min. Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel e clonado utilizando o kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen). Minipreps aleatórias de produtos de PCR de cadeia pesada e leve foram escolhidos para sequenciação.

[000396] Medição da atividade de TG extracelular

[000397] TG atividade extracelular foi medida por ELISA de célula modificada. HK-2 células epiteliais foram colhidas usando 0,1 M de EDTA ou 0,25% de tripsina / EDTA e colocadas em placas a uma densidade de 8 × 104 células / poço em meio isento de soro para uma placa de 96 poços que tinha sido revestida durante a noite com 100 ul / poço de fibronectina (5 ug / ml em 50 mM Tris-HCl pH 7,4) (Sigma, Poole, Reino Unido). As células foram deixadas ligar-se durante 2,5 h a 37 ° C na presença de 0,1 mM de biotina a cadaverina [N- (5 amino pentil biotinamida) de ácido trifluoroacético] (Molecular Probes, Eugene OR, EUA). As placas foram lavadas duas vezes com 3 mM de EDTA/PBS e as células removidas com 0,1% (w/v) de desoxicolato 5 mM em EDTA/PBS. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para determinação de proteínas. As placas foram lavadas com HCl 50mMTris- e cadaverina biotina incorporada revelada utilizando 1: 5000 extravidina HRP (Sigma, Poole, Reino Unido) durante 1 h à temperatura ambiente seguido por um TMB (3,3 ', 5,5'-tetrametilbenzidina) substrato. A reação foi parada com 50 ul de H2SO4 2,5 M e a absorvância foi lida a 450 nm.

[000398] Medição dos níveis de colágeno por marcação radioativa

[000399] As células foram semeadas a uma densidade de 3,75 × 106/10 cm2 de uma placa de Petri ou 1 x 106 / poço de uma placa de 6 poços. ECM colágeno foi avaliada pela marcação com 20 ICI de 3,4H prolina (1,0 mCi / ml, ICN). Rotulagem foi realizada durante 72 h, sob condições padrão de cultura de células. Após a marcação, o meio foi removido, as células lavadas com PBS e removidas com 2 ml de 0,25 M de hidróxido de amónio em 50 mM Tris pH 7,4 a 37 ° C durante 10 min. A fração solúvel foi recolhido e a concentração de proteína foi determinada usando o ensaio de ácido bicinconínico (BCA). Os pratos foram lavados extensivamente com o aumento dos volumes de PBS antes da ECM foi solubilizado com 2 ml de 2,5% (w / v) de SDS em 50 mM Tris pH 6,8. O prato foi raspada para assegurar a remoção completa do ECM e 200 IL foi medido por radioatividade num contador de cintilação beta. As contagens foram corrigidas por mg de proteína

celular solubilizado e expresso como uma percentagem do valor de controle significativo.

[000400] Geração de recombinante ratificado Quark IgG

[000401] Para fins experimentais, um ser humano-ratazana anticorpo quimérico a partir da sequência de um "humano" de cadeia simples Fv de um anticorpo humano contra a transglutaminase de tipo II foi gerado. O anticorpo é chamado QPCDTGII (abreviado para QCT), e as sequências das regiões variáveis estão disponíveis nos documentos WO 2006 / 100679A2.

[000402] Uma subclasse γ2a rato foi selecionado para as regiões constantes da cadeia pesada, removendo o local de glicosilação para reduzir a possibilidade de uma reação de ADCC nos animais de teste de rato. A região constante de rato selecionada para a cadeia pesada foi 013,593 (Bruggemann, M. Gene 74: 473-482 (1988); Bruggemann, M., livre, J., diamante, R., Howard, J., Cobbold, S. e Waldmann, H., Proc Natl Acad Sci EUA 83:... 6075-6079 (1986)) a partir da base de dados de Kabat (Kabat, eA, Wu, TT, Perry, HM, Gottesman, KS, e Foeller, C. Sequência de proteínas de Interesse imunológica. (NIH National Technical Information Service, 1991)). Isso para a cadeia leve kappa era 013.718 (Sheppard, HW e Gutman, GA Proc Natl Acad Sci EUA 78:.... 7064-7068 (1981)) a partir de Kabat.

[000403] Em resumo, de cadeia pesada e cadeia kapa sequências de codificação foram gerados por síntese de ADN (utilização de codões foi adaptado a um viés de codões de mamífero).

[000404] A síntese do produto do gene de cadeia pesada foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores QCT_HindIII e QCT_H_rev. O produto de PCR foi cortado com HindIII e NgoMIV e ligado no vetor de expressão MRCT. Clones de bactérias DH5ct competentes quimicamente transformadas pelo produto de ligação foram PCR-selecionados usando o HCMVi primers e rat_gamma1. Três clones gerando um produto de PCR com o tamanho previsto foram sequenciados.

[000405] O produto de síntese de gene da cadeia kappa foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores QCT_HindIII e QCT_L_rev. O produto de PCR foi cortado com HindIII e PpuMI e ligado no vetor de expressão pKN100. Clones de bactérias DH5ct competentes quimicamente transformadas pelo produto de ligação foram PCR-selecionados usando o HCMVi primers e rat_kappa. Três clones gerando um produto de PCR com o tamanho previsto foram sequenciados.

[000406] A expressão insert vetor codificação duplo para ambas as cadeias pesada e kappa foi gerado e transfectados em células HEK293T. Sobrenadante de cultura celular a partir de duas transfecções HEK293T grande escala foi reunido e purificados por afinidade numa proteína G-agarose a 1 ml de coluna utilizando um sistema de cromatografia ÄKTA Explorer, em conformidade com os protocolos do fabricante. Um único pico de OD 280nm de IgG eluída com tampão de eluição, e foi dialisado contra duas mudas de PBS. Este foi ensaiada tanto por absorção de UV a 280 nm, e por ELISA de rato IgG2a. O rendimento total foi de aproximadamente 700 ug por (OD280nm); 303,5 ug (por ELISA).

[000407] Humanização do Anticorpo AB1

[000408] Base de Dados do VH humano e VK cDNA

[000409] As seqüências protéicas de imunoglobulinas humanas e mouse a partir do Banco de Dados de Imunogenética internacionais 2009101 eo Kabat Database Release 5 de Seqüências de Proteínas de Interesse imunológica (última atualização 17-Nov-1999) 102 foram usados para compilar um banco de dados de sequências de imunoglobulina humana em um Kabat alinhamento. Nosso banco de dados contém 10.606 VH e 2.910 seqüências VK.

[000410] Modelo molecular da AB1

[000411] Um modelo de homologia das regiões variáveis do mouse anticorpo AB1 foi calculado usando o Modeller program103 corrida no modo automático. As coordenadas atômicas de um MQK.pdb, 3LIZ.pdb e 1MQK.pdb eram os mais altos modelos de seqüência de identidade para a interface, VL e VH, respectivamente,

como determinado pela análise da explosão da base de dados de anticorpos estruturas PDB Accelrys. Estes modelos foram usados para gerar 20 modelos iniciais, o melhor do que foi refinado modelando cada loop CDR com os seus 3 melhores modelos de alça.

[000412] Quadro de Seleção hAB1

[000413] O programa de análise de sequência, gibsSR, foi usado para interrogar as bases de dados de VH e VK humanos com as sequências de proteínas AB1 VHC, VKC e VKc1 usando vários critérios de selecção. Resíduos FW dentro 5Å de um resíduo de CDR (definição Kabat) no modelo de homologia de anticorpo de rato AB1, foram identificados e designados como os "5-A proximidade" resíduos.

[000414] AF06220 foi escolhido como o FW sobre a qual baseia a construção AB1 humanizado VHC inicial. A Tabela 1 mostra o alinhamento e o resíduo identidade de AF06220 de murino Ab1.

[000415] A Tabela 2 mostra o envelope 5Å proximidade das sequências. AF062260 tem apenas uma mutação somática de distância da sua linha germinal VH gene Z12347 (Tabela 3).

[000416] AY247656 foi escolhido como o FW sobre a qual basear o AB1 humanizado inicial VKC construir. O alinhamento eo resíduo identidade de murino AB1 são mostrados na Tabela 4; A Tabela 5 mostra o envelope 5Å proximidade das sequências. A sequência 5 mostra as mutações somáticas a partir da sua X93620 gene da linha germinal VK (Tabela 6).

[000417] AF193851 foi escolhido como o FW sobre a qual basear a construção inicial AB1 VKc1. O alinhamento eo resíduo identidade de murino AB1 são mostrados na Tabela 7. A Tabela 8 mostra o envelope 5Å proximidade das sequências. A sequência não mostra as mutações somáticas a partir do seu gene da linha germinal VK J00248 (Tabela 9).

[000418] Aglutinação ELISA

[000419] Células HEK 293F foram co-transfectadas com diferentes combinações de vetores de cadeia leve humanizadas, em associação com

diferentes vetores da cadeia pesada humanizadas. TG2 humana recombinante foi utilizada para medir a ligação do anticorpo por ELISA. Os resultados indicaram que a versão de Cadeia Pesada RHA (Tabela 10), em combinação com as versões de cadeia leve e RKE RKJ (Tabela 11) (representando as diferentes versões de cadeia leve humanizada) mostrou ligação ótima (Figura 16).

[000420] Versão Cadeia Pesada RHA é um enxerto modificado-un das regiões do mouse CDR do anticorpo AB1 para a seqüência do doador humano. No entanto, ambas as versões de cadeia leve e RKE RKJ, têm o mesmo único 5Å proximidade residem retromutação, F72 (numeração Kabat - mostrado em verde).

[000421] Este encontra-se fora da retromutação Vernier104, Canonical105 ou Interface106 resíduos (ver Tabela 11).

101. Lefranc,M.P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database(R). Nucleic Acids Res. 31, 307-310 (2003).

102. Kabat,E.A., Wu,T.T., Perry,H.M., Gottesman,K.S. & Foeller,C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH National Technical Information Service, (1991).

103. Eswar,N. *et al.* Comparative protein structure modeling using Modeller. Curr. Protoc. Bioinformatics. Chapter 5:Unit 5.6., Unit (2006).

104. Foote, J. & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol. Biol. 224, 487-499.

105. Morea, V., Lesk, A. M. & Tramontano, A. (2000). Antibody modeling: implications for engineering e design. Methods 20, 267-279.

106.Chothia, C., Novotny, J., Bruccoleri, R. & Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. J Mol. Biol. 186, 651-663.

Tabelas

Tabela 1

Números Kabat[2]	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
	-|--------|--------|--------|-----AB----|--------|--ABC-------|--------|--------|--ABC-------|--------|ABCDEFGHIJK--------|-
Vernier[4]	-.*.....****.....***.....*.*.*.*.*.*.....*.....**.....*.....
Canonical[5]	-.....1.11.1....1.....2...22.....2.....1.....
Interface[6]	-.....I...I.I.....I.I.....I.I.I.....I.....
Proximidade 5Å	**** * * **** *** *** ****** * * **** **
AB_VHc	-EVQLXESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS--WVRQTPDRRLEWVATISV--GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLI----------SLYWGQGTTLTVSS
AF062260	C....L.....Q.....R.....F..Y...--....A.GKG....SA..G--S..S...A.....S.....A....V.....DG----------GV.....LV....

Tabela 2

	5Å Proximity Residues
AB_VHc	EVQLCAFTLSWVRWVARFTISRNLYCAKWG
AF062260	.....F.....S.....

Tabela 3

```
                  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+--------
                           10        20        30        40        50        60        70        80        90
                  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+--------
Z12347.seq        EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
AF062260.seq      ..................................................................................................R     1
                                          <--->             <--------------->
```

Tabela 4

Números Kabat[2]	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
	-|--------|---------|-------ABCDEF--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----ABCDEF----|------A-
Vernier[4]	-.*.*.....**.....****.....*.*.**.*.....*.....
Canonical[5]	-.1.....1.....1111..1.....2..22.....2.....1.....3....3.....
Interface[6]	-.....I.I.....I.....I..I.....II.....
Proximidade 5Å	****** ** ** **** *** ********** ** **
AB_VKc	-EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFP------YTFGGGTKLEI-K
AY247656	-.....LS..V.D.....Q...------..SN..N.Y.....A..L...DASN.ET.....T..TF.....QP..F.T...Q..NTY.------L.....-.

Tabela 5

	5Å Proximity Residues
AB_VKc	EIVLTQTCWFTLIYGVPFSGSGSGQDFFYCFG
AY247656	.....YL.....T..T....

Tabela 6

```
                ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+------
                         10        20        30        40        50        60        70        80        90
                ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+------
X93620.seq      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLPP
AY247656.seq    E.VL.....................................................................FG.......NTY.L     5
                                  <--------->               <----->                                <-------
```

Tabela 7

Números Kabat[2]	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
	-|--------|---------|-------ABCDEF--|---------|---------|---------|---------|---------|-----ABCDEF----|------A-
Vernier[4]	-.*.*.....**.....****.....*.*.**.*.....*.....
Canonical[5]	-.1.....1.....1111..1.....2..22.....2.....1.....3....3.....
Interface[6]	-.....I.I.....I.....I..I.....II.....
Proximidade 5Å	****** ** ** **** *** ********** ** **
AB_VKc	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFP------YTFGGGTKLEI-K
AF193851	-.....LS..V.D.....R...------G.RN..A.....A..S...AASN.QS.....T..T.....QP..FAT...Q.HNTY.------W...Q...V..-.

Tabela 8

	5Å Proximity Residues
AB_VKc	DIQMTQTCWFTLIYGVPFSGSGSGQDFFYCFG
AF193851	.....S.....T..T....

Tabela 9

```
                  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+------
                           10        20        30        40        50        60        70        80        90
                  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+------
J00248.seq        DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPP
AF193851.seq      .............................R.....................N.....................................H.T..W     0
                                 <---------->              <----->                                  <-------
```

Tabela 10

Números Kabat	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
	-|--------|---------|---------|-----AB----|---------|--ABC-------|---------|---------|--ABC-------|---------|ABCDEFGHIJK---------|-
Vernier[4]	-.*.....****.....***.....*.*.*.*....*.....**.....*.....
Canonical[5]	-.....1.11.1....1.....2...22.....2.....1.....
Interface[6]	-.....I...I.I.....I.I.....I.I.I.....I.....
Proximidade 5Å	**** * * **** *** *** ****** * * **** **
AB_VHc	**-EVQLXESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS--WVRQTPDRRLEWVATISV--GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLI----------SLYWGQGTTLTVSS**
AB_RHA	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMS--WVRQAPGKGLEWVSTISV--GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI----------SLYWGQGTLVTVSS

Tabela 11

Números Kabat	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
	-|--------|---------|------ABCDEF--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----ABCDEF----|------A-
Vernier[4]	-.*.*.....**.....****.....*.*.**.*.....*.....
Canonical[5]	-.1.....1.....1111..1.....2..22.....2.....1.....3....3.....
Interface[6]	-.....I.I.....I.....I..I.....II.....
Proximidade 5Å	****** ** ** **** *** ********** ** **
AB_VKc	**-EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFP------YTFGGGTKLEI-K**
AB_RKE	-EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ------DINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFFTISSLQPEDFGTYYCLQYDDFP------YTFGGGTKLEI-K
AB_RKJ	-DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFP------YTFGQGTKVEI-K

RESULTADOS

Geração de proteína rh do núcleo TG2.

[000422] Para forçar a geração de anticorpos que seria mais provável que os epítopos alvo críticos para a atividade TG2, em vez de locais favorecidos na molécula TG2, nos ratinhos imunizados com o núcleo catalítico TG2, em vez de todo o comprimento TG2 molécula. Para gerar o domínio TG2 recombinante, um construto de PCR foi gerado em execução a partir de bases 329-1419 e inseridos no pET21 + (a) vetor (Figura 1A). Inserção e expressão deste vetor em células BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL bactérias resultou na geração de uma proteína insolúvel que abrange os aminoácidos 143-473 englobando todo o núcleo catalítico. Esta proteína foi solubilizada e redobrada em 40 mM Tris-HCl; NaCl 150 mM; 20% de glicerol; 5 mM de cisteína; 0,5 mM de cistina pH 8. 10 ng deste foi percorrida sobre um gel de poliacrilamida não redutor, ocidental borrada e immunoprobed com CUB7402. Uma banda clara era visível a 37 kDa, que é consistente com o tamanho previsto do núcleo TG2 (Figura 1B). Bandas maiores também eram imunorreativos para CUB7402 quais mais provavelmente representam agregados da proteína do núcleo em que não estavam presentes quando um gel redutor foi executado (dados não mostrados).

Imunização e fusão.

[000423] Quatro ratinhos foram imunizados com 50 ug de rhTG2 núcleo. Em aproximadamente cinco e nove semanas após a imunização, uma amostra de soro foi feita a partir de cada ratinho e testado para a reatividade contra rh TG2 por ELISA utilizando uma diluição em série do soro. Todos os ratinhos mostraram uma forte reação imunitária a rhTG2 núcleo, mesmo na diluição mais elevada utilizada (1: 51 000) (Figura 2A). Para confirmar que os anticorpos também reconhecem a full-length TG2, rhTG2 e proteína do núcleo rhTG2 foram corridos num gel não desnaturante, ocidental borrada e immunoprobed com uma diluição 1: 1000 de soro de ratinho (Figura 2B). O mouse com a reatividade mais forte (mouse C) contra

ambas as proteínas foi impulsionado e esplenócitos recuperado para a fusão com a Universidade de serviço Hybridoma de Sheffield, Bioserv.

Seleção de hibridoma positivo e clonagem.

[000424] Fora dos 400 poços de hibridoma selecionadas por Bioserv como positivos mais elevados, os sobrenadantes de 109 apresentaram reatividade persistente para TG2, no entanto, apenas 34 não reagiu com outros membros da família TG-chave quando testados em ELISA (exemplos representativos mostrados na Figura 3A). Aqueles que eram específicos para o sobrenadante TG2 tinha conferido pelo ensaio de incorporação de ^{3}H-putrescina para a capacidade de inibir a atividade de TG2 resultante a partir de 100 ng de TG2 (Figura 4). Esta tela inicial indicou que 10 sobrenadantes dos hibridomas foram capazes de inibir a atividade TG2 (AB1; DC1; BB7; EH6; DH2; DD9; JE12; AG9; AH3; DF4). Nove dos dez foram clonados com sucesso por diluição limitada. Para o clone DF4, embora clones foram isolados pós-clonagem, eles não parecem ser inibitório. Pós clonagem, IgG foi purificada a partir de cada hibridoma clonado e retestados para reatividade seletiva para TG2 (Figura 3B).

Potencial inibitório TG2.

[000425] Cada hibridoma clonado tinha IgG testadas para a sua atividade inibidora contra TG2 humano, rato e murganho TG2 e o IC50 calculada com base na quantidade de IgG necessária para inibir a 1 ng de TG2. Houve um intervalo de aproximadamente 12 vezes nos valores de IC50 contra TG2 humana que vão desde o mais eficaz AB-1 a 1.1x10-5 mg / ml de IgG para o JE12 menos eficaz na 1.1x10-5 12.3 mg / ml de IgG (Figura 9 ; Tabela 1). Curiosamente nós só foram capazes de determinar um IC50 para 4 anticorpos (DH2, DD9, EH6 e BB7) contra rato TG2 com o melhor, DH2 tendo um IC50 de 2,23 x 10-4 mg / ml de IgG sendo cerca de 6 vezes menos ativo do que TG2 contra humana e comparativamente 38 vezes menos ativa que a melhor AB-1 inibidor contra TG2 (Figura 9; Tabela 1). Nenhum dos anticorpos inibidores foram capazes de inibir rato TG2, provavelmente devido à tolerância imunológica.

Mapeando os epítopos de anticorpos inibidores

[000426] Para estabelecer quais os epítopos na TG2 eram imunologicamente única para TG2 enquanto inibidora, assim como estabelecer se estes 10 anticorpos foram visando as mesmas ou diferentes sítios, cada anticorpo foi mapeada usando exibição em fagos. Uma biblioteca de fagos foi construída e TG2 deslocada contra cada mAb. O epítopo foi então determinado por sequenciação de consenso de ligação dos fagos.

[000427] AB1, AG1, AH1, BB7, DC1, EH6 e JE12 tudo parecia ligar no todo ou em parte a um único epítopo (Figura 5), que abrange os aminoácidos 304-326 e parece sentar-se na frente do local ativo dentro de um bolso de ligação do substrato (Figura 6). Esta região que denominou site da AB-1 e chamadas anticorpos dirigidos neste site anticorpos Grupo 1.

[000428] DF4 exclusivamente como alvo uma sequência de correr desde o aminoácido 351-365 (Figura 5) que corre a partir da frente para trás do núcleo englobando Asp 358 na tríade catalítica (Figura 6). Este nós denominado Grupo 2.

[000429] E DH2 DD9 ligado a uma sequência que abrange os aminoácidos 450-467 (Figura 5). Estes anticorpos Grupo 3 se ligar a uma região na parte traseira do núcleo próximo da junção com β cano-1, que denominou o local DH2. O epítopo engloba um sítio de ligação de cálcio putativa (Figura 6).

Sequencia de Anticorpos

[000430] A fim de determinar a sequência da cadeia leve variável para cada anticorpo, de ARN a partir de cada hibridoma inibitória foi extraída, a transcrição reversa e amplificado por PCR utilizando um par de iniciadores altamente degenerados FR1, MH1 e MH2 iniciadores de ser combinado com os iniciadores da região constante 3 para amplificar VH genes.

[000431] As sequências de VH e VK resultantes são mostrados na Figura 7 para AB1.

[000432] A capacidade de AB1 para inibir a atividade TG2 em uma mistura de proteínas in vitro.

[000433] O anticorpo inibidor mais potente contra recombinante TG2 é AB1. Para ser de valor terapêutico, ele deve ser capaz de inibir a atividade não só TG2 em uma solução pura, mas também em uma solução de complexo de proteína e não de qualquer forma associar com outras proteínas. Para testar isto, um homogeneizado da linha celular de hepatócitos humanos HepG2 foi preparado. Aplicação de 0,5 ug de AB1 foi capaz de inibir 70% da atividade TG2 (Figura 8A). No entanto BB7 produziu uma inibição significativamente melhor derrubar 90% da atividade TG2. Imuno 25 mcg deste ligado com AB1 não mostrou associação alvo com uma única banda immunoreative em um tamanho correspondente a TG2 (Figura 8B).

[000434] A capacidade de AB1 e DC1 para inibir a atividade TG2 extracelular.

[000435] Para avaliar se estes anticorpos podem inibir a atividade de TG2 em um sistema celular. AB1 (Figura 10a) e DC1 (Figura 10b) foram aplicados a rim humano 2 (HK-2) células epiteliais tubulares na cultura e na atividade TG extracelular testadas utilizando o ensaio de biotina cadaverina. AB1 foi capaz de conseguir uma inibição de 60% e DC1 uma inibição de 55% da atividade quando aplicados a 4 ng / ul no meio de cultura, que foi comparável à panela química TG inibidor 1,3-Dimetil-2 - [(2-oxo propil) tio cloreto] imidazólio aplicado em 400uM.

[000436] Comparação de anticorpos AB1 com outros anticorpos inibidores conhecidos

[000437] Para testar a eficácia de AB1, em comparação com outros anticorpos conhecidos TG2 inibitórios ambos os fragmentos fab (figuras 11,12) e cheia de IgG (Figuras 13, 14) de um anticorpo como descrito por Quark biotecnologia em número de pedido de patente WO2006 / 100679 foram testados para TG2 inibir a atividade no ensaio de incorporação de ^{3}H putrescina. A atividade a partir de 100 ng de TG2 humana poderia ser inibida por 60 a 80% por 500 ng de AB1. Em comparação nem o fragmento Fab ou o total de IgG do anticorpo Quark poderia inibir significativamente TG2 neste ensaio.

[000438] Discussão

[000439] Há uma clara necessidade de validar TG2 como um alvo terapêutico no homem através de uma série de doenças em estudos experimentais têm sugerido seu envolvimento. Estas incluem tecido cicatricial, doença celíaca, doenças neurodegenerativas e quimio-resistência em alguns cancêrs. Limitando esta tem sido a falta de verdadeiramente TG2 compostos específicos que podem inibir seletivamente a atividade TG2 no homem.

[000440] Neste estudo, têm, pela primeira vez ratinhos imunizados com um fragmento de TG2 com o objectivo de ser capaz de isolar uma gama mais vasta de anticorpos anti TG2 contra o núcleo catalítico da enzima na busca de um epítopo inibitório. Isto provocou uma boa resposta imunitária com anticorpos que reconhecem tanto o núcleo rhTG2 e TG2 nativa, mas nenhum outro TG.

[000441] 10 dos anticorpos isolados mostrou atividade inibidora. Estes foram subsequentemente mapeado para 3 TG2 específica, ainda epítopos inibitórios. Estes anticorpos têm sido clonados, sequenciados e IgG isolado com valores de IC50 calculados. Três anticorpos (AB1, DC1 e BB7) visando um bolso substrato provou inibidores particularmente eficazes. O mais importante destes anticorpos também funcionou bem tanto em um ligado de células e na cultura de células, indicando que estes anticorpos têm o potencial para funcionar em um ambiente rico em proteína que é essencial para aplicação in vivo.

[000442] Acreditamos que um elemento-chave na geração bem sucedida destes anticorpos inibitórios tem sido a decisão de imunizar apenas com a proteína do núcleo. Para nossa nenhum dos anticorpos TG2 comerciais conhecimento tem potencial inibitório de qualquer significado. As nossas próprias tentativas para usar comprimento completo TG2 resultou em um grande número de anticorpos, alguns dos quais eram específicos para TG2 e nenhum dos quais foram inibidoras. Isto parece ser devido a uma preferência clara para loops imunogénico de proteína dentro de comprimento completo TG2 muitos dos quais caem sobre a parte de trás do núcleo catalítico em posições semelhantes ao anticorpo TG2 mais amplamente utilizado anti, CUB7402 (aa478 aa447).

[000443] É surpreendente que a nossa abordagem levou à produção de anticorpos muito mais eficazes. Sem estar limitado por qualquer teoria, pensamos que simplesmente criar anticorpos para uma proteína menor que cobre apenas o núcleo central, não só eliminam alguns dos epítopos imunológicos favorecidas, mas também forçar a segmentação do núcleo. Isto por si só aumenta a variedade de anticorpos disponíveis para a seleção e, portanto, a cobertura mais ampla do núcleo. No entanto, a imunização com apenas o núcleo significa que a maior parte da dobragem do núcleo é perdida e, assim, alguns dos epítopos que pode ser inferior, talvez, disponível dentro de uma molécula inteira TG2 podem ser epítopos mais atraentes com o núcleo neste formato. Dado que todos os 10 anticorpos reconheceram epítopos lineares (isto é, ligados a TG2 num gel redutor), enquanto que 80% dos anticorpos isolados que anteriormente usando TG2 comprimento completo como imunogénio foram: conformação dependente, não sugerem que isto pode ser um fator importante.

[000444] Houve anteriormente outros estudos que postulou a idéia de um anticorpo inibidor TG2 para aplicação humana. Esposito e colaboradores desenvolveram anticorpos recombinantes a partir de pacientes com doença celíaca, onde tem sido postulado que os anticorpos TG2 pode ter um papel inibitório [19]. Um desses anticorpos foi desenvolvido para aplicação comercial pela Quark Biotecnologia e um pedido de patente depositado (WO2006 / 100679). Este anticorpo demonstrou alguns dados iniciais excitantes na prevenção da fibrose renal no modelo de rato UUO. No entanto, nós produzimos uma versão recombinante deste anticorpo e ao mesmo tempo que reagiu com TG2 em ELISA (Figura 17) e western blot, obtivemos pouca inibição de até 500 ng de IgG por ng de TG2 para este anticorpo em que todos os anticorpos desenvolvidos neste bloco estudo essencialmente toda a atividade TG2. Além disso WO2006 / 100679 descreve a geração de uma versão do rato deste anticorpo humano, e como tal a longo aplicação, em modelos de rato de doença renal reconhecidos iria revelar-se difícil.

[000445] De notar, no presente estudo é o mapeamento dos epítopos 3 inibitórios dentro do núcleo TG2. O epítopo AB1 é de longe o mais potente para segmentar, o que é, talvez, surpreendente, dada a posição do epítopo. O exame da sua posição dentro da estrutura ativa TG2 previu [20] sugere que se liga na porta de entrada para a tríade catalítica, em que pode ser um substrato de bolso. Dado os substratos que usamos em nosso teste de pesquisa são relativamente pequenos (putrescina e dimetil caseína), é talvez surpreendente que este site é tão eficaz. No entanto, a posição do epítopo deve ser tal que a grande IgG (150 kDa) é posicionado firmemente no sítio catalítico. A partir dos dados epítopo pode-se prever que o local DD9 podem ser mais eficazes, uma vez que está associado com um local putativo de ligação de cálcio [21]. No entanto exame da literatura sugere 5 ou mais sítios de ligação putativos de Ca2 + [21] e ao mesmo tempo que tem claramente um efeito dramático, não é crítico para toda a atividade TG2.

[000446] O local DF4 seria hipoteticamente o epítopo mais eficaz como o anticorpo liga-se a um dos aminoácidos essenciais na tríade catalítica. No entanto, não foi possível clonar com sucesso DF4 produzir este anticorpo inibidor e, como tal, a produção de IgG suficiente para efetuar adequadamente testes de IC50 não foi possível. Ela pode de facto ser muito difícil de clonar a anticorpos que têm muito alta eficácia dado o trabalho de Günzler et al (1982) FEBS Lett. 150 (2): 390-6, que sugeriu que os linfócitos necessários atividade TG2 a proliferar e, portanto, anticorpos com melhor potencial inibitório somente poderá ser possível utilizando abordagens recombinantes ou um sistema de extração contínua IgG.

[000447] Um dos problemas mais frustrantes em realizar este trabalho tem sido a incapacidade aparente de todos os anticorpos desenvolvidos para bloquear a atividade TG2 não-humano, que é crítico para testes pré-clínicos de forma eficiente. Todos os anticorpos reagiram com ratos e ratinhos TG2 em ambos western blot e ELISA, em alguns casos com pouca diferença em intensidade. No entanto, fora dos anticorpos IgG produzidos nove nós para, só foi possível determinar um IC50 para 4 em ratos e nenhum no mouse. A 4, onde um IC50 foi calculado contra rato TG2

mostrou uma dobra de 30 ou menor IC50 contra TG2 rato que AB1 contra significado TG2 humano qualquer dose in vivo seria proibitivamente grande. Além disso nenhum inibiria em tudo num lisado celular de rato. Dada a reatividade no ELISA e Western blot, e existem apenas 5 descasamentos entre espécies para AB1 e 3 para DD9 a especificidade de espécie significativa para a inibição foi surpreendente e demonstra claramente a importância crítica de afinidade para inibição eficaz. Assim, tendo identificado esses epítopos inibitórios para TG2 humano é agora crítico que os anticorpos analógicos são desenvolvidos para esses sites em ratos TG2 se o seu valor deve ser estabelecido em modelos in vivo pré clínicos da doença.

[000448] Há uma grande variedade de inibidores de TG disponível. Notavelmente o thiomidazole compostos originalmente desenvolvidos por Merke Sharpe Dome base [22] os análogos de CBZ-glutamil desenvolvidos por Griffin e colegas [23], que temos utilizado com muito sucesso para o tratamento de cicatrizes experimental renal [16] e os inibidores tipo dihidroisoxazole desenvolvidos pela Khosla e colegas [24-27] utilizado com sucesso em vários modelos de câncer. Tem havido esperança de que refinamento contínua desses compostos pode produzir um inibidor viável TG2 humana, mas atravessar reatividade família TG ou o potencial de natureza tóxica dos compostos parece ter impedido esta. Mais recentemente Acylideneoxoindoles têm sido descritas como uma nova classe de inibidores reversíveis TG2 [24], mas os dados relativos à sua reatividade cruzada com outros membros da família de TG é inexistente. Na conferência de 2010 Gordon em TG2 na doença humana Pasternack e colegas de Zedira apresentou detalhes de uma série de compostos que usam cadeia lateral Michael aceitantes como inibidores TG2 com reivindicações de aptidão para aplicação in vivo e TG2 seletividade, no entanto, uma publicação completa sobre estes tem não se materializou até o momento. Na mesma reunião de trabalho no início de Macdonald et al demonstrou alguns desenvolvimentos interessantes no projeto de um inibidor TG2 para o tratamento da coreia de Huntington, mas novamente a publicação

integral ainda é aguardada. Sem dúvida, um inibidor de molécula pequena de TG2 seria altamente desejável que devem ser alcançáveis. Penetração no tecido, a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, a produção, custo e fácil de dosagem são apenas alguns dos benefícios. No entanto, um inibidor de anticorpo como aqui desenvolvido pode de alguma maneira ser preferível.

[000449] TG2 é claramente uma enzima multifuncional e tem sido associada a uma variedade de funções celulares, incluindo a estabilização e o transporte nuclear [28, 29], endocitose [30, 31], de sinalização GTPase [32-34], apoptose [35, 36], de células adesão [37-39], a integridade do citoesqueleto [28, 29] e ECM estabilização [9]. Claramente uma pequena molécula inibidora pode impedir em todas essas funções, como, em geral, eles têm livre acesso ao espaço extracelular e interior da célula. Um anticorpo não pode entrar na célula e, como tal, as funções intracelulares de TG2 não seria afectada. É importante notar a maior parte dos papéis patológicos de TG2 parecem ser extracelular, tais como o seu papel na cicatrização de tecidos e fibrose, doença celíaca e cancêr. Assim, utilizando um anticorpo traria um grau adicional de seletividade prevenção de efeitos indesejáveis intracelulares. Por conseguinte, um anticorpo iria oferecer vantagens no bloqueio TG2 em cicatrizes e doenças fibróticas onde TG2 ligações cruzadas de proteínas da MEC, em doença celíaca, onde gliadina é desamidada no espaço extracelular e na quimio-resistência em cancêr onde a adesão das células parece ser o fator de proteção. No entanto, a menos que um pequeno fragmento Fab pode ser concebido que poderia atravessar a barreira hemato-encefálica um anticorpo que iniba TG2 seria pouca utilidade no tratamento de patologias neurológicas.

[000450] Em conclusão, pela primeira vez, temos sido capazes de desenvolver anticorpos inibidores TG2 que alvejam seletivamente TG2. Também identificamos três epítopos inibitórios novos dentro do domínio do núcleo de TG2. Humanização do anticorpo AB1 vai abrir a possibilidade de o primeiro tempo da terapia TG2 alvejado no homem.

Referências

Thomas, J.A. Douthwaite, J.L. Haylor, e M. Griffin, J Am Soc Nephrol, 1999. 10(10): p. 2146-57.

11. Do changes in transglutaminase ativity alter latent transforming growth factor beta ativation in experimental diabetic nephropathy? Huang, L., J.L. Haylor, M. Fisher, Z. Hau, A.M. El Nahas, M. Griffin, e T.S. Johnson, Nephrol Dial Transplant, 2010. 25(12): p. 3897-910.

12. Expression induced by interleukin-6 of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2 cells. Suto, N., K. Ikura, e R. Sasaki, J Biol Chem, 1993. 268(10): p. 7469-73.

13. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. Kuncio, G.S., M. Tsyganskaya, J. Zhu, S.L. Liu, L. Nagy, V. Thomazy, P.J. Davies, e M.A. Zern, Am J Physiol, 1998. 274(2 Pt 1): p. G240-5.

14. Inhibition of transglutaminase ativity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. Skill, N.J., T.S. Johnson, I.G. Coutts, R.E. Saint, M. Fisher, L. Huang, A.M. El Nahas, R.J. Collighan, e M. Griffin, J Biol Chem, 2004. 279(46): p. 47754-62.

15. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis e preserves function in experimental chronic kidney disease. Johnson, T.S., M. Fisher, J.L. Haylor, Z. Hau, N.J. Skill, R. Jones, R. Saint, I. Coutts, M.E. Vickers, A.M. El Nahas, e M. Griffin, J Am Soc Nephrol, 2007. 18(12): p. 3078-88.

16. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. Huang, L., J.L. Haylor, Z. Hau, R.A. Jones, M.E. Vickers, B. Wagner, M. Griffin, R.E. Saint, I.G. Coutts, A.M. El Nahas, e T.S. Johnson, Kidney Int, 2009. 76(4): p. 383-94.

17. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta ativation e cell infiltration. Shweke, N., N. Boulos, C. Jouanneau, S. Vandermeersch, G. Melino, J.C. Dussaule, C. Chatziantoniou, P. Ronco, e J.J. Boffa, Am J Pathol, 2008. 173(3): p. 631-42.

18. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, e inhibits melanoma tumor growth e metastasis. Xu, L., S. Begum, J.D. Hearn, e R.O. Hynes, Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(24): p. 9023-8.

19. Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients inhibit transglutaminase ativity both in vitro e in situ. Esposito, C., F. Paparo, I. Caputo, M. Rossi, M. Maglio, D. Sblattero, T. Not, R. Porta, S. Auricchio, R. Marzari, e R. Troncone, Gut, 2002. 51(2): p. 177-81.

20. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon ativation. Pinkas, D.M., P. Strop, A.T. Brunger, e C. Khosla, PLoS Biol, 2007. 5(12): p. e327.

21. Functional significance of five noncanonical Ca2+-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. Kiraly, R., E. Csosz, T. Kurtan, S. Antus, K. Szigeti, Z. Simon-Vecsei, I.R. Korponay-Szabo, Z. Keresztessy, e L. Fesus, Febs J, 2009. 276(23): p. 7083-96.

22. 3,5 substituted 4,5-dihydroisoxazoles as transglutaminase inhibitors. Syntex, US Patent 4, 912, 120, 1990. March.

23. Griffin M, Coutts I G, e S. R, *Novel Compounds e Methods of Using The Same.*, in *International Publication Number WO 2004/113363,*. 2004: GB patent PCT/GB2004/002569.

24. Acylideneoxoindoles: a new class of reversible inhibitors of human transglutaminase 2. Klock, C., X. Jin, K. Choi, C. Khosla, P.B. Madrid, A. Spencer, B.C. Raimundo, P. Boardman, G. Lanza, e J.H. Griffin, Bioorg Med Chem Lett. 21(9): p. 2692-6.

25. Transglutaminase 2 inhibitors e their therapeutic role in disease states. Siegel, M. e C. Khosla, Pharmacol Ther, 2007. 115(2): p. 232-45.

26. Structure-based design of alpha-amido aldehyde containing gluten peptide analogues as modulators of HLA-DQ2 e transglutaminase 2. Siegel, M., J. Xia, e C. Khosla, Bioorg Med Chem, 2007. 15(18): p. 6253-61.

27. Novel therapies for celiac disease. Sollid, L.M. e C. Khosla, J Intern Med. 269(6): p. 604-13.

28. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Fesus, L. e M. Piacentini, Trends Biochem Sci, 2002. 27(10): p. 534-9.

29. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. Lorand, L. e R.M. Graham, Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(2): p. 140-56.

30. Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. Toth, B., E. Garabuczi, Z. Sarang, G. Vereb, G. Vamosi, D. Aeschlimann, B. Blasko, B. Becsi, F. Erdodi, A. Lacy-Hulbert, A. Zhang, L. Falasca, R.B. Birge, Z. Balajthy, G. Melino, L. Fesus, e Z. Szondy, J Immunol, 2009. 182(4): p. 2084-92.

31. Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin e polypeptide hormones. Davies, P.J., D.R. Davies, A. Levitzki, F.R. Maxfield, P. Milhaud, M.C. Willingham, e I.H. Pastan, Nature, 1980. 283(5743): p. 162-7.

32. GTP binding e signaling by Gh/transglutaminase II involves distinct residues in a unique GTP-binding pocket. Iismaa, S.E., M.J. Wu, N. Nanda, W.B. Church, e R.M. Graham, J Biol Chem, 2000. 275(24): p. 18259-65.

33. The core domain of the tissue transglutaminase Gh hydrolyzes GTP e ATP. Iismaa, S.E., L. Chung, M.J. Wu, D.C. Teller, V.C. Yee, e R.M. Graham, Biochemistry, 1997. 36(39): p. 11655-64.

34. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase ativity e receptor signaling function. Nakaoka, H., D.M. Perez, K.J. Baek, T. Das, A. Husain, K. Misono, M.J. Im, e R.M. Graham, Science, 1994. 264(5165): p. 1593-6.

35. Searching for the function of tissue transglutaminase: its possible involvement in the biochemical pathway of programmed cell death. Fesus, L. e V. Thomazy, Adv Exp Med Biol, 1988. 231: p. 119-34.

36. Induction e ativation of tissue transglutaminase during programmed cell death. Fesus, L., V. Thomazy, e A. Falus, FEBS Lett, 1987. 224(1): p. 104-8.

37. Fibronectin-tissue transglutaminase matrix rescues RGD-impaired cell adhesion through syndecan-4 e beta1 integrin co-signaling. Telci, D., Z. Wang, X. Li, E.A. Verderio, M.J. Humphries, M. Baccarini, H. Basaga, e M. Griffin, J Biol Chem, 2008. 283(30): p. 20937-47.

38. Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, e cell death. Verderio, E., B. Nicholas, S. Gross, e M. Griffin, Exp Cell Res, 1998. 239(1): p. 119-38.

39. A novel RGD-independent cel adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis. Verderio, E.A., D. Telci, A. Okoye, G. Melino, e M. Griffin, J Biol Chem, 2003. 278(43): p. 42604-14.

Example 2: Sequencing of novel TG2 inhibitory antibodies of the invention.

Antibody Sequencing

A fim de determinar as sequências das regiões variáveis de cada um anticorpo da invenção, um sedimento das células de hibridoma foram processados utilizando o Qiagen RNeasy Mini Kit para extrair o ARN seguindo os protocolos do fabricante. O RNA extraído foi objecto de transcrição reversa para produzir um cDNA usando um 1° Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare), usando um primer NotI-dT_{18}, em conformidade com os protocolos do fabricante. A preparação de cDNA foi feita usando-se o kit de purificação de PCR da Qiagen, de acordo com os protocolos do fabricante.

Para determinar a sequência da cadeia pesada, o cDNA de rato foi amplificado por PCR utilizando um conjunto de iniciadores degenerados (MHV1-12) com um iniciador da região constante (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3, ou uma mistura dos quatro) como mostrado na Tabela 12. de modo semelhante, para determinar a sequência da cadeia leve, o rato de cDNA foi amplificada utilizando um conjunto de iniciadores degenerados (MVK1-11) com uma região constante iniciador MKC como mostrado na Tabela 13.

Se não há produtos de amplificação foram observados utilizando o conjunto inicial de uma cadeia pesada de PCR 5 'RACE PCR (Invitrogen) foi realizada, usando

iniciadores NotI-dT_{18} para gerar o cDNA; e a constante região de iniciadores (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3, ou uma mistura dos quatro) e o 5' RACE Anchor Primer, GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG (onde I é a base para deoxiinosina) para o PCR.

As bandas de amplificação resultantes foram ligados no vetor pCR2.1®-TOPO® utilizando o estojo TOPO-TA Cloning® (Invitrogen) utilizando o protocolo do fabricante e enviado para GATC Biotech AG para sequenciação.

Tabela 12: Iniciadores de PCR para o Rato Clonagem da Cadeia Pesada Regiões Variáveis

Nome	Sequência
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATCTTCTTC
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT
MHV4	ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRTTT
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCTT
MHV6	ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTGC
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCTG
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
MHV12	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTG
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG
MHCG2A	CAGTGGATAGACCGATGGGGC
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC

Códigos de Ambiguidade: R = A ou G; Y = C ou T; M = A ou C; K = G ou T; S = G ou C; W = A ou T.

MHV indica iniciadores que hibridizam com as sequências líder de genes do camundongo da região variável de cadeia pesada, indica MHCG iniciadores que hibridizam com os genes do camundongo da região constante.

Tabela 13: Iniciadores PCR para Clonagem de Camundongo Kappa Regiões Variáveis de Cadeia Leve

Nome	Tamanho	Sequência
MKV1	30-mer	ATGAAGTTGVVTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
MKV2	29-mer	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG
MKV3	30-mer	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG
MKV4	33-mer	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG
MKV5	30-mer	ATGGATTTWAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
MKV6	27-mer	ATGAGGTKCKKTGKTSAGSTSCTGRGG
MKV7	31-mer	ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
MKV8	31-mer	ATGTGGGGAYCTKTTTYCMMTTTTTCAATTG
MKV9	25-mer	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
MKV10	27-mer	ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTCT
MKV11	28-mer	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
CL12A		ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT
CL12B		ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT
CL13		ATGGATTCACAGGCCCAGGTTCTTAT
CL14		ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTT
CL15		ATGAATTTGCCTGTTCATCTCTTGGTGCT
CL16		ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT
CL17A		ATGAGGTGCCTARCTSAGTTCCTGRG
CL17B		ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG
CL17C		ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG
MKC	20-mer	ACTGGATGGTGGGAAGATGG

Ambiguidade dos Códigos: R = A ou G; Y = C ou T; M = A ou C; K = G ou T; S = G ou C; W = A oru T.

MKV indica os primers que hibridam com sequências líder dos genes da região variável da cadeia leve capa de ratinho, MKC indica que o iniciador hibrida com o gene da região constante kapa de ratinho.

sequência de dados

Anticorpo AB1 foi sequenciado, além de anticorpos BB7, DC1, JE12, EH6, AG9, AH3, DD9, DH2, DD6 e IA12. As sequências são fornecidas nas Figuras 18 a 28.

Exemplo: Construção e caracterização de novos anticorpos anti-TG2 quiméricos e humanizados da presente invenção.

Para caracterizar ainda mais os anticorpos da invenção e para permitir a classificação e definição de prioridades para a humanização de anticorpos, um painel de anticorpos quiméricos foram construídos TG2 (regiões variáveis de murideo e humana e IgG1 kapa humana). A metodologia utilizada para produzir os anticorpos quiméricos são definidas a seguir.

métodos

VH humano e VK cDNA Databases

As seqüências protéicas de imunoglobulinas humanas e mouse da Imunogenética internacionais de banco de dados de 20091 eo Kabat Database Release 5 de Seqüências de Proteínas de Interesse imunológica (última atualização 17-Nov-1999) 2 foram usados para compilar um banco de dados de sequências de imunoglobulina humana em um Kabat alinhamento. Nosso banco de dados contém 10.606 VH e 2.910 sequências VK.

Modelo Molecular de AB1

Como representante dos anticorpos do grupo 1 (ou seja, anticorpos que se ligam o epítopo que abrange os aminoácidos 304-326 da TG2 humano), um modelo de homologia do anticorpo AB1 rato regiões variáveis foi calculado usando o Modeller Program3 corrida no modo automático. As coordenadas atômicas de um MQK.pdb, 3LIZ.pdb e 1MQK.pdb eram os mais altos modelos de sequência de identidade para

a interface, VL e VH, respectivamente, como determinado pela análise da explosão da base de dados de anticorpos estruturas PDB Accelrys. Estes modelos foram usados para gerar 20 modelos iniciais, o melhor do que foi refinado modelando cada loop CDR com os seus 3 melhores modelos de alça.

hAB1 Seleção Framework

O programa de análise de sequência, gibsSR, foi usado para interrogar as bases de dados de VH e VK humanos com o VHC AB1, VKC e VKc1, a BB7 VHC e VKC e as sequências proteicas DC1 VHC e VKC usando vários critérios de seleção. Resíduos FW dentro 5Å de um resíduo de CDR (definição Kabat) no modelo de homologia de anticorpo de rato AB1, foram identificados e designados como os "5-A proximidade" resíduos.

AF06220 foi escolhido como o FW para fundamentar as versões iniciais da cadeia pesada humanizados. A Tabela 14 mostra o alinhamento de identidade e resíduo AF06220 de anticorpos murinos. A Tabela 15 mostra o envelope 5Å proximidade das sequências. AF062260 tem apenas uma mutação somática de distância da sua linha germinal VH Z12347 gene (Tabela 16).

AY247656 foi escolhido como o FW sobre a qual basear o AB1 humanizado cadeia leve kappa inicial. O alinhamento e o resíduo identidade de murino AB1 cadeia leve kappa de anticorpo são mostrados na Tabela 17; A Tabela 18 mostra o envelope 5Å proximidade das sequências. A sequência mostra cinco mutações somáticas de sua X93620 gene germinal VK (Tabela 19).

AF193851 foi escolhido como o FW no qual basear as outras kappa humanizado construções de cadeias leves. O alinhamento e a identificação dos resíduos para os anticorpos de murino são mostrados na Tabela 20. Tabela 21 mostra o envelope 5Å proximidade das sequências. A seqüência não mostra mutações somáticas de seu gene J00248 germline VK (Tabela 22).

Geração de vetores de expressão

Construção de vetores de expressão quiméricas implica a adição de uma sequência líder adequada para VH e VL, precedida por um sítio de restrição HindIII e uma

sequência Kozak. A sequência de Kozak garante uma tradução eficiente da sequência da região variável. Ele define o codão AUG correta a partir do qual um ribossoma pode iniciar a tradução, e a base mais crítico é a adenina na posição -3, a montante do início agosto.

Para a cadeia pesada, a construção dos vetores de expressão quiméricas implica a introdução de um fragmento 5 'da região constante G1 humana, até um sítio natural de restrição Apal, contígua à extremidade 3' da região J da região variável. A CH é codificada no vetor de expressão a jusante da sequência de VH inserido, mas carece do intrão VC.

Para a cadeia leve o local doador de splicing natural e um sítio BamHI é adicionada a jusante da região V. A sequência de dador de splicing facilita a kappa V: C intrão que é necessária para a ligação em grelha da VL para a região constante.

As sequências de ADN das regiões variáveis foram sintetizados e optimizado por GeneArt®. A sequência líder foi escolhido como aquele que dá boa expressão de anticorpos em células de mamíferos em cultura.

Construtos da região variável da cadeia pesada foram excisados a partir do vetor de clonagem utilizando digestão com HindIII + Apal, purificado e ligado no MRCT expressão da cadeia pesada de forma semelhante vetor cortado e tratado com fosfatase, e foram usados para transformar bactérias TOP10.

Construtos região variável da cadeia Kappa foram excisadas utilizando digestão com HindIII + BamHI, purificado, foi ligado no tratado com fosfatase da cadeia leve kappa MRCT vetor de expressão de forma semelhante e de corte, e foram usados para transformar bactérias TOP10.

Expressão de Anticorpo

A expressão insert vetor codificação duplo para ambas as cadeias pesada e kappa foi gerado e transfectados em células HEK293T. Sobrenadante da cultura celular foi purificado por cromatografia de afinidade em Proteína G-agarose de acordo com os protocolos do fabricante.

Encadernação ELISA

Células HEK 293F foram co-transfectadas com diferentes combinações de vetores de cadeia leve humanizadas, em associação com diferentes vetores da cadeia pesada humanizadas. TG2 humana recombinante foi utilizada para medir a ligação do anticorpo por ELISA. Os resultados indicaram que a versão de cadeia pesada de RHA (Tabela 23), em combinação com as versões de cadeia leve e RKE RKJ (Tabela 24) (representando as diferentes versões de cadeia leve humanizada) mostrou ligação ótima (Figura 34), e, por conseguinte, foi selecionado para caracterização adicional. Uma abordagem semelhante foi usada para identificar pares ótimas de cadeias humanizados BB7 pesadas e leves, e humanizados DC1 cadeias pesadas e leves.

Versão Cadeia Pesada RHA é um enxerto modificado-un das regiões do mouse CDR do anticorpo AB1 para a seqüência do doador humano. No entanto, ambas as versões de cadeia leve e RKE RKJ, têm o mesmo único 5Å proximidade residem retromutação, F72 (Tabela 24). Esta mutação de volta está fora dos resíduos Vernier[4], Canonical[5] ou Interface[6].

Referências

1. Lefranc,M.P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database(R). Nucleic Acids Res. 31, 307-310 (2003).

2. Kabat,E.A., Wu,T.T., Perry,H.M., Gottesman,K.S. & Foeller,C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH National Technical Information Service, (1991).

3. Eswar,N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. Curr. Protoc. Bioinformatics. Chapter 5:Unit 5.6., Unit (2006).

4. Foote, J. & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol. Biol. 224, 487-499.

5. Morea, V., Lesk, A. M. & Tramontano, A. (2000). Antibody modeling: implications for engineering e design. Methods 20, 267-279.

6.Chothia, C., Novotny, J., Bruccoleri, R. & Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. J Mol. Biol. 186, 651-663.

A tabela a seguir A resume os anticorpos quiméricos e humanizados produzidos com uma referência cruzada aos identificadores usados nas figuras.

Murino Anticorpo	Quimérico Humanizado	Anticorpo
AB1	cAB001 cAB003	hAB004 (hAB001AE) hAB005 (hAB001AJ)
BB7	cBB001	hBB001AA hBB001BB
DC1	cDC001	hDC001AA hDC001BB
DD6	cDD6001	
DD9	cDD9001	
DH2	cDH001	

Tabelas

Tabela 14

Numeros	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
Kabat [2]	-|--------|--------|--------|-----AB----|--------|--ABC-------|--------|--------|--ABC-------|--------|ABCDEFGHIJK---------|-
Vernier[4]	-.*.....****.....***.....*.*.*.*.....*.....**.....*.....
Canonical[5]	-.....1.11.1....1.....2...22.....2.....1.....
Interface[6]	-.....|..|.|.....|.|.....|.|.|.....|.....
5Å Proximidade	**** * * **** *** *** ******* * * **** **
CDR	<-----> <----------> <---------->
AB_VHc (mAB001VH)	-EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS--WVRQTPDRRLEWVATISV--GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLI----------SLYWGQGTTLTVSS
BB7_VHc (mBB7001VH)	-AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIIFSSSAMS--WVRQTPEKRLEWVATISS--GGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDTAIYYCAKLI----------SPYWGQGTTLTVSS
DC1_VHc (mDC001VH)	-EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSTHAMS--WVRQTPEKRLEWVATISS--GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNVKNTLYLQLSSLRSEDTAVYFCARLI----------STYWGQGTTLTVSS
AF062260	C....L.....Q.....R.....F..Y...--....A.GKG....SA..G--S..S...A.....S.....A....V.....DG----------GV.....LV....

A Tabela 14 mostrando o alinhamento e identidade do resíduo AF062260 para anticorpos murino. Identidade de resíduos é mostrada pelo caractere de um ponto (.). Diferenças de resíduos são mostradas onde forem aplicáveis. Espaços (-) são usados para manter a numeração Kabat, e para mostrar a inserção ou deleção onde for aplicável.

Tabela 15

	5Å Proximity Residues
AB_VHc (mAB001VH)	EVQLCAFTLSWVRWVARFTISRNLYCAKWG
BB7_VHc (mBB7001VH)	AVQLCAIIFSWVRWVARFTVSRSLYCAKWG
DC1_VHc (mDC001VH	EVQLCAFTLSWVRWVARFTISRNLFCARWG
AF062260	.....F.....S.....

A Tabela 15 mostrando o anticorpo resíduos da estrutura de cadeia pesada que se situam dentro de um envelope 5Å do CDR's. Identidade de resíduos são mostrados pelo caractere de um ponto (.). Diferença de resíduos são mostrados quando aplicáveis.

Tabela 16

```
         --------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+-------
                 10       20       30       40       50       60       70       80       90
         --------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+-------
Z12347.seq   EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
AF062260.seq ..................................................................................................R     1
                                 <--->          <------------>
```

A Tabela 16 mostra AF062260 que tem uma mutação somática longe da linha germinal VH gene Z12347. Identidade de resíduos são mostrados pelo caractere de um ponto (.). Diferença de resíduos são mostrados quando aplicáveis.

Tabela 17

Números Kabat[2]	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
	-|--------|---------|-------ABCDEF--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----ABCDEF----|------A-
Vernier[4]	-.* .*.....**.....****.....* * .** *.....*.....
Canonical[5]	-.1.....1.....1111..1.....2..22.....2.....1.....3....3.....
Interface[6]	-.....I.I.....I.....I..I.....II.....
5Å Proximity	****** ** ** **** *** ********** ** **
CDR	<----------> <-----> <---------->
AB_VKc (mAB001VK)	-EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFP------ YTFGGGTKLEI-K
AY247656	-.....LS..V.D.....Q...------..SN..N.Y.....A..L...DASN.ET.....T..TF.....QP..F.T...Q..NTY.------L.....-.

Tabela 17 mostra o alinhamento e a identidade de resíduo de AY247656 para o anticorpo murino AB1. Identidades de Resíduos são mostradas pelo caractere de um ponto (.). Diferenças de Resíduos são mostradas onde forem aplicáveis. Intervalos (-) são usados para manter a numeração Kabat, e para mostrar a inserção do resíduo ou deleção quando for aplicável.

Tabela 18

	5Å Proximity Residues
AB_VKc (mAB001VK)	EIVLTQTCWFTLIYGVPFSGSGSGQDFFYCFG
AY247656	.....YL.....T..T....

Tabela 18 mostra o anticorpo AB1 quadro de resíduos de cadeia leve que se situam dentro de um envelope 5Å dos CDR's. Identidades de Resíduos são mostradas pelo caractere de um ponto (.). Diferenças de Resíduos são mostradas onde forem aplicáveis.

Tabela 19

```
         --------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+-----
                 10       20       30       40       50       60       70       80       90
         --------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+--------+-----
X93620.seq   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLPP
AY247656.seq E.VL.....................................................................FG.......NTY.L     5
                         <-------->           <----->                        <-------
```

Tabela 19 mostra AY247656 tem 5 a mutação somática de distância da linha germinativa do gene VK X93620. Identidades de Resíduos são mostradas pelo caractere de um ponto (.). Diferenças de Resíduos são mostradas onde forem aplicáveis.

Tabela 20

Números Kabat[2]	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
	-|--------|--------|-------ABCDEF--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----ABCDEF----|------A-
Vernier[4]	-.*.*.....**.....****.....*.*.**.*.....*.....
Canonical[5]	-.1.....1.....1111..1.....2..22.....2.....1.....3....3.....
Interface[6]	**-.....I.I....I.....I.I.....II.....**
5Å Proximity	****** ** ** **** *** ********** ** **
CDR	<----------> <-----> <---------->
AB_VKc1 (mAB002VK)	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFP------ YTFGGGTKLEI-K
AB1_VKc2 (mAB003VK)	-DIQKTQSPSSMYASLGERVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFP------ YTFGGGTKLEI-K
BB7_VKc (mBB001VK)	-AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFP------ YTFGGGTKLEI-K
DC1_VKc (mDC001VK)	-DITMTQSPSSIYASLGERVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYALTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFP------ YTFGGGTKLEI-K
AF193851	-...M.....LS..V.D.....R...------G.RN..A.....A..S...AASN.QS.....T..T.....QP..FAT...Q.HNTY.------W...Q...V..-.

Tabela 20 mostra o alinhamento e a identidade de resíduo de AF193851 ara os anticorpos murino. Identidades de Resíduos são mostradas pelo caractere de um ponto (.). Diferenças de Resíduos são mostradas onde forem aplicáveis. Intervalos (-) são usados para manter a numeração Kabat, e para mostrar a inserção do resíduo ou deleção quando for aplicável.

Tabela 21

	5Å Proximity Residues
AB_VKc1 (mAB002VK)	DIQMTQTCWFTLIYGVPFSGSGSGQDFFYCFG
AB1_VKc2 (mAB003VK)	DIQKTQTCWFTLIYGVPFSGSGSGQDFFYCFG
BB7_VKc (mBB001VK)	AIKMTQTCWFTLIYGVPFSGSGSGQEFLYCFG
DC1_VKc (mDC001VK)	DITMTQTCWFILIYGVPFSGSGSGQDYAYCFG
AF193851	...M.....S.....T..T....

Tabela 21 mostra o anticorpo quadro de resíduos de cadeia leve que se situam dentro de um envelope 5Å dos CDR's. Identidades de Resíduos são mostradas pelo caractere de um ponto (.). Diferenças de Resíduos são mostradas onde forem aplicáveis.

Tabela 22

```
        10        20        30        40        50        60        70        80        90
J00248.seq   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPP
AF193851.seq .....R.....N.....H.T..W     0
             <-------->  <----->          <------
```

Tabela 23

Números Kabat	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
	-|--------|--------|--------|----AB----|--------|--ABC-------|--------|--------|--ABC-------|--------|ABCDEFGHIJK--------|-
Vernier[4]	-.*.....****.....***.....*.***.*.*.*.*...*.....**.....*.....
Canonical[5]	-.....1.11.1....1.....2...22.....2.....1.....
Interface[6]	-.....|...|.|.....|.|.....|.|.|.....|.....
5Å Proximity	**** * * **** *** *** ******* * * **** **
CDR	<-----> <----------> <----------
AB_RHA (hAB001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMS--WVRQAPGKGLEWVSTISV--
	GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI----------SLYWGQGTLVTVSS
BB7_RHA (hBB001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMS--WVRQAPGKGLEWVSTISS--
	GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI----------SPYWGQGTLVTVSS
BB7_RHB (hBB001HB)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSSAMS--WVRQAPGKGLEWVATISS--GGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI---------- SPYWGQGTLVTVSS
DC1_RHA (hDC001HA)	*-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHAMS--WVRQAPGKGLEWVSTISS--*
	GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI----------STYWGQGTLVTVSS
DC1_RHB (hDC001HB)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMS--WVRQAPGKGLEWVATISS--GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLI---------- STYWGQGTLVTVSS

Tabela 23 mostra a sequencia de alinhamento das versões humanizadas das cadeias pesadas AB1, BB7 e DC1. . Intervalos (-) são usados para manter a numeração Kabat, e para mostrar a inserção do resíduo ou deleção quando for aplicável.

Tabela 24

Números Kabat	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
	-|--------|---------|-------ABCDEF--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----ABCDEF----|------A-
Vernier[4]	-.* *.....**.....****.....* * ** *.....*
Canonical[5]	-.1.....1.....1111..1.....2..22.....2.....1.....3....3.....
Interface[6]	-.....|.|....|.....|..|.....||.....
5Å Proximity	****** ** ** **** *** ********** ** **
CDR	<----------> <----> <---------->
AB_RKE (hAB001KE)	-EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ------DINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFFTISSLQPEDFGTYYCLQYDDFP------ YTFGGGTKLEI-K
AB_RKJ (hAB001KJ)	-DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFP------ YTFGQGTKVEI-K
BB7_RKA (hBB001KA)	-DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFP------ YTFGQGTKVEI-K
BB7_RKB (hBB001KB)	-DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGQEFLLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFP------ YTFGQGTKVEI-K
DC1_RKA (hDC001KA)	-DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFP------ YTFGQGTKVEI-K
DC1_RKB (hDC001KB)	-DITMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ------DINSYLTWFQQKPGKAPKILIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYALTISSLQPEDFATYYCLQYDDFP------ YTFGQGTKVEI-K

Tabela 24 mostra a sequencia de alinhamentos das versões finais humanizadas de cadeia leve kappa de AB1, BB7 e DC1. . Intervalos (-) são usados para manter a numeração Kabat, e para mostrar a inserção do resíduo ou deleção quando for aplicável.

TABELA 24A

Tabela 24a resume a informação da sequencia apresentada nas Tabelas 23 and 24, em particular mostra a sequencia CDRs, and the CDRs com as regioes flanqueadoras nas cadeias leve e pesada de anticorpos de AB, BB-7 e DC-1.

Cadeia Pesada - CDR1	
AB	CAASGFTFSSSAMSWVR ou FTFSSSAMSWVR ou SSAMS.
BB7 RHB	CAASGFTFSSSAMSWVR ou FTFSSSAMSWVR ou SSAMS.
BB7 RHA	CAASGIIFSSSAMSWVR ou IIFSSSAMSWVR ou SSAMS.
DC1 RHA	CAASGFTFSTHAMSWVR ou FTFSTHAMSWVR ou THAMS.
DC1 RHB	CAASGFTLSTHAMSWVR ou FTLSTHAMSWVR ou THAMS.
Cadeia Pesada – CDR2	
AB	WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTL ou WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN ou WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR ou TISVGGGKTYYPDSVKG.
BB7 RHB	WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTL ou WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN ou WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR ou TISSGGRSTYYPDSVKG.
BB7 RHA	WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSSKNTL ou WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDS ou WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTVSR ou TISSGGRSTYYPDSVKG.
DC1 RHA	WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTL ou WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN ou WVSTISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR ou TISSGGRSTYYPDSVKG.
DC1 RHB	WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTL ou WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN ou WVATISSGGRSTYYPDSVKGRFTISR or TISSGGRSTYYPDSVKG.
Cadeia Pesada – CDR3	
AB	YCAKLISLYWG ou LISLY.
BB7 RHB	YCAKLISPYWG ou LISPY.
BB7 RHA	YCAKLISPYWG ou LISPY.
DC1 RHA	YCAKLISTYWG ou LISTY.
DC1 RHB	FCARLISTYWG ou LISTY.

Cadeia Leve - CDR1	
AB RKE	TCKASQDINSYLTWY ou KASQDINSYLT.
AB RKJ	TCKASQDINSYLTWF ou KASQDINSYLT.
BB7 RKB	TCKASQDINSYLTWF ou KASQDINSYLT.
BB7 RKA	TCKASQDINSYLTWF ou KASQDINSYLT.
DC1 RKA	TCKASQDINSYLTWF ou KASQDINSYLT.
DC1 RKB	TCKASQDINSYLTWF ou KASQDINSYLT.
Cadeia Leve – CDR2	
AB RKE	LLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFF ou LLIYRTNRLFDGVP ou RTNRLFD
AB RKJ	SLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFF ou SLIYRTNRLFDGVP ou RTNRLFD
BB7 RKB	SLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGTDFF ou SLIYLTNRLMDGVP ou LTNRLMD
BB7 RKA	TLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGQEFL ou TLIYLTNRLMDGVP ou LTNRLMD
DC1 RKA	SLIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGTDFF ou SLIYLVNRLVDGVP ou LVNRLVD
DC1 RKB	ILIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYA ou ILIYLVNRLVDGVP ou LVNRLVD
Cadeia Leve – CDR3	
AB RKE	YCLQYDDFPYTFG ou LQYDDFPYT.
AB RKJ	YCLQYDDFPYTFG ou LQYDDFPYT.
BB7 RKB	YCLQYVDFPYTFG ou LQYVDFPYT.
BB7 RKA	YCLQYVDFPYTFG ou LQYVDFPYT.
DC1 RKA	YCLQYDDFPYTFG ou LQYDDFPYT.
DC1 RKB	YCLQYDDFPYTFG ou LQYDDFPYT.

[[[[[[A SEGUIR VOLTA PARA PG 110 DO TXT INGLES]]]]]]

Caracterização de anticorpos quiméricos e humanizados

Abs quiméricos e humanizados foram testados quanto à ligação ao macaco cinomolgo e humano TG2 e para a inibição enzimática destas enzimas de acordo com a metodologia descrita abaixo.

METODOS

ELISA Ensaio para a ligação TG2

Anticorpos TG2 ligando ao humano e macaco cinomólogo foi determinado em um ensaio ELISA. Poliestireno claro “Maxisorp” placas (Nunc) de 96 poços foram revestidas com 50ng TG2 humano purificado e macaco cinomolgo em 50µl 0.05 M tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6 a 4°C durante toda a noite. Poços de controle foram revestidos com 50µl 100µg/ml albumina de soro bovino (BSA). Placas foram lavadas 3x com 300 µl solução salina tamponada com fosfato pH7.4 (PBS) contendo 0.1% Tween 20 (PBST) e bloqueado com 300 ul de 3% w / v Marvel leite desnatado em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem 3x com PBST, 50 uL de proteína-A de anticorpo Os anticorpos anti-TG2 quiméricos ou humanizados ou IgG1 kappa de controle isótopo humana purificada ou CUB7402 (Abcam) foram diluídos em série 4-vezes a partir de uma concentração superior de 50 nM em PBS, e adicionadas à placa em duplicata.

Depois de 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 3x em PBST e incubadas com conjugado com peroxidase de cabra 50 ul anti-IgG humana (Fc) (Serotec) diluído a 1/5.000 em 3% w/v Marvel leite desnatado em PBS ou para poços CUB7402 contendo 1/5.000 de cabra anti-IgG de ratinho (Fc) (Sigma) durante 1 hora à temperatura ambiente conjugado com peroxidase. Após lavagens 3x com PBST, as placas foram desenvolvidas com 50 ul de substrato TMB (Sigma) durante 5 min à temperatura ambiente antes de parar a reação com 25 ul de H2SO4 0,5 M e lendo a absorvância a 450 nM num leitor de microplacas (Biotek EL808). As curvas de resposta à dose foram analisados e os valores de EC 50 e de outros

parâmetros estatísticos determinada utilizando um ajuste logístico de 4 parâmetros dos dados (GraphPad Prism).

Transglutaminase ensaio baseado em fluorescência de TG2 inibição pelos anticorpos da invenção.

Atividades de transglutaminase humano purificado (Zedira) ou cynomogolus macaco enzimas TG2 (Trenzyme) foram medidos por incorporação de dansylated KXD lisina (Zedira) em caseína, N, N-dimetilado (DMC, Sigma). Macaco ou humano cynomogolus TG2 foram diluídas em tampão de transamidação (25 mM de HEPES pH 7,4 contendo 250 mM de NaCl, 2 mM de MgCl2, 5 mM de CaCl2, 0,2 mM de DTT e 0,05% v/v de Pluronic F-127) a 1 nM e 10 nM, respectivamente, e mistura-se com várias concentrações de Uma proteína de murino purificada, anticorpos quiméricos ou humanizados TG2 durante 180 minutos à temperatura ambiente em 384 poços placas de microtitulação negras (Corning). As reações foram iniciadas por adição de DMC e KXD para uma concentração final de 10 uM e 20um, respectivamente, e um volume de reação final de 30ul, e deixada prosseguir à temperatura ambiente durante 180 min e o aumento na fluorescência (RFU) (excitação a 280 nm, 550 nm de emissão) monitorado usando um leitor de placas Tecan Safire2. Os dados foram normalizados para a atividade porcentagem onde% atividade = (anticorpo teste RFU -RFU controles baixa) / controles altas RFU -RFU controles baixos) x 100, onde os controles de baixa continha todos os componentes, exceto enzima e controles altas continha todos os componentes exceto anticorpo.

As curvas de resposta de dose de anticorpos foram representadas usando o programa GraphPad prisma e ajustados utilizando um modelo logístico de 4 parâmetros para retornar outros parâmetros estatísticos e IC50. Os resultados são ilustrados nas Figuras 29-33.

Resultados e discussão de inibição enzimática e experiências de ligação por ELISA de anticorpos anti-TG2 humanizados e de murino.

A capacidade dos anticorpos quiméricos e humanizados TG2 para inibir a transamidação por TG2 humano foi determinada pela inibição dependente da dose da incorporação TG2-dependente de lisina dansylated em caseína, N, N-dimetilado (exemplificado nas figuras 29 e 31). Ambos os anticorpos quiméricos e humanizados, a partir de um grupo (por exemplo cAB003, cBB001, cDC001, hBB001AA, hAB001BB, hAB005 e hAB004) mostram uma inibição potente da atividade TG2 na gama nanomolar baixa, consistente com os dados de ELISA, que mostra a ligação a humana imobilizada TG2 na mesma range (figuras 35 e 37). Em contraste, o anticorpo CUB7402 comercial não conseguiu inibir humana ou de macaco cynomogulus TG2 atividades enzimáticas (figuras 29F e 30B), apesar de ligação para um grupo de anticorpos comparáveis nos ensaios de ELISA (figuras 35A, 36A, 37A e 38A) consistentes com o reconhecimento por CUB7402 de um epítopo que não interfira com a função da enzima de transamidação. Portanto, os anticorpos do grupo 1 pode ser distinguidos pela sua capacidade para inibir a função da enzima a partir de outros anticorpos, tais como CUB7402, que se ligam mas que não têm efeito sobre a atividade enzimática. Da mesma forma, murina e anticorpos quiméricos representante do grupo 3 (por exemplo mDD9001, mDH001, cDD9001 e cDH001) consistentemente inibido transamidação TG2 humana, mas com menor potência do que os anticorpos do grupo 1 (figuras 29 e 33). A inibição da TG2 humano por anticorpos monoclonais murinos exemplificados-mãe do grupo 1 e grupo 3 (figura 33) mostram as potências comparáveis com as suas versões quiméricos e humanizados, o que indica que a potência funcional dos anticorpos murinos foi retida nas versões humanizadas. Da mesma forma os dados humanos TG2 ELISA obrigatório para os anticorpos humanizados exemplificados hBB001AA, hBB001BB e hAB004 (figura 37) mostram valores de CE50 comparáveis com os obtidos para as versões quiméricas cBB001 e cAB003, indicando que a afinidade de ligação também foi preservada nas versões humanizadas. Os anticorpos quiméricos e humanizados, também demonstram uma inibição potente de macaco cynomogulus TG2 (figuras 30 e 32) e ELISA comparável CE50 de (figuras 36 e 38)

através das espécies, consistente com a conservação do epítopo cognato no macaco cynomogulus TG2, que tem em geral 99% de identidade de sequência. Em contraste CUB7402 mostra comparável ligação a TG2 de ambas as espécies, como os anticorpos do grupo 1, mas nem inibe a atividade enzimática (figuras 35-38 e 29-30).

Ensaios baseado em Células

A ligação dos anticorpos da invenção para TG2 extracelular de HK-2 células epiteliais foi ensaiada utilizando o seguinte protocolo.

Medição de atividade extracelular TG

A atividade extracelular TG foi medida por ELISA de célula modificada. HK-2 células epiteliais foram colhidas utilizando Accutase e plaqueadas a uma densidade de 2 × 104 células / poço em meio isento de soro para uma placa de 96 poços que tinha sido revestida durante a noite com 100 ul/ poço de fibronectina (5 ug / ml em 50 mM Tris-HCl pH 7,4) (Sigma, Poole, Reino Unido). As células foram deixadas a aderir durante S / N a 37 °C. O meio foi substituído com DMEM (Life Technologies) e compostos, anticorpos ou os controles foram adicionados e deixados a ligar a 37ºC. 0,1 mM de biotina cadaverina [N- (5 amino pentil biotinamida) de ácido trifluoroacético] (Zedira) foi adicionada aos poços e a placa voltou para 37 °C durante 2 horas. As placas foram lavadas duas vezes com 3 mM de EDTA / PBS e as células removidas com 0,1% (w / v) de desoxicolato 5 mM em EDTA / PBS. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para determinação de proteínas. As placas foram lavadas com PBS / Tween e revelou biotina incorporada cadaverina usando 1: 5000 extravidina HRP (Sigma, Poole, Reino Unido) durante 1 h à temperatura ambiente, seguido de substrato azul K (SkyBio).

A reação foi parada com vermelho do batente (SkyBio) e a absorvância foi lida a 4650 nm. Cada anticorpo foi testado em pelo menos três ocasiões separadas.

Os resultados são fornecidos nas Figuras 39 e 40 e mostram uma curva de exemplo e tabela de valores de IC 50 obtidos para os anticorpos testados. A Figura 39 mostra

os resultados com humanizada AB1 e Figura 40 mostra os resultados com humanizada BB7.

hAB005 inibiu a TG2 extracelular das células HK2 com um IC50 de 71.85nM e uma inibição máxima da atividade de controle de cerca de 30%. hBB001AA inibiu a atividade com um IC50 de 19.8nM e uma inibição máxima de 40% da atividade de controle. hBB001BB teve um melhor IC50 de 4.9nM mas uma inibição máxima de controle de cerca de 55%.

Raspadinha ensaios

Os ensaios de zero ferida também foram realizados para avaliar a atividade de ligação de anticorpos humanizados e quiméricos ou anti-TG2 da invenção.

TG2 tem sido mostrado ter um papel importante na fibrose pulmonar e TG2 ratinhos knockout para mostrar reduzida formação de cicatrizes e fibrose no modelo de bleomicina. (Keith C. Olsen, Ramil E. Sapinoro, RM Kottmann, Ajit A. Kulkarni, Siiri E. Iismaa, Gail Johnson VW, Thomas H. Thatcher, Richard P. Phipps, e Patricia J. Sime. (2011) Transglutaminase 2 e seu papel na fibrose pulmonar. Am.J of Respiratory & Critical Care Med. 184 0699-707) a migração de células de camundongos knockout TG2 no ferimento foi reduzida em relação ao tipo selvagem. Ensaio de ferida zero foram realizados para avaliar o efeito de anticorpos anti-TG2 da invenção sobre a taxa de encerramento de feridas humanizado e / ou quimérico numa camada de fibroblastos pulmonares normais (células WI-38).

Raspadinha protocolo do ensaio:

As células WI-38 (fibroblastos pulmonares humanos normais ATCC # CCL-gato 75) foram plaqueadas numa placa de 96 poços Imagem de bloqueio (Essen cat # 4379) a 2 x 104 / poço em meio aMEM (Life Technologies Cat # 32561) com 10% FBS e crescido O / N a> 97% de confluência. As células foram lavadas 2X com a meio aMEM sem soro e uma ferida scratch foi gerada usando uma ferida Criador Essen eo protocolo fabricantes. O meio foi removido e substituído com 95µl / meio isento de soro bem. Controles e anticorpos de teste foram adicionados aos poços. A placa

foi colocada num Essen Incucyte e o fechamento da ferida foi analisada utilizando o protocolo de zero ferida.

Citocalasina D foi utilizado como um controle de ensaio a 0,1 uM. R281, uma pequena molécula inibidora da transglutaminase não específica, foi testado a 100 uM. Z DON, um peptídeo inibidor reversível transglutaminase não foi testado a 10 uM e 100 uM. O anticorpo disponível comercialmente TG2 Cub7402 (Abcam cat # ab2386) foi testado a 5 ug / ml. Os anticorpos da invenção foram testados pelo menos em três ocasiões em várias concentrações, tal como indicado. Em todos os experimentos controles foram Citocalasina D em 0.1um e ZDON em duas concentrações de mostrar um efeito dose-dependente.

Exemplares resultados dos ensaios de raspar são mostrados nas Figuras 41 a 44. Tal como pode ser visto na Figura 41, Citocalasina D, R281 e ZDON todo o fechamento da ferida inibida (ZDON foi mostrado para inibir de um modo dependente da dose), mas o anticorpo não Cub7402 inibir o fechamento da ferida. BB7 humanizado, AB1 humanizado e quimérico DC1 tudo o fechamento da ferida inibido.

As afinidades dos quiméricos e humanizados anti TG2 Abs

As afinidades de ligação (Kd) e as taxas de desconto para um painel de Abs quiméricos e humanizados da invenção contra humana TG2 e ciano TG2 foram avaliados utilizando técnicas de Biacore. Os protocolos e resultados estão descritos abaixo e mostrado nas Figuras 45 a 47.

métodos Biacore

Recombinante humana foi obtida TG2 de Zedira GmbH (cat. .: Não T002). Macaco Cynomolgus recombinante TG2 foi obtido a partir de Trenzyme. Ressonância de plasmon de superfície (SPR) foi medida num instrumento Biacore T200 (GE Healthcare). Fichas CM5 (GE Healthcare cat. No .: BR-1006-1068) foram revestidas com o mouse monoclonal IgG1 anti-humana (Fc) (MAH) anticorpo (cat GE Healthcare. No .: BR-1008-1039) por amina de acoplamento tal como descrito nas instruções do fabricante. Tampão HBS-EP + (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA

3 mM, 0,05% v / v Tensioativo P20) e HBS-P + tampão (0,01 M de HEPES, 0,15 M de NaCl, 0,05% Surfactante P20) foram adquiridos da GE Healthcare quanto 10x stocks (cat. No.: BR-1006-1069 e BR-1006-1071). Solução de cloreto de cálcio foi obtida a partir de Sigma Aldrich (cat No.: 21115).

O método utilizado para determinar a afinidade dos anticorpos anti-TG2 envolveu a captura dos anticorpos quiméricos ou humanizados num chip CM5 revestido MAH, seguido pela injeção de uma série de amostras de TG2 em tampão de corrida. O tampão de corrida foi de 1 x HBS-P + contendo $CaCl_2$ 1 mM, 1x ou HBS-EP + para experiências livres de cálcio. O anticorpo de captura foi efetuada durante um tempo de contato de 120 segundos a uma taxa de fluxo de 10 mL/ min, resultando na captura de cerca de 40-80 RU. TG2 foi injectado sobre o anticorpo imobilizado em concentrações que variam de 25 nM a 400 nM com um tempo de contacto de até 600 segundos, a uma velocidade de fluxo de 30 mL / min. A dissociação de TG2 foi medido tipicamente por até 5.400 segundo (1,5 horas). Regeneração do chip foi então realizada utilizando 3 M de $MgCl_2$, para um tempo de contacto de 60 segundos a um caudal de 30 ul/ml, seguido de um período de estabilização 300s antes da amostra seguinte. Para cada macaco cinomolgo e humano TG2, pelo menos, cinco injeções a uma variedade de concentrações foram realizadas em pelo menos duas experiências separadas.

Dados Cinéticos foram exportados a partir de Biacore T200 Evaluation Software e analisados usando GraphPad Prism, onde as fases de associação e fases de dissociação foram analisados separadamente, utilizando um modelo de associação uma fase e uma fase modelo de decaimento exponencial, respectivamente. As taxas de associação (k_{on}) foram calculadas para cada curva individualmente, e os valores médios de dissociação (k_{off}) a partir dos dados coletados da fase longa de dissociação. Onde os valores k_{off} foram calculados para ser < $1x10^{-5}$ s^{-1}, valores foram estabelecidos $1x10^{-5}$ para análise, como as taxas mais lentas do que isso não podem ser estimadas com precisão. Valores de k_{on} e k_{off} são apresentados em tabelas abaixo como significa valores indivduais calculados para cada anticorpo de

espécie TG2 a partr de múltiplas concentrações +/- 1 de desvio padrão. Valores K_D são calculados como média k_{off}/ média k_{on}.

Resultados das experiências de Biacore

Tabela 25

Anticorpo		TG2 Humano				
		k_{off} (s^{-1})	st.dev	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	st.dev	K_D (M)
cAB003	+ Ca^{2+}	< 10^{-5}	-	$1.7x10^{5}$	$3.2x10^{4}$	< $6x10^{-11}$
	- Ca^{2+}	< 10^{-5}	-	$8.6x10^{4}$	$2.1x10^{4}$	< $1x10^{-10}$
cBB001	+ Ca^{2+}	< 10^{-5}	-	$2.1x10^{5}$	$6.9x10^{4}$	< $5x10^{-11}$
	- Ca^{2+}	< 10^{-5}	-	$1.5x10^{5}$	$1.8x10^{4}$	< $7x10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$2.4x10^{-5}$	$1.0x10^{-5}$	$2.0x10^{5}$	$1.4x10^{5}$	$1.2x10^{-10}$
hAB005 (hAB001AJ)		< 10^{-5}	-	$1.9x10^{5}$	$6.8x10^{4}$	< $5x10^{-11}$
hBB001AA		< 10^{-5}	-	$2.7x10^{5}$	$1.1x10^{5}$	< $4x10^{-11}$
hBB001BB		< 10^{-5}	-	$2.4x10^{5}$	$1.2x10^{5}$	< $4x10^{-11}$
cDC001		< 10^{-5}	-	$3.2x10^{5}$	$5.7x10^{4}$	< $3x10^{-11}$
cDH001	+ Ca^{2+}	$1.8x10^{-5}$	$4.9x10^{-6}$	$2.8x10^{4}$	$1.3x10^{4}$	$6.4x10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$4.9x10^{-4}$	$1.6x10^{-5}$	$2.1x10^{4}$	$1.2x10^{4}$	$2.3x10^{-8}$
cDD9001	+ Ca^{2+}	$1.3x10^{-5}$	$1.8x10^{-6}$	$3.0x10^{4}$	$2.3x10^{4}$	$4.3x10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$7.1x10^{-5}$	$1.6x10^{-5}$	$2.3x10^{4}$	$7.6x10^{3}$	$3.1x10^{-9}$

A Tabela 25 mostra os dados cinéticos obtidos frente ao TG2 humano. Onde taxas k_{off} foram calculadas para ser menos do que 10^{-5} s^{-1}, valores foram estabelecidos para 10^{-5} s^{-1} para análise, como taxas mais lentas que esta não poderiam ser medidas com a precisão determinada.

Table 26

Anticorpo		TG2 Cinómolgo				
		k_{off} (s^{-1})	st.dev	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	st.dev	K_D (M)
cAB003	+ Ca^{2+}	$1.2x10^{-5}$	$8.1x10^{-6}$	$2.4x10^{5}$	$1.1x10^{5}$	$5.0x10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$1.3x10^{-5}$	$1.5x10^{-6}$	$1.4x10^{5}$	$1.9x10^{4}$	$9.3x10^{-11}$
cBB001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$2.9x10^{5}$	$9.0x10^{4}$	$< 3x10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1.9x10^{5}$	$2.1x10^{4}$	$< 5x10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$1.8x10^{-5}$	$2.3x10^{-6}$	$1.6x10^{5}$	$7.3x10^{4}$	$1.1x10^{-11}$
hAB005 (hAB001AJ)		$3.4x10^{-5}$	$4.6x10^{-6}$	$1.4x10^{5}$	$4.1x10^{4}$	$2.4x10^{-10}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	$3.0x10^{5}$	$1.4x10^{5}$	$< 3x10^{-11}$
hBB001BB		$3.7x10^{-5}$	$3.4x10^{-6}$	$2.7x10^{5}$	$1.3x10^{5}$	$1.4x10^{-10}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	$4.2x10^{5}$	$3.3x10^{5}$	$2.4x10^{-11}$
cDH001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1.5x10^{4}$	$9.5x10^{3}$	$< 7x10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$6.3x10^{-5}$	$1.2x10^{-5}$	$2.6x10^{4}$	$1.0x10^{4}$	$2.4x10^{-9}$
cDD9001	+ Ca^{2+}	$1.6x10^{-5}$	$1.4x10^{-5}$	$3.1x10^{4}$	$1.6x10^{4}$	$5.2x10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$4.1x10^{-5}$	$1.6x10^{-5}$	$4.6x10^{4}$	$1.3x10^{4}$	$8.9x10^{-10}$

A Tabela 26 mostra os dados cinéticos obtidos contra cinomolgo TG2. Quando as taxas foram calculadas a koff ser inferior a 10^{-5} s^{-1}, os valores foram ajustados para 10^{-5} s^{-1}para análise, como as taxas mais lentas que isto não podia ser determinada com precisão.

As Figuras 45 a 47 fornecem conjuntos de dados exemplo Biacore. Como pode ser visto, os anticorpos quiméricos e humanizados cAB003, cBB001, hAB004, hAB005, hBB001AA, hBB001BB, cDC001 para TG2 têm excelente afinidade para TG2 humano e cinomolgo, com valores de K_D de 120pM ou melhor. Os anticorpos quiméricos cDH001 e taxas de associação cDD9001 exposição mais lenta a afinidade global humana e cinomólogo TG2 e mais fraco. Exame de uma seleção de anticorpos na ausência de cálcio mostra que existe pouco ou nenhum efeito,

exceto no caso de cDH001 e cDD9001, onde ligação é mais fraca devido a taxas de dissociação mais rápidas (k_{off}).

REIVINDICAÇÕES

1 “**ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO MESMO”** que seletivamente liga um epítopo dentro da região do núcleo da transglutaminase (TG2) do tipo 2 e que inibe o TG2 humano reticulante de lisina e glutamina com Nε(γ-glutamyl)ligações lisina isopeptídicas caracterizado por à região central de TG2 encontrar-se da posição 143 a 473 da proteína, referido anticorpo ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreender as seguintes sequências de aminoácidos:

(i) SEQ ID NO: 7 (LCDR1);
SEQ ID NO: 17 (LCDR2);
SEQ ID NO: 9 (LCDR3);
SEQ ID NO: 18 (HCDR1);
SEQ ID NO: 15 (HCDR2); e
SEQ ID NO: 19 (HCDR3); ou

(ii) SEQ ID NO: 7 (LCDR1);
SEQ ID NO: 13 (LCDR2);
SEQ ID NO: 14 (LCDR3);
SEQ ID NO: 10 (HCDR1);
SEQ ID NO: 15 (HCDR2); e
SEQ ID NO: 16 (HCDR3); ou

(iii) SEQ ID NO: 7 (LCDR1);
SEQ ID NO: 8 (LCDR2);
SEQ ID NO: 9 (LCDR3);
SEQ ID NO: 10 (HCDR1);
SEQ ID NO: 11 (HCDR2); e
SEQ ID NO: 12 (HCDR3).

2.- “**ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO MESMO”** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o anticorpo ou o seu fragmento possuir (i) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma

sequência SEQ ID NO: 73 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência SEQ ID NO: 75 ou (ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência SEQ ID NO: 63 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência SEQ ID NO: 65 ou (iii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência SEQ ID NO: 50, e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência SEQ ID NO: 55.

3.- **"ANTICORPO"** de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por o (a) anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreender ou consistir de anticorpo intacto (b) fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir do grupo que consiste em um fragmento Fv (por exemplo um fragmento Fv de cadeia simples ou um fragmento Fv ligado por dissulfeto); um fragmento Fab; e um fragmento Fab do tipo (por exemplo, um fragmento Fab' ou um fragmento F $(ab)_2$), (c) o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno é uma IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e/ou (d) o anticorpo ou fragmento do mesmo não inibe de ligação com o antígeno TG1, TG3, TG13 e/ou atividade TG7.

4.- **"COMPOSTO COMPREENDENDO UM ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO"** de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por uma porção adicional ser prontamente detectável, e/ou uma porção diretamente ou indiretamente citotóxica.

5.- **"COMPOSIÇÃO FARMACEUTICA"** caracterizada por compreender anticorpo ou fragmento de ligação ao seu antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, ou um composto de acordo com a reivindicação 4 ~~5~~, em mistura com um excipiente, adjuvante, diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável opcionalmente por ainda compreender um ou mais ingredientes ativos adicionais.

6.- **"COMPOSIÇÃO FARMACEUTICA"** de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por a composição/formulação ser formulada para administração intravenosa, intramuscular ou subcutânea a um paciente.

7.- "**USO DO ANTICORPO OU DO FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO"**

de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3 ou um composto com a reivindicação 4 caracterizado por se dar na fabricação de um medicamento.

8.- **"USO DO ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO"** de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3 ou um composto de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por ser empregado fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou diagnóstico de doença celíaca, cicatrização anormal de feridas, cicatrizes, cicatrizes hipertróficas, cicatriz ocular, doença inflamatória do intestino, degeneração macular, por drogas, psoríase, fibroses- doenças relacionadas (por exemplo, fibrose hepática, fibrose pulmonar tal como doença intersticial pulmonar e doença pulmonar fibrótica, fibrose cardíaca, fibrose da pele, mielofibrose, fibrose renal tais como glomerulosclerose e fibrose tubulointersticial), aterosclerose, restenose, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas / neurológica doenças (por exemplo, a doença de Huntington, a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de poliglutamina, atrofia muscular espinobulbar, atrofia ataxia dentato-rubro-palido-luisiana, ataxias espinocerebelares 1, 2, 3, 6, 7 e 12, atrofia rubropallidal, spinocerebellar paralisia), (glioblastomas, tais como, glioblastoma na síndrome de Li-Fraumeni e glioblastoma esporádica, melanomas malignos, adenocarcinomas do duto pancreático, leucemia mielóide, leucemia mielóide aguda, síndrome mielodisplásica, síndroma mieloproliferativo, ginecológico, sarcoma de Kaposi, doença de Hansen e/ou, colite colagenosa).

9.- **"MÉTODO *IN VITRO* DE PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO"** de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou do composto da reivindicação 4, caracterizado por compreender a expressão de um polinucleotídeo que codifica o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

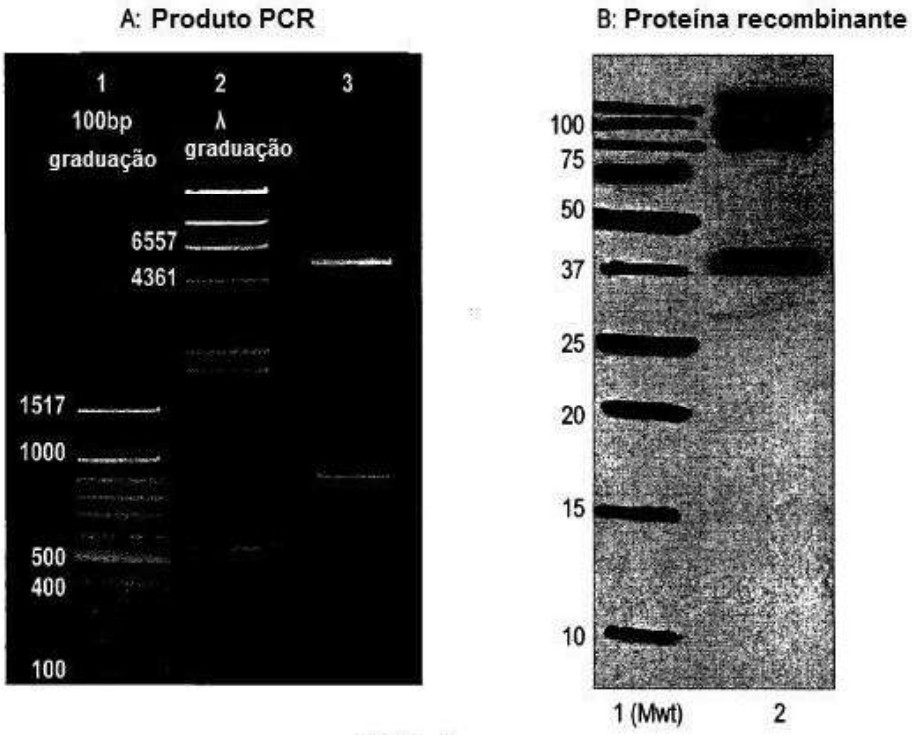

A: Produto PCR
1
100bp
graduação
2
λ
graduação
3
6557
4361
1517
1000
500
400
100
B: Proteína recombinante
100
75
50
37
25
20
15
10
1 (Mwt)
2

FIG. 1

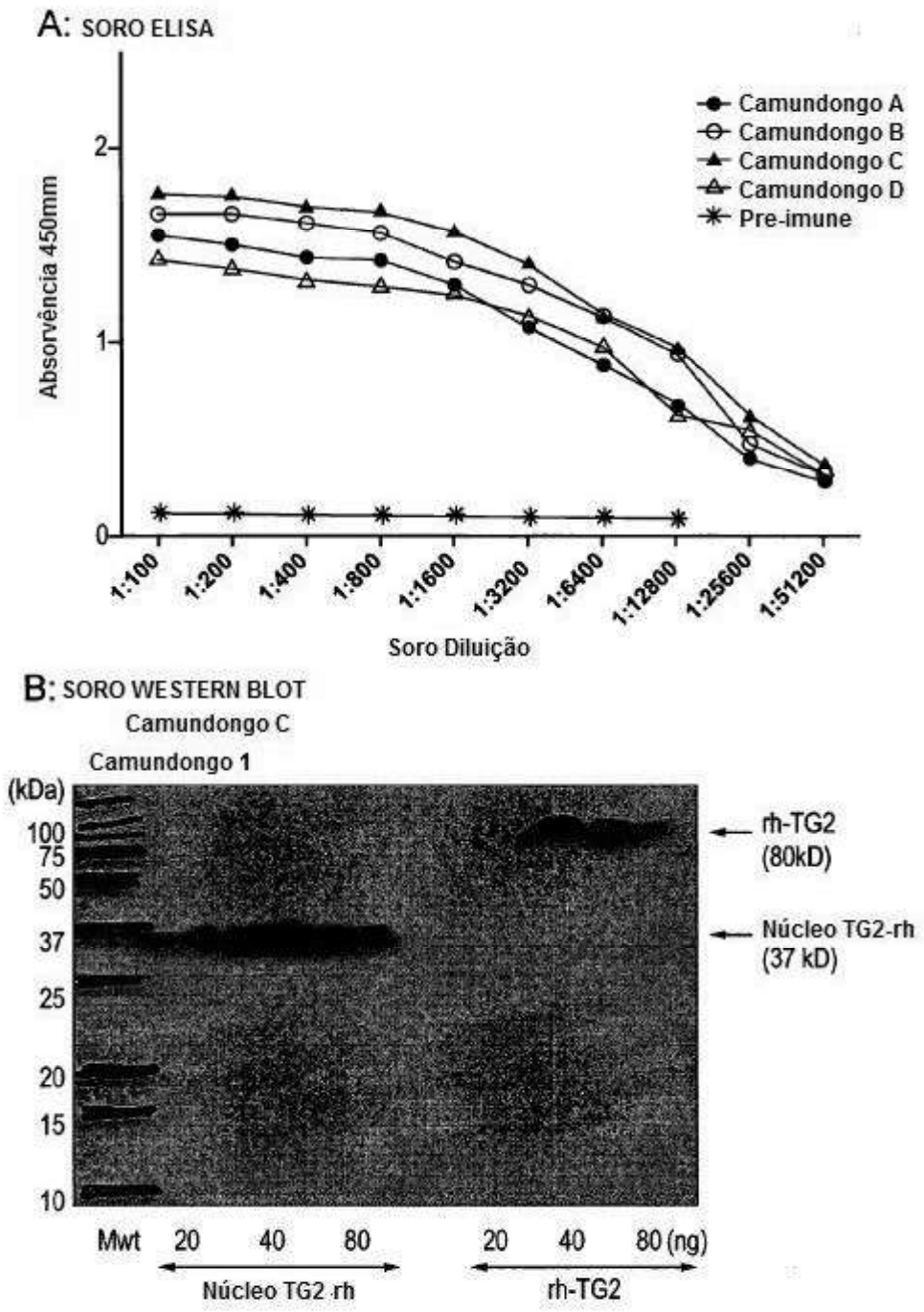
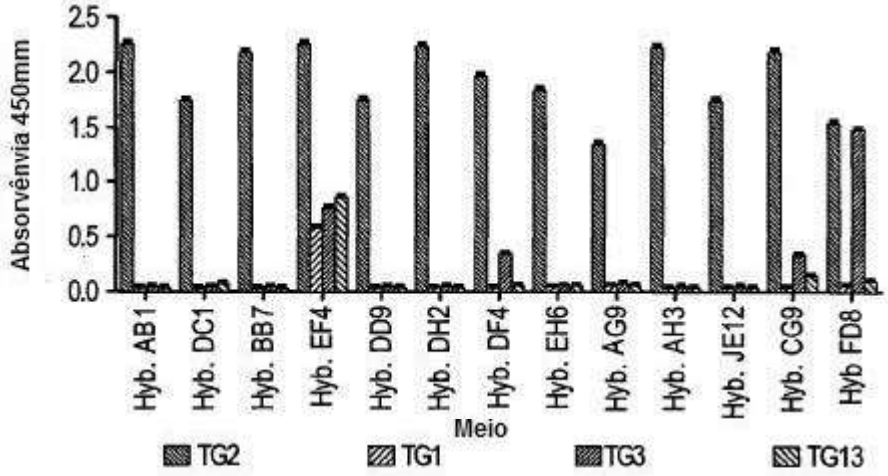

A: SORO ELISA
Absorvência 450mm
2
1
0
Camundongo A
Camundongo B
Camundongo C
Camundongo D
Pre-imune
1:100
1:200
1:400
1:800
1:1600
1:3200
1:6400
1:12800
1:25600
1:51200
Soro Diluição
B: SORO WESTERN BLOT
Camundongo C
Camundongo 1
(kDa)
100
75
50
37
25
20
15
10
rh-TG2
(80kD)
Núcleo TG2-rh
(37 kD)
Mwt
20
40
80
20
40
80 (ng)
Núcleo TG2-rh
rh-TG2

FIG. 2

A: Exibição inicial de meio condicionado



B: Reatividade mAbs clonagem pura

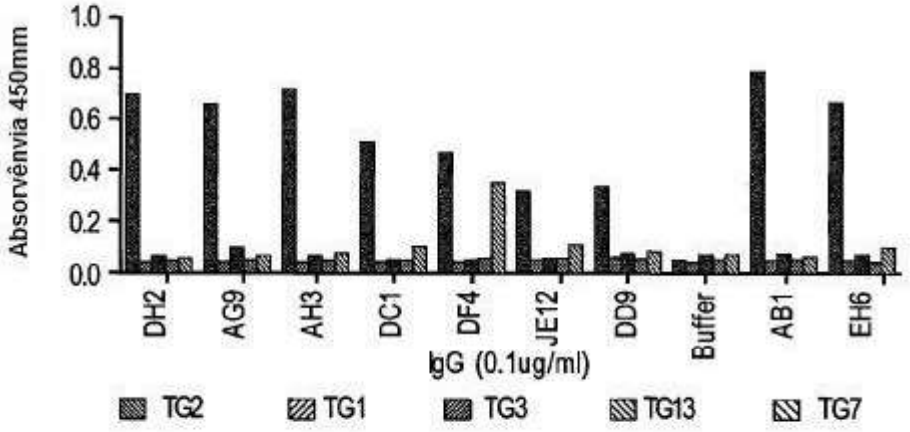


FIG. 3

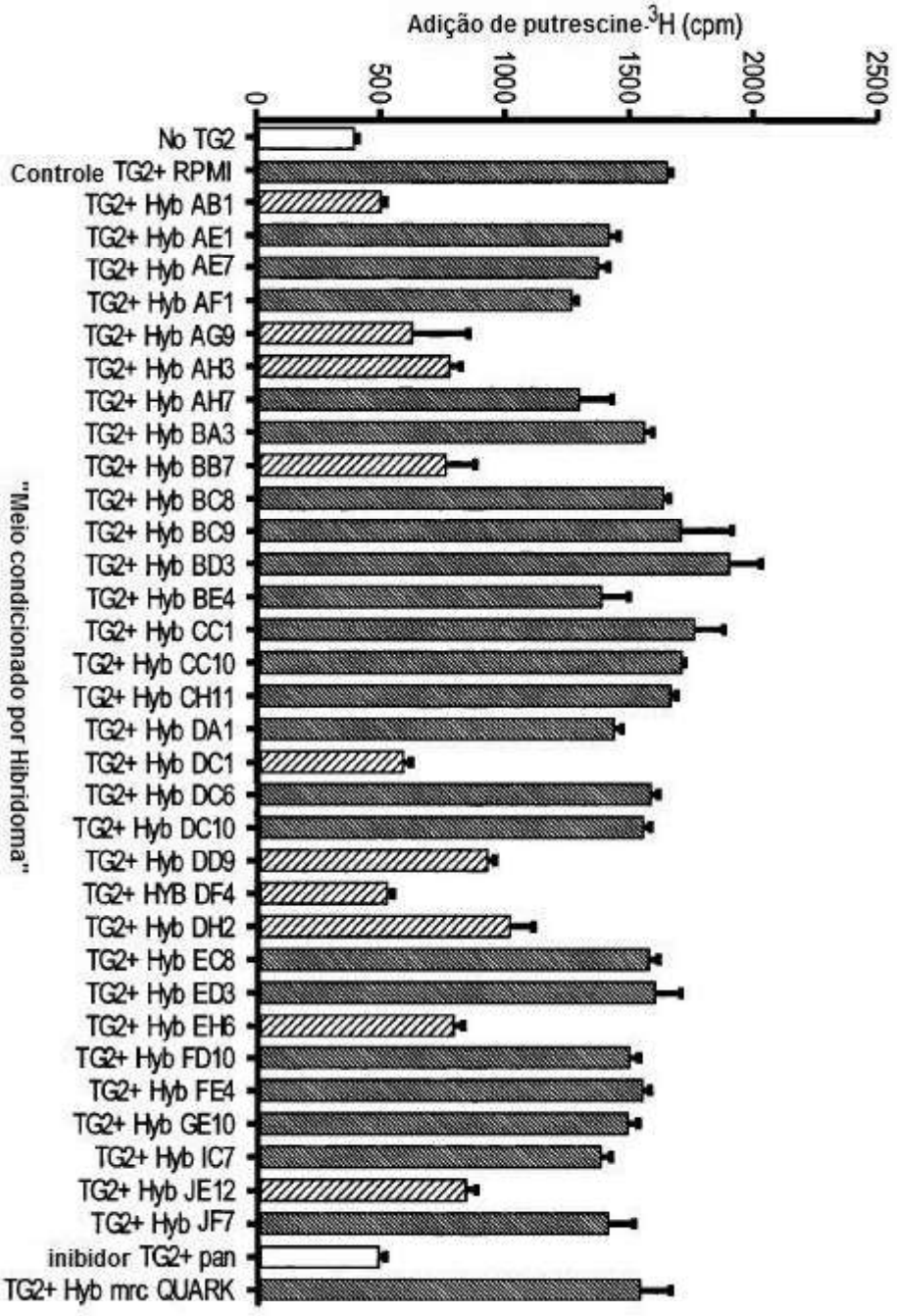

Adição de putrescine-^{3}H (cpm)
0
500
1000
1500
2000
2500
"Meio condicionado por Hibridoma"
No TG2
Controle TG2+ RPMI
TG2+ Hyb AB1
TG2+ Hyb AE1
TG2+ Hyb AE7
TG2+ Hyb AF1
TG2+ Hyb AG9
TG2+ Hyb AH3
TG2+ Hyb AH7
TG2+ Hyb BA3
TG2+ Hyb BB7
TG2+ Hyb BC8
TG2+ Hyb BC9
TG2+ Hyb BD3
TG2+ Hyb BE4
TG2+ Hyb CC1
TG2+ Hyb CC10
TG2+ Hyb CH11
TG2+ Hyb DA1
TG2+ Hyb DC1
TG2+ Hyb DC6
TG2+ Hyb DC10
TG2+ Hyb DD9
TG2+ HYB DF4
TG2+ Hyb DH2
TG2+ Hyb EC8
TG2+ Hyb ED3
TG2+ Hyb EH6
TG2+ Hyb FD10
TG2+ Hyb FE4
TG2+ Hyb GE10
TG2+ Hyb IC7
TG2+ Hyb JE12
TG2+ Hyb JF7
inibidor TG2+ pan
TG2+ Hyb mrc QUARK

FIG. 4

Petição 870210093852, de 11/10/2021, pág. 34/101

Grupo 1: Localização - na parte frontal do local ativo - receptáculo se ligando ao substrato

```
  AB-1,     AG-1,     AH-1,    BB-7,     DC-1,     EH-6,     JE-12
camundongo TG2  YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELESNKSEMI
rato            YNSAHDQNSNLLIEYFRNEYGELESNKSEMI
homem           YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQGDKSEMI
                ********************:**:::.:******
```

Grupo 2: Localização - na parte traseira do núcleo atrás do local ativo

```
  DF-4
camundongo TG2  SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQAIDPTPQEKSEGTYCCGPVS
rato            SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQAIDPTPQEKSEGTYCCGPVS
homem           SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGTYCCGPVP
                ********************************:*****************.
```

Grupo 3: Localização - na parte traseira da junção do núcleo com barril beta-1 que envolve o local de licação do Cálcio

```
  DD-9 and DH-2
camundongo TG2  TYKYPEGSPEEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
rato            TYKYPEGSPEEREVFTRANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
homem           TYKYPEGSSEEREAFTRANHLNKLAEKEETGMAMRIRVG
                ********.****.**:**************:*******
```

FIG. 5

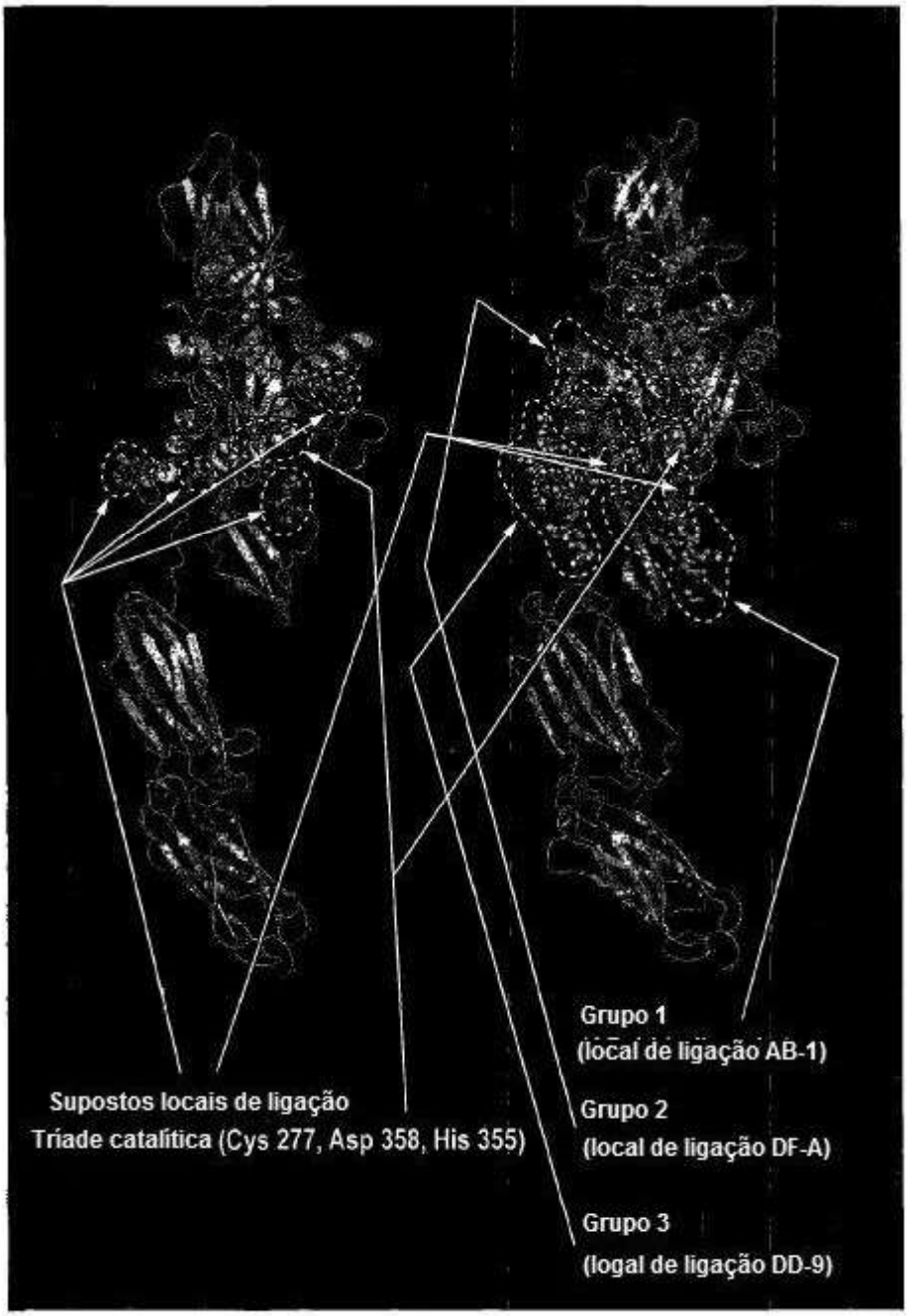

Grupo 1
(local de ligação AB-1)
Grupo 2
(local de ligação DF-A)
Grupo 3
(logal de ligação DD-9)
Supostos locais de ligação
Tríade catalítica (Cys 277, Asp 358, His 355)

FIG. 6

Anticorpos AB-A

AB1 VH

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGC
CAGACTCCGGACAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGTTGGTGGTGGTAAA
ACCCACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG
AACACCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTAC
TGTGCAAAACTAATCAGTCTCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AB1 VH

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGK
THYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS

AB1 VK

GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTC
ACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAG
AAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGG
GTCCCATCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTTCTCACCATCAGC
AGCCTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCCG
TACACGTTCGGAGGGGGGACCAAACTGGAAATAAAA

AB1 VK

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 7

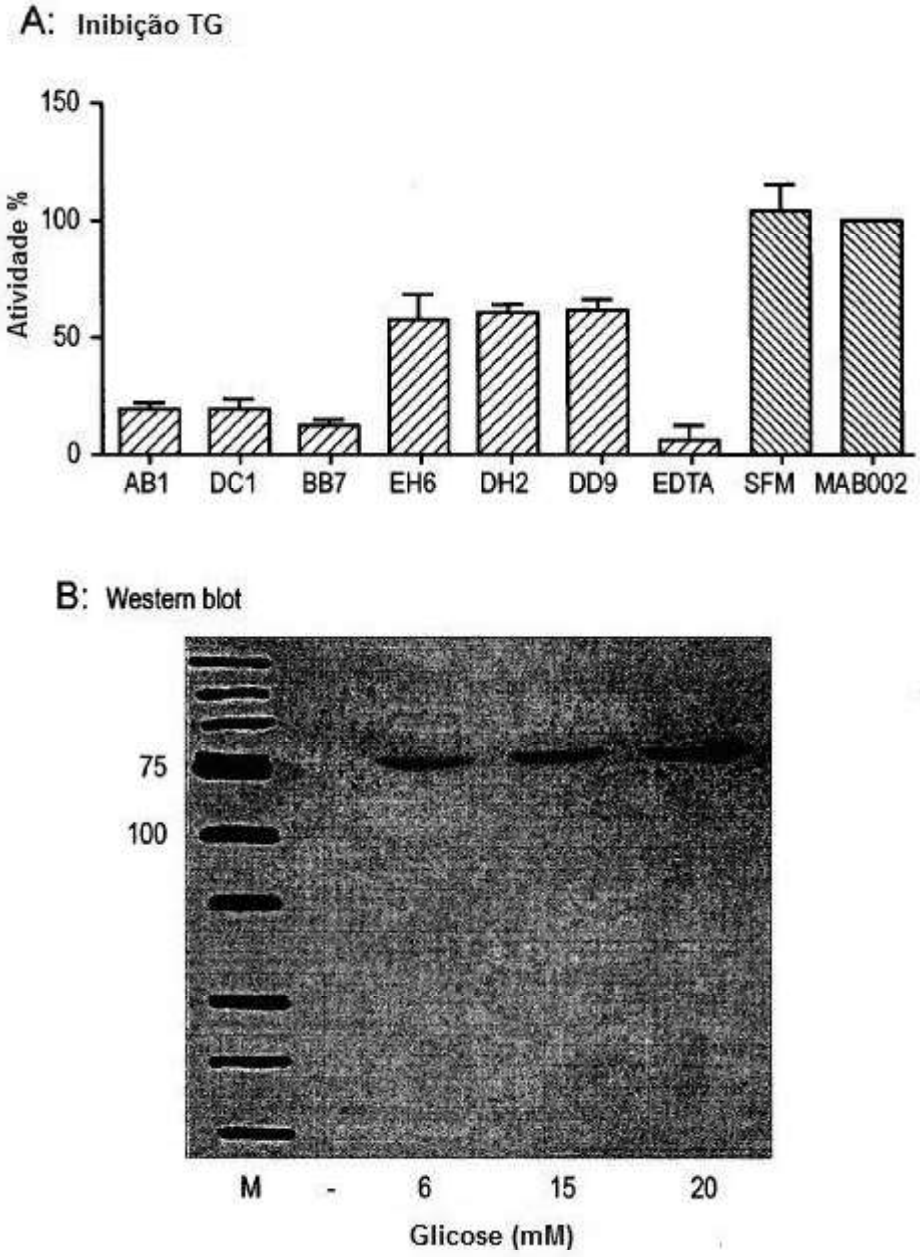

A: Inibição TG
Atividade %
150
100
50
0
AB1
DC1
BB7
EH6
DH2
DD9
EDTA
SFM
MAB002
B: Western blot
75
100
M
-
6
15
20
Glicose (mM)

FIG. 8

Petição 870210093852, de 11/10/2021, pág. 38/101

	IC50 hTG2 (mg/ml IgG por ng TG2)	IC50 rTG2 (mg/ml IgG por ng TG2)	IC50 mTG2 (mg/ml IgG por ng TG2)	Proporção homem/rato	Proporção de hTG2 IC50 para o melhor inibidor no homem	Proporção de rTG2 IC50 para o melhor inibidor no homem
AB1	$1.09x10^{-5}$	NI	NI	-	1	-
DC1	$1.23x10^{-5}$	NI	NI	-	1.1	-
BB7	$1.59x10^{-5}$	$3.2x10^{-4}$	NI	20	1.47	29.4
AG9	$4.87x10^{-5}$	NI	NI	-	4.47	-
DD9	$5.24x10^{-5}$	$3.03x10^{-4}$	NI	6	4.87	29.22
DH2	$6.7x10^{-5}$	$2.23x10^{-4}$	NI	-	6.2	38.13
EH6	$6.9x10^{-5}$	$4.03x10^{-4}$	NI	5.8	6.33	36.714
AH3	$7.8x10^{-5}$	NI	NI	-	7.1	-
JE12	$12.3x10^{-6}$	NI	NI	-	11.3	-

FIG. 9

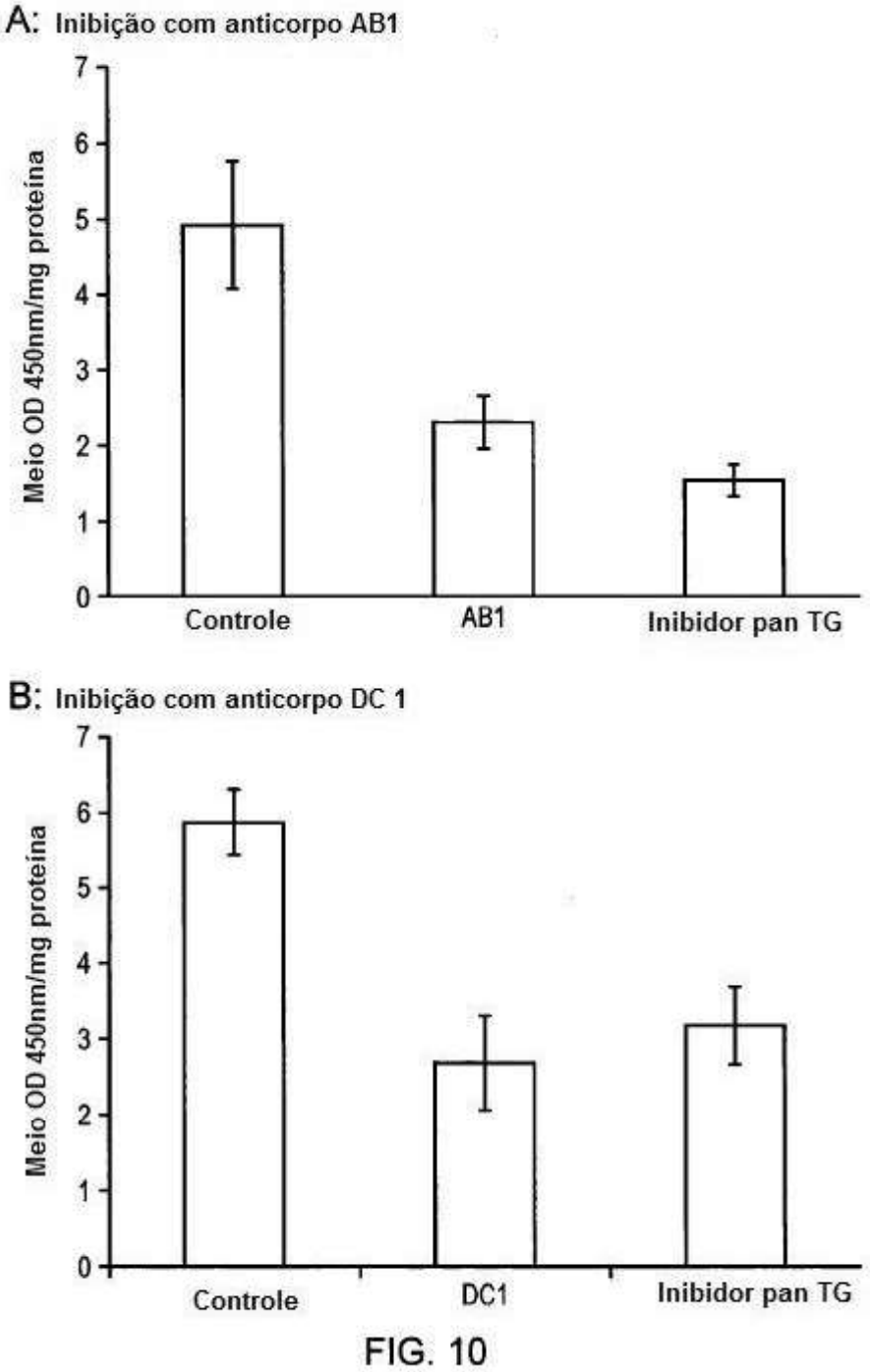

A: Inibição com anticorpo AB1
Meio OD 450nm/mg proteína
0
1
2
3
4
5
6
7
Controle
AB1
Inibidor pan TG
B: Inibição com anticorpo DC 1
Meio OD 450nm/mg proteína
0
1
2
3
4
5
6
7
Controle
DC1
Inibidor pan TG

FIG. 10

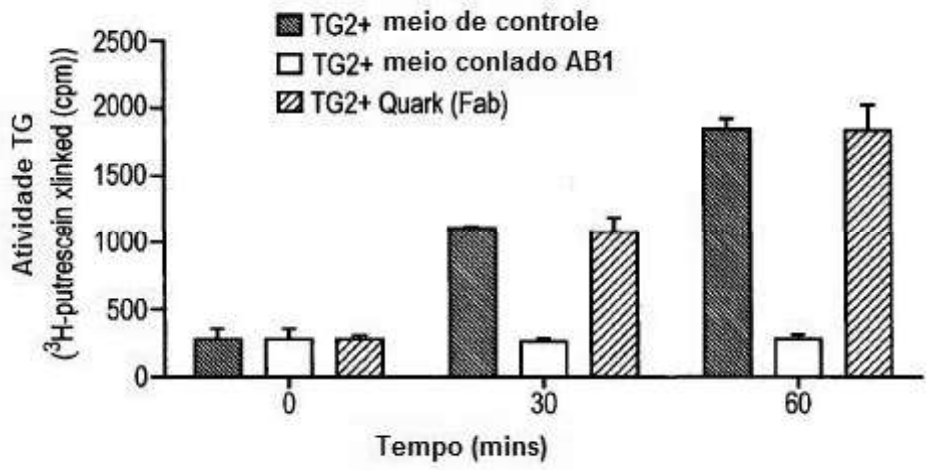

TG2+ meio de controle
TG2+ meio conlado AB1
TG2+ Quark (Fab)
Atividade TG
(^{3}H-putrescain xlinked (cpm))
2500
2000
1500
1000
500
0
0
30
60
Tempo (mins)

FIG. 11

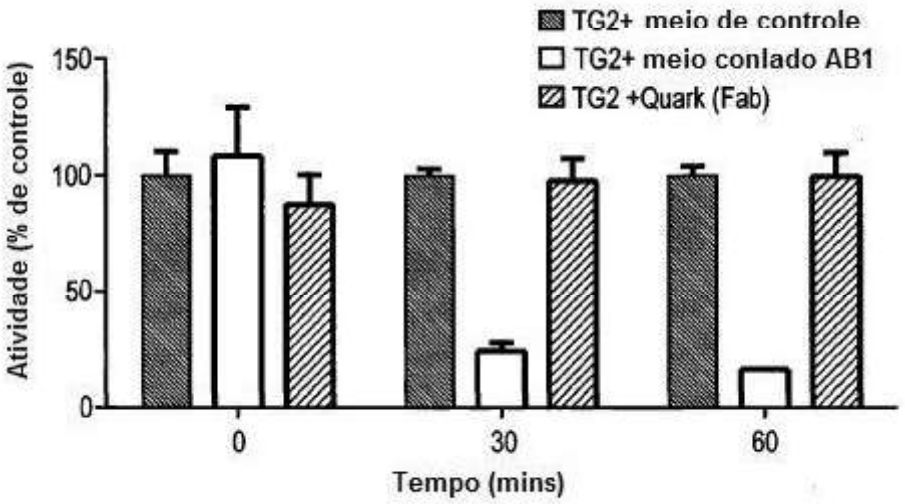

TG2+ meio de controle
TG2+ meio conlado AB1
TG2 +Quark (Fab)
Atividade (% de controle)
150
100
50
0
0
30
60
Tempo (mins)

FIG. 12

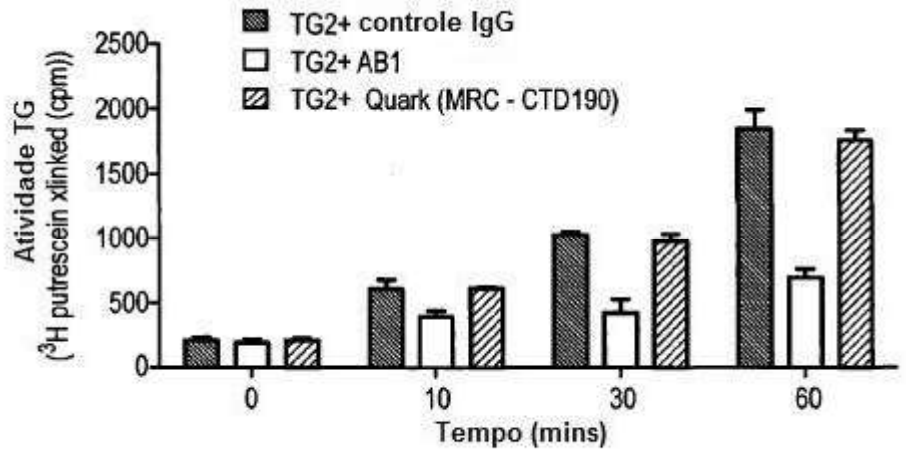

TG2+ controle IgG
TG2+ AB1
TG2+ Quark (MRC - CTD190)
Atividade TG
(^{3}H putrescein xlinked (cpm))
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
30
60
Tempo (mins)

FIG. 13

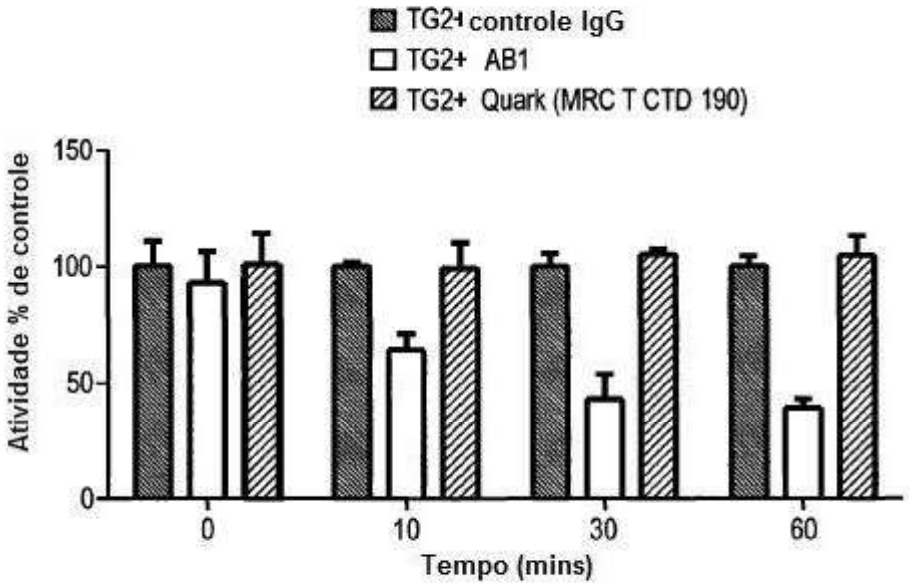

TG2+ controle IgG
TG2+ AB1
TG2+ Quark (MRC T CTD 190)
Atividade % de controle
150
100
50
0
0
10
30
60
Tempo (mins)

FIG. 14

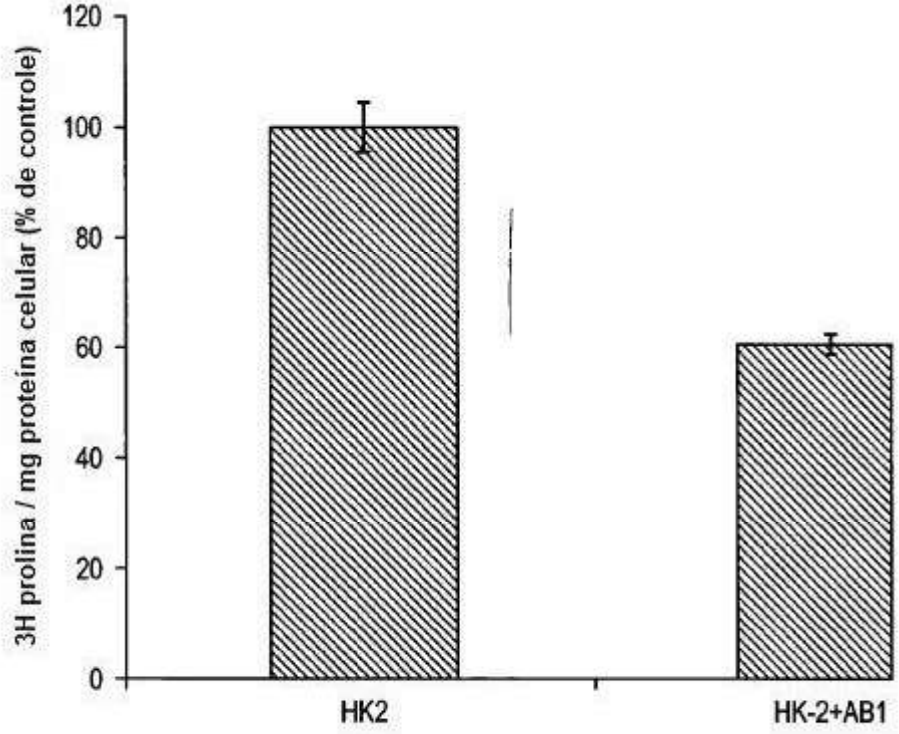

3H prolina / mg proteína celular (% de controle)
120
100
80
60
40
20
0
HK2
HK-2+AB1

FIG. 15

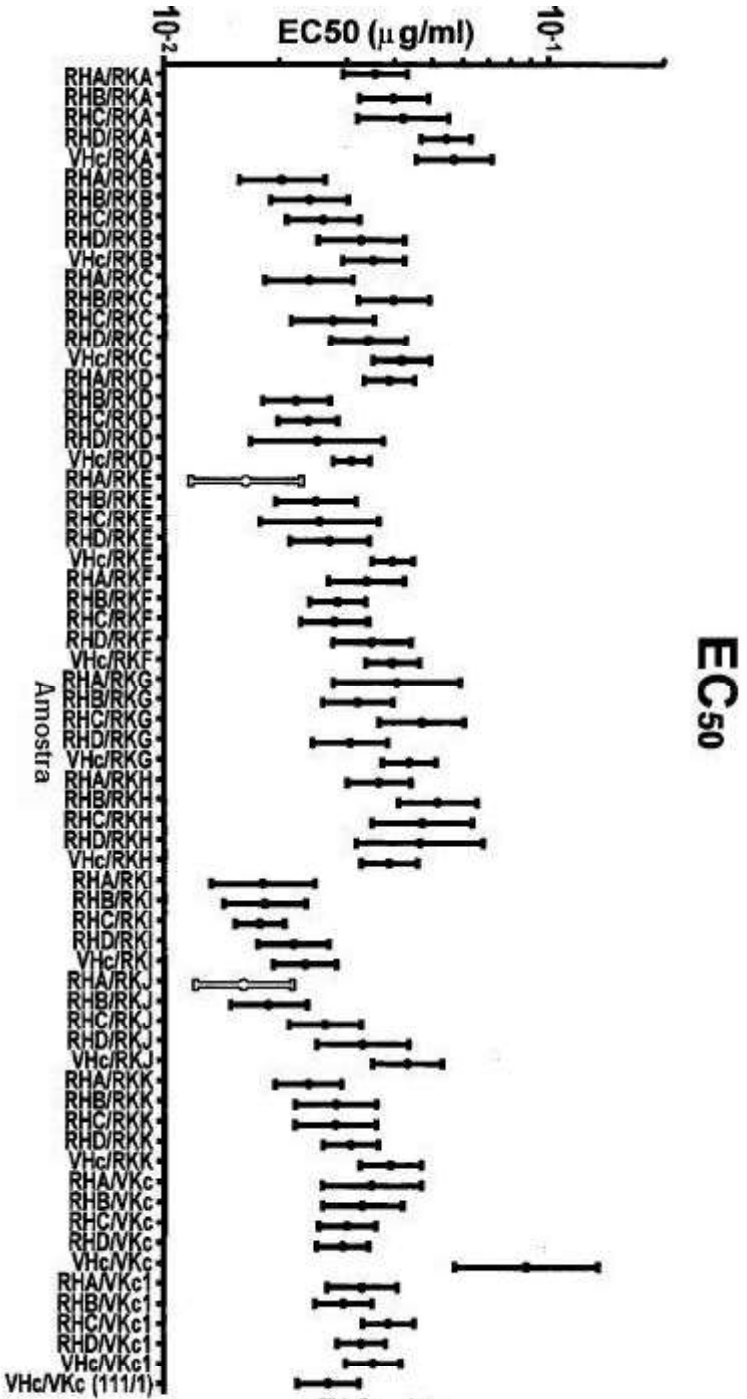

EC50 (μg/ml)
10-2
10-1
Amostra
RHA/RKA
RHB/RKA
RHC/RKA
RHD/RKA
VHc/RKA
RHA/RKB
RHB/RKB
RHC/RKB
RHD/RKB
VHc/RKB
RHA/RKC
RHB/RKC
RHC/RKC
RHD/RKC
VHc/RKC
RHA/RKD
RHB/RKD
RHC/RKD
RHD/RKD
VHc/RKD
RHA/RKE
RHB/RKE
RHC/RKE
RHD/RKE
VHc/RKE
RHA/RKF
RHB/RKF
RHC/RKF
RHD/RKF
VHc/RKF
RHA/RKG
RHB/RKG
RHC/RKG
RHD/RKG
VHc/RKG
RHA/RKH
RHB/RKH
RHC/RKH
RHD/RKH
VHc/RKH
RHA/RKI
RHB/RKI
RHC/RKI
RHD/RKI
VHc/RKI
RHA/RKJ
RHB/RKJ
RHC/RKJ
RHD/RKJ
VHc/RKJ
RHA/RKK
RHB/RKK
RHC/RKK
RHD/RKK
VHc/RKK
RHA/VKc
RHB/VKc
RHC/VKc
RHD/VKc
VHc/VKc
RHA/VKc1
RHB/VKc1
RHC/VKc1
RHD/VKc1
VHc/VKc1
VHc/VKc (111/1)
EC50

FIG. 16

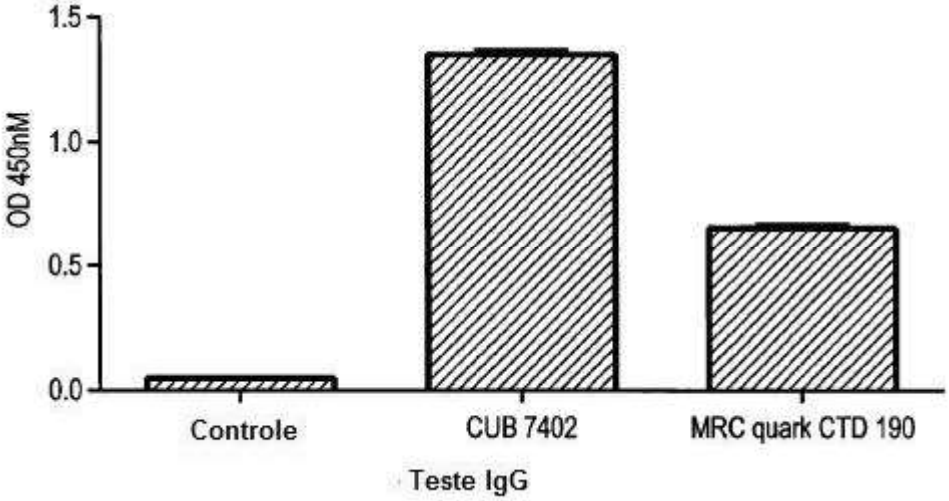

1.5
1.0
0.5
0.0
OD 450nM
Controle
CUB 7402
MRC quark CTD 190
Teste IgG

FIG. 17

Anticorpo AB-1

AB1_VH

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGG
ACAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGTTGGTGGTGGTAAAACCTACTATCCAGAC
AGTGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTCTATCTGCAAAT
GAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAAACTAATCAGTCTCTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AB1_VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPD
SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS

AB1_VK

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTAT
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGA
AATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGGGTCCCATCCAGGTTC
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATATGAAGATAT
GGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAAC
TGGAAATAAAA

AB1_VK

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRF
SGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 18

Anticorpo BB-7

BB7_VH

GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGAATCATTTTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGG
AAAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACTATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTATCCAGAC
AGTGTGAAGGGTCGATTCACCGTCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACACCCTATACCTGCAAAT
GGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCAAAACTAATCAGTCCCTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

BB7_VH

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIIFSSSAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD
SVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDTAIYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS

BB7_VK

GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCATCAT
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATAAATAGTTATTTAACCTGGTTCCAACAGAAACCAGGAA
AGTCTCCTAAGACCCTGATCTATCTTACAAATAGATTGATGGATGGGGTCCCATCAAGGTTC
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGAATTTTTACTCACCATCAGCGGCCTGGAACATGAAGATAT
GGGCATTTATTATTGTCTCCAGTATGTTGACTTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGC
TGGAAATAAAA

BB7_VK

AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDGVPSRF
SGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 19

Anticorpo DC-1

DC1_VH

GAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTACCCATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGG
AGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTATCCAGAC
AGTGTGAAGGGTCGATTCACTATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCTATATCTGCAACT
GAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCAAGACTAATCAGTACCTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

DC1_VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSTHAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD
SVKGRFTISRDNVKNTLYLQLSSLRSEDTAVYFCARLISTYWGQGTTLTVSS

DC1_VK

GACATCACGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTGGGAGAGAGAGTCACTAT
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGA
AATCTCCTAAGATCCTGATCTATCTTGTAAATAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTC
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATGCTCTCACCATCAGCAGTCTGGAATATGAAGATAT
GGGAATTTATTATTGTCTACAATATGATGACTTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGC
TGGAAATAAAA

DC1_VK

DITMTQSPSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRLVDGVPSRF
SGSGSGQDYALTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 20

Anticorpo JE-12

JE12_VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAAGGCTTCTGGATACAGATTCACTAGCTATGTTATGCACTGGGTGAAACAGAAGTCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAAGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCT
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATCTAGTGACTATT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

JE12_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTSYVMHWVKQKSGQGLEWIGYINPYNDGAKYNE
KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS

JE12_VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT
CTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGAACATATTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
GTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAGGATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAAGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTTCACGTTCG
GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

JE12_VK

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIEHINGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPFTFGGGTKLEIK

FIG. 21

Anticorpo EH-6

EH6_VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGTTATGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATTTATTAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACCTCAGACAAAGCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCT
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTCTCCTCTGGGTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

EH6_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGFINPYNDGTKYNE
KFKGKATLTSDKASTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFSSGYWGQGTTLTVSS

EH6_VK

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT
CTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGG
GTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGT
GGGGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCCTTCAAGTTTCACATGTTCCTTTCACGTTCG
GCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA

EH6_VK

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVGAEDLGVYYCLQVSHVPFTFGSGTKLEIK

FIG. 22

Anticorpo AG-9

AG9 VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCACTACCTATGTTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAGGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAACT
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTTTCTAGTGACTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AG9 VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGARYNE
KFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS

AG9 VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGCGATCAGGCCTCCAT
CTCTTGCAGATCTAGTCGGAGCATTGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
GTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAGGATCAGCAGTGT
GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTTCACGTTCG
GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

AG9 VK

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLRISSVEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKLEIK

FIG. 23

Anticorpo AH-3

AH3_VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCACTACCTATGTTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAGGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAACT
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATCTAGTGACTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AH3_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGARYNE
KFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS

AH3_VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAGGCCTCCAT
CTCTTGCAGATCTAGTCGGAGCATTGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
GTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAGGATCAGCAGTGT
GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTTCACGTTCG
GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

AH3_VK

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLRISSVEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKLEIK

FIG. 24

Anticorpo DD-9

DD9_VH

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGAC
TTGTTCTTTTTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCGGGTATGGGTGTGAGTTGGATTCGTCAGT
CCTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAC
CCATCCCTGAAGAGCCGGATCACAATCTCCAAGGATTCCTCAAGCAACCAGGTATTCCTCAA
GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATATTACTGTGCTCGAAGTTGGACTACGG
CCCCGTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DD9_VH

QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYN
PSLKSRITISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQGTLVTVSA

DD9_VK

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCAT
GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAGATTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT
CCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGGGGCTGAAGATGCTGC
CACTTATTACTGCCAACAGTGGAATAGTTCCCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
AGCTGAAA

DD9_VK

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVDYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFS
GSGSGTSYSLTISRMGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK

FIG. 25

Anticorpo DH-2

DH2_VH

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGAC
TTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCGTCAGC
CTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAC
CCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGCAACCAGGTATTCCTCAA
GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAAGTGGGACTACGG
CCCCGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DH2_VH

QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYN
PSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGTLVTVSA

DH2_VK

CAAATTGTTCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCAT
GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT
CCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGC
CACTTTTTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTCCCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
AGCTGAAA

DH2_VK

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFS
GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK

FIG. 26

Anticorpo DD-6

DD6_VH

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGGCCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAAGGCTTCTGGATACAGATTCACTGACTACAACATGCACTGGGTGAAGCAGAACCTTG
GAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAACCCTAAAAATGGTGTTATTTACTACAACCAG
AAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACAGTGAACAGGTCCTCCAACACAGCCTACATGGAGAT
CCGCAGCCTGACATCGGAAGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAACAGCTCTGACTTACTGGG
GACAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DD6_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTDYNMHWVKQNLGKSLEWIGYINPKNGVIYYNQ
KFKGKATLTVNRSSNTAYMEIRSLTSEDSAVYYCATALTYWGQGTLVTVSA

DD6_VL

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCAC
TTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTGCAGCTAATAACTATGCCAACTGGATCCAAGAAAAAC
CAGATCATTTATTCACTGGTCTGATAGCTGGTACCAACAAGCGAGCTCCAGGTGTTCCTGCC
AGATTCTCAGGCTCCCTGATAGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGA
GGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACTATTGGGTGTTCGGTGGAGGAA
CCAAAGTGACTGTCCTAGGC

DD6_VL

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVAANNYANWIQEKPDHLFTGLIAGTNKRAPGVPA
RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKVTVLG

FIG. 27

Anticorpo IA-12

IA12_VH

CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC
CTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACCTATGGAATGACCTGGGTGAAACAGGCTCCAG
GAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTCCTCTGGAGTGCCAACATATGCTGAT
GACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGAT
CAACAACCTCAAAAGTGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGACCGGAAGTTGCTTACT
GGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

IA12_VH

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMTWVKQAPGKGLKWMGWINTSSGVPTYAD
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKSEDTATYFCARPEVAYWGQGTLVTVSA

IA12_VK

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCTTTGGACAACCAGCCTCTAT
CTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATGATAATGGAAAGACTTATTTGCATTGGTTAT
TTCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGA
GTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTCG
GAGGGGGGACCAAACTGGAAATAAAA

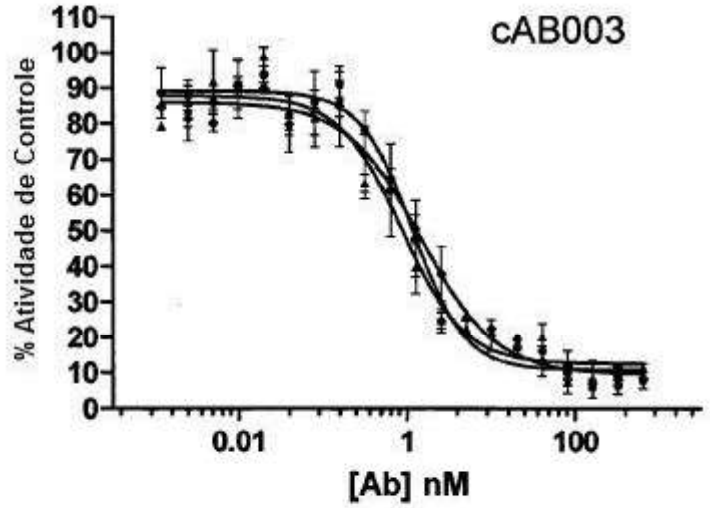
IA12_VK

DVVMTQTPLTLSVTFGQPASISCKSSQSLLYDNGKTYLHWLFQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG
VPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 28

A

	IC50 nM (SD)
cAB003	1.172 (0.297)



B

	IC50 nM (SD)
cBB001	0.925 (0.228)

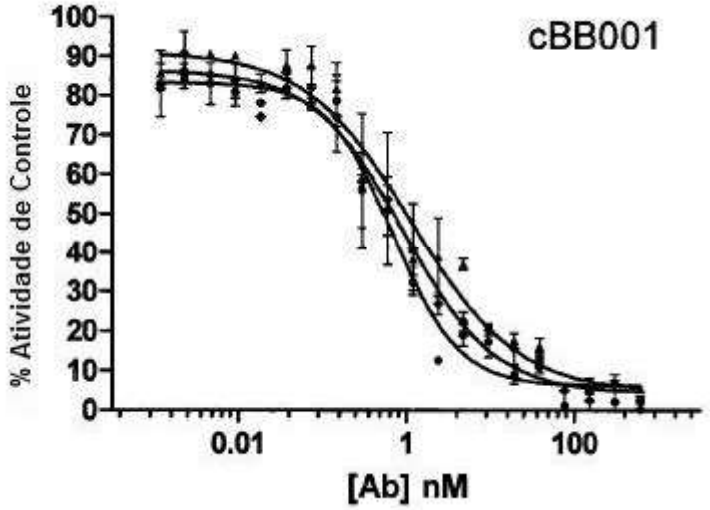
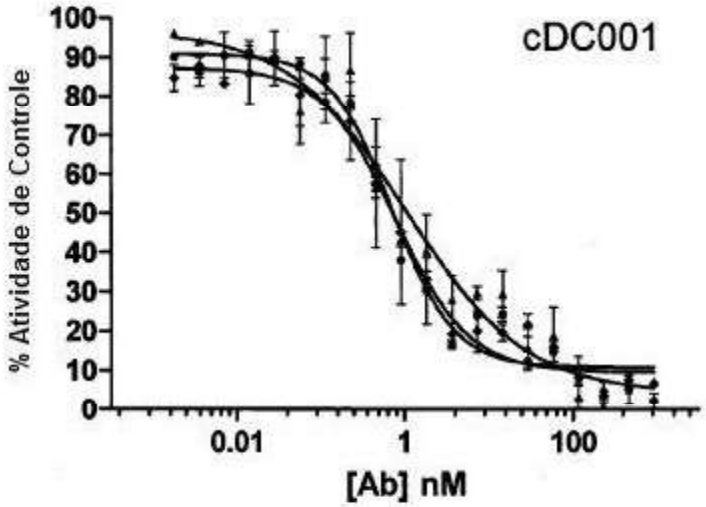


FIG. 29

C

	IC50 nM (SD)
cDC001	0.851 (0.177)



D

	IC50 nM (SD)
cDD9001	172.033 (23.353)

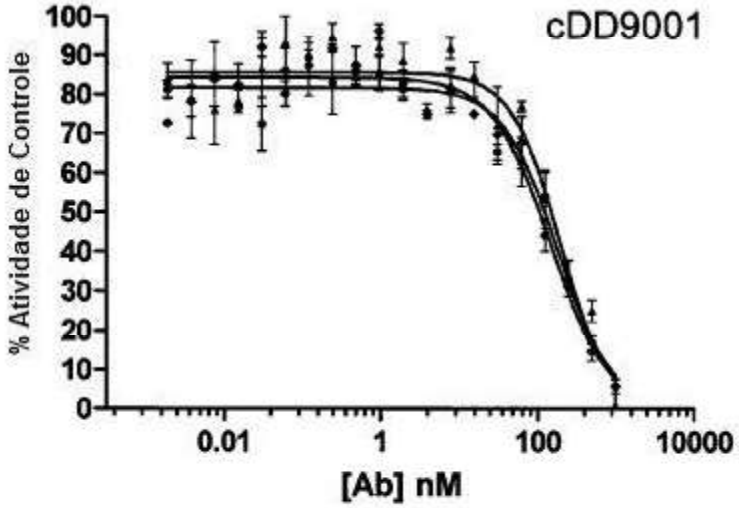
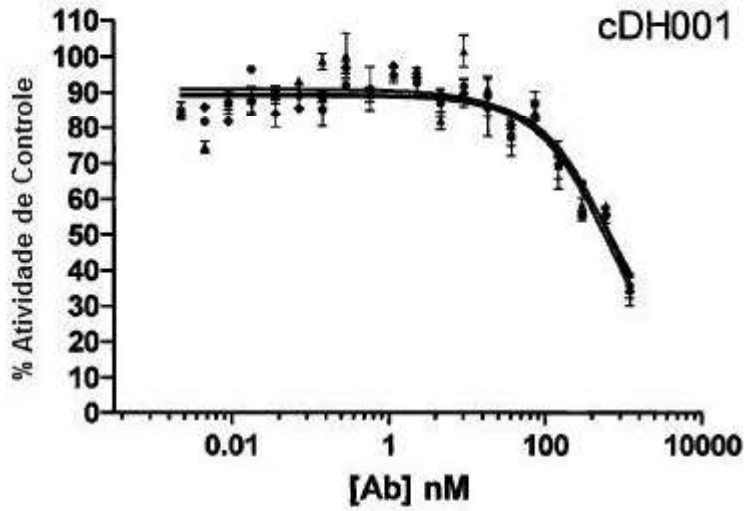


FIG. 29 (continuação)

E

	IC50 nM (SD)
cDH001	829.233 (59.923)



F

	IC50 nM
CUB7402	>100

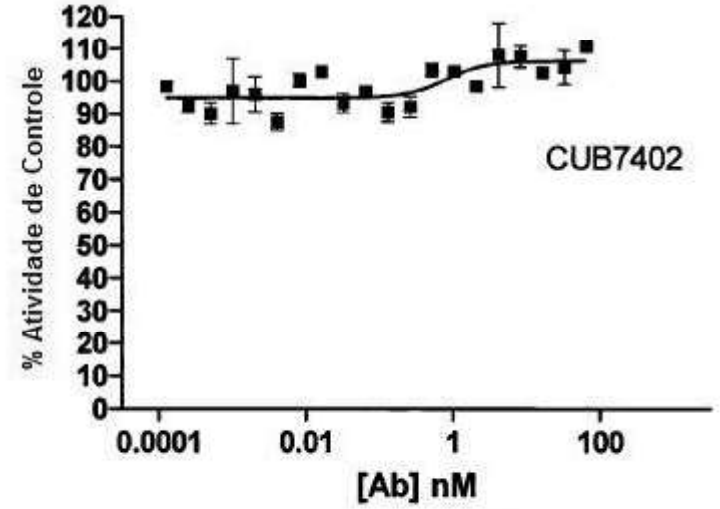
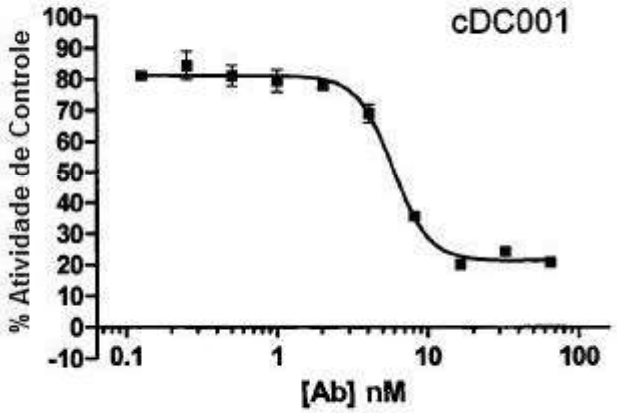


FIG. 29 (continuação)

A

	IC50 nM
cDC001	5.862



B

	IC50 nM
CUB7402	>100

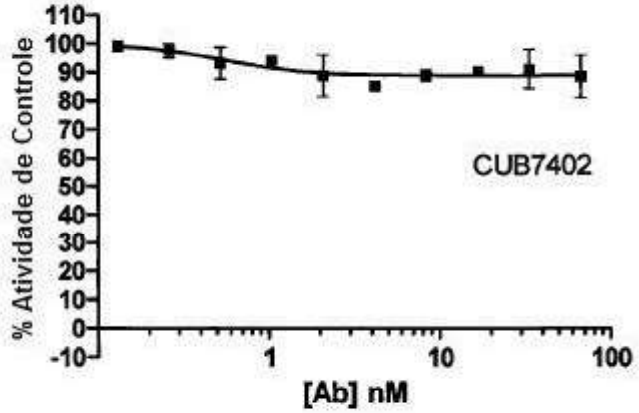
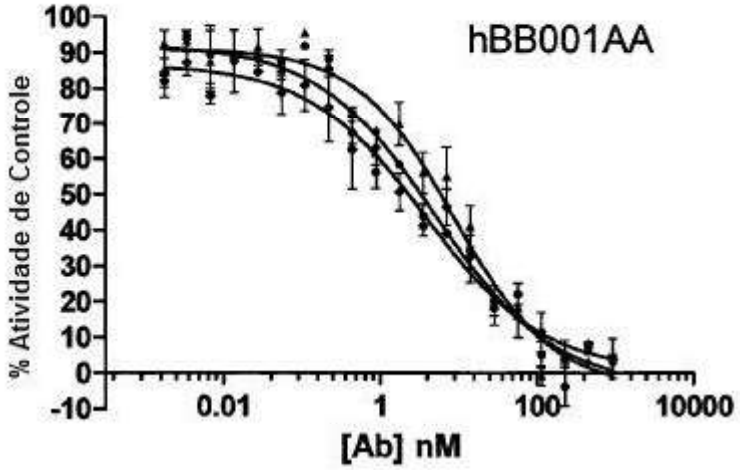


FIG. 30

A

	IC50 nM (SD)
hBB001AA	5.987 (2.643)



B

	IC50 nM (SD)
hBB001BB	0.985 (0.140)

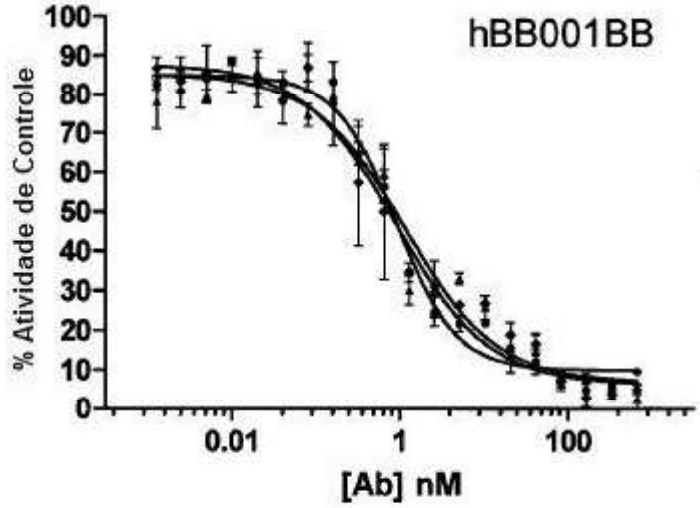
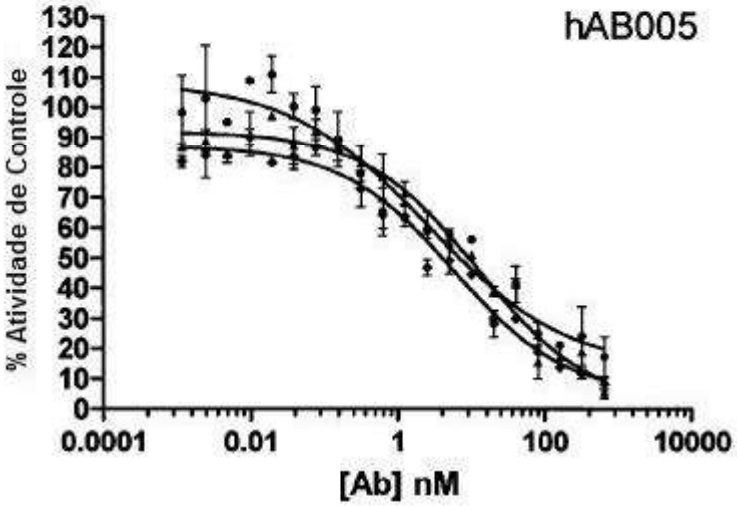


FIG. 31

C

	IC50 nM (SD)
hAB005	6.868 (4.895)

2 lotes mostrados



D

	IC50 nM (SD)
hAB004	3.854 (0.886)

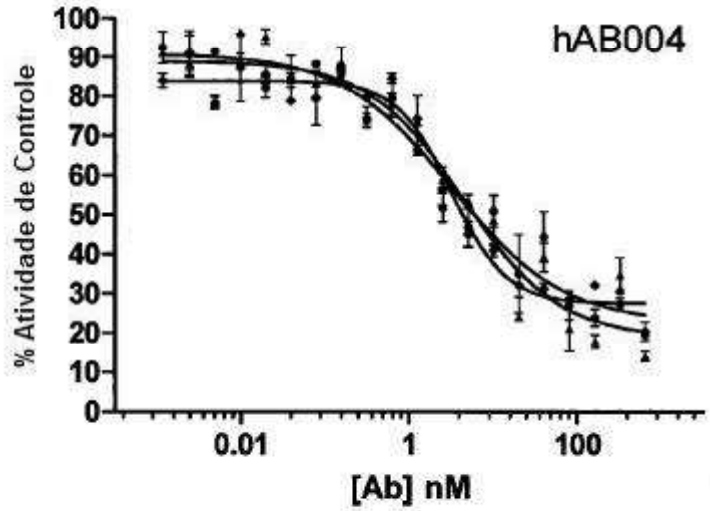
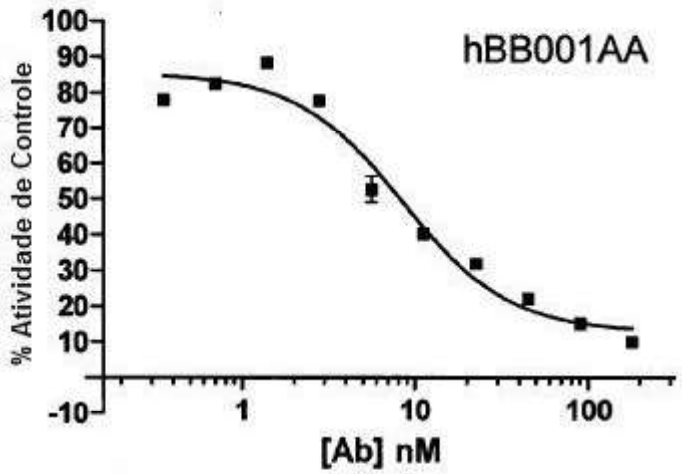


FIG. 31 (continuação)

	IC50 nM
hBB001AA	8.505

A



B

	IC50 nM
hAB004	7.848

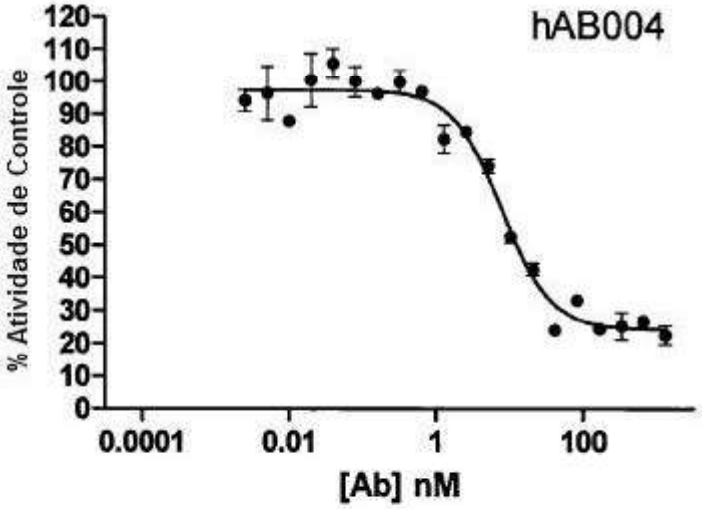
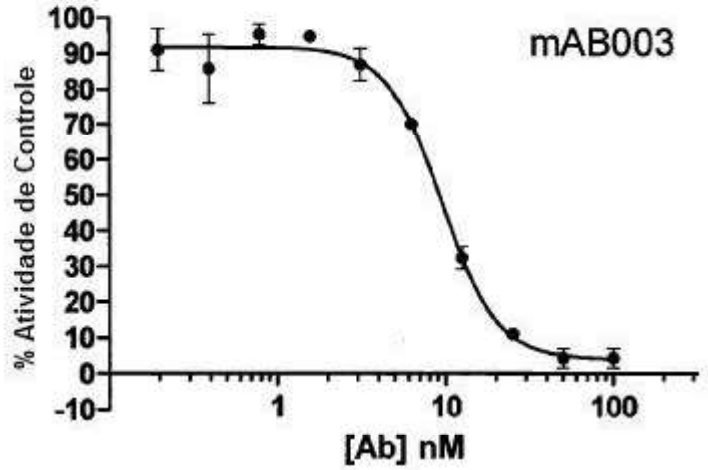


FIG. 32

A

	EC50 nM
mAB003	9.501



B

	EC50 nM
mBB001	0.752

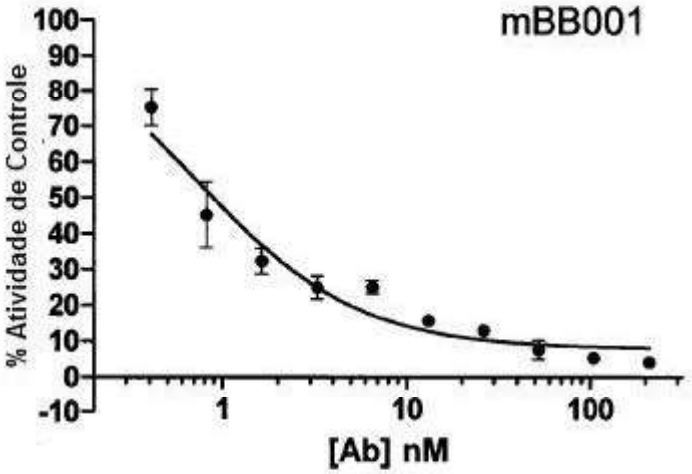
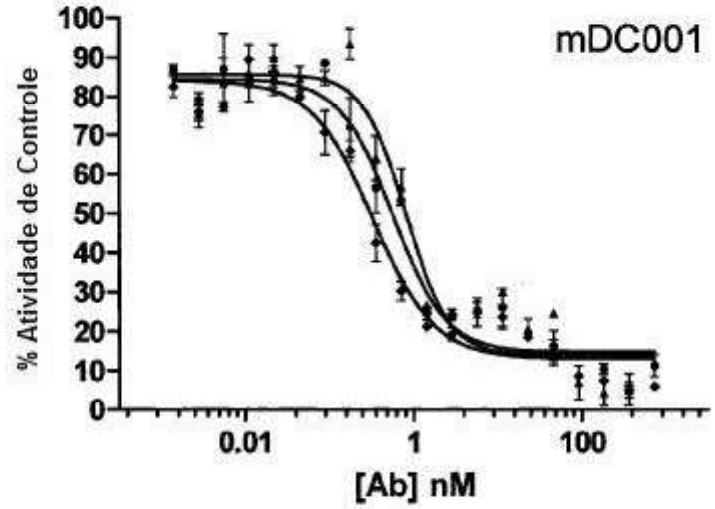


FIG. 33

C

	EC50 nM (SD)
mDC001	0.5712 (0.2409)



D

	EC50 nM (SD)
mDD9001	564.233 (83.996)

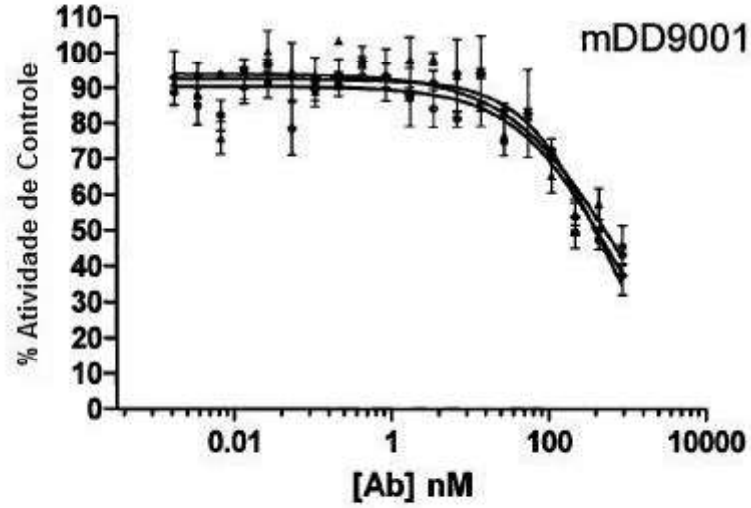
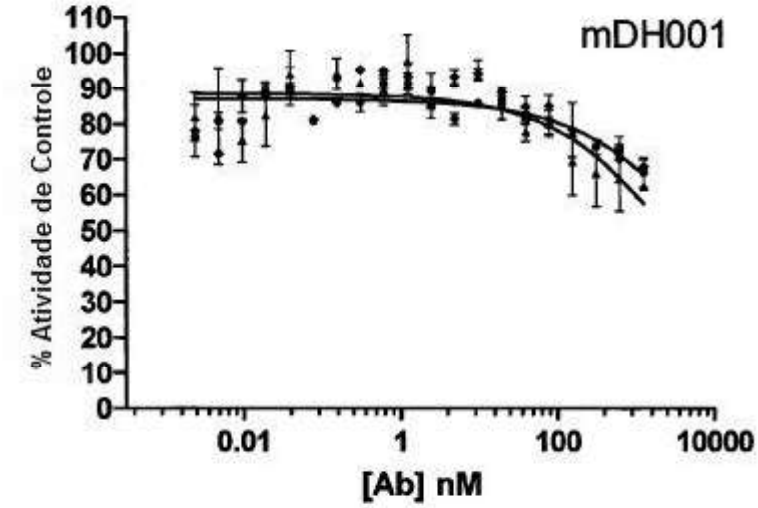


FIG. 33 (continuação)

E

	EC50 nM (SD)
mDH001	~7000



F

	EC50 nM (SD)
mDD6001	43.196 (10.948)

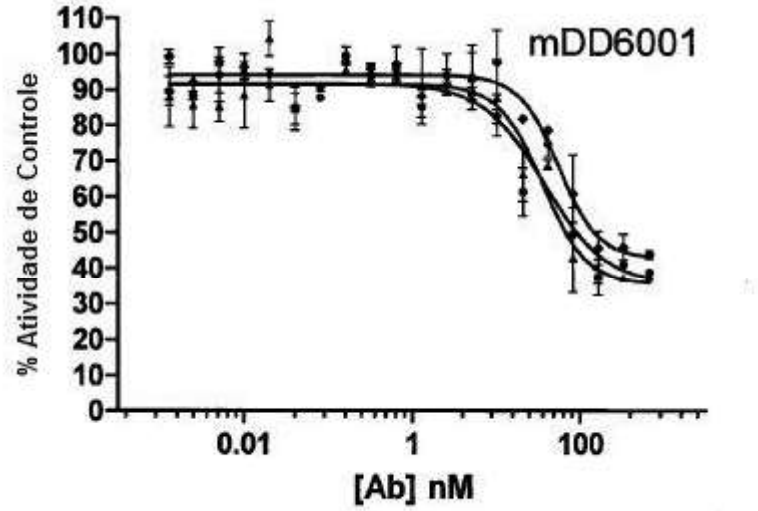


FIG. 33 (continuação)

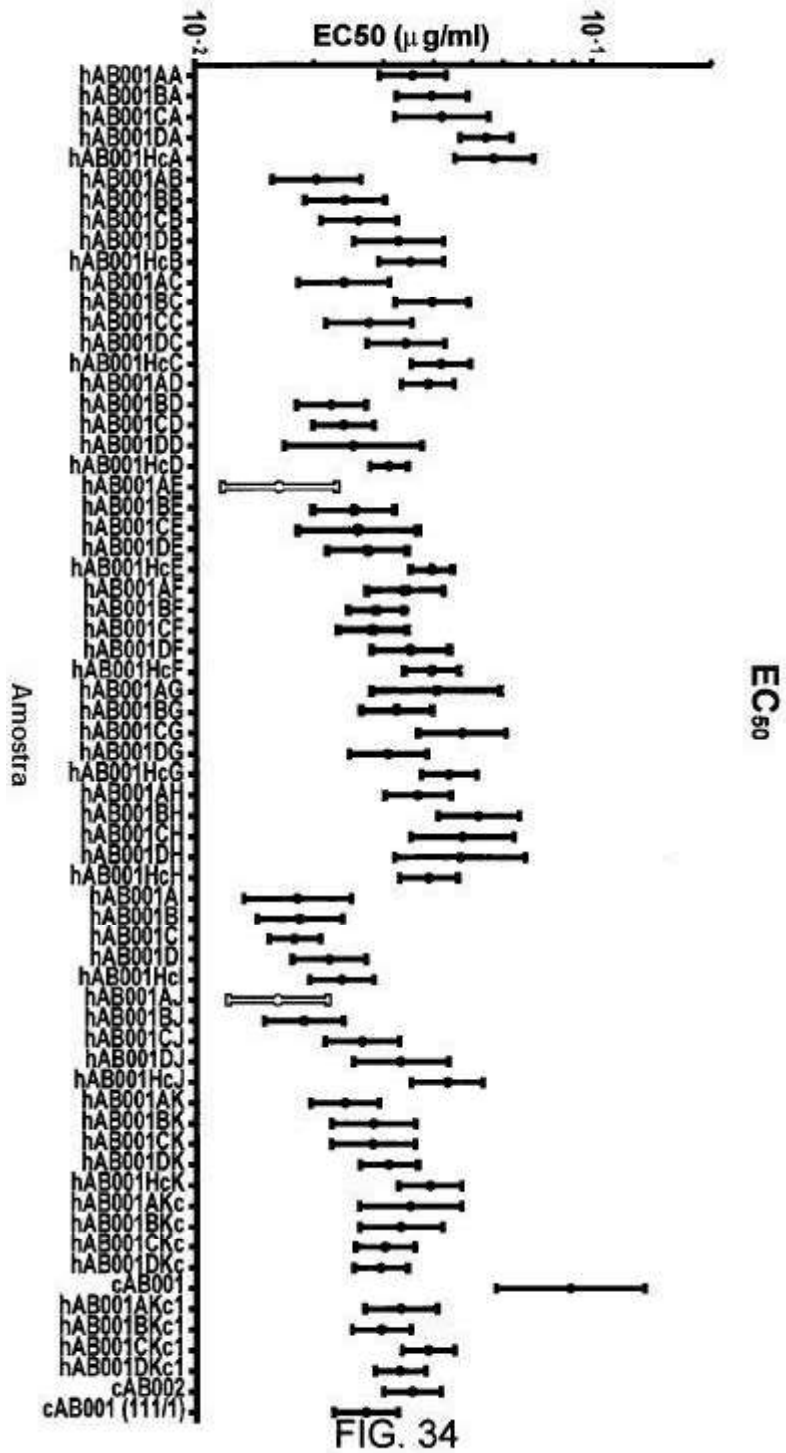

EC50 (µg/ml)
10-2
10-1
Amostra
EC50
hAB001AA
hAB001BA
hAB001CA
hAB001DA
hAB001HcA
hAB001AB
hAB001BB
hAB001CB
hAB001DB
hAB001HcB
hAB001AC
hAB001BC
hAB001CC
hAB001DC
hAB001HcC
hAB001AD
hAB001BD
hAB001CD
hAB001DD
hAB001HcD
hAB001AE
hAB001BE
hAB001CE
hAB001DE
hAB001HcE
hAB001AF
hAB001BF
hAB001CF
hAB001DF
hAB001HcF
hAB001AG
hAB001BG
hAB001CG
hAB001DG
hAB001HcG
hAB001AH
hAB001BH
hAB001CH
hAB001DH
hAB001HcH
hAB001A
hAB001B
hAB001C
hAB001D
hAB001Hc
hAB001AJ
hAB001BJ
hAB001CJ
hAB001DJ
hAB001HcJ
hAB001AK
hAB001BK
hAB001CK
hAB001DK
hAB001HcK
hAB001AKc
hAB001BKc
hAB001CKc
hAB001DKc
cAB001
hAB001AKc1
hAB001BKc1
hAB001CKc1
hAB001DKc1
cAB002
cAB001 (111/1)

FIG. 34

A

	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (nM)	0.3804	0.2099	0.3401	0.4418
r2	0.9991	0.998	0.9968	0.9985
EC50 (95% taxa determinante)	0.3291 to 0.4396	0.1860 to 0.2368	0.2890 to 0.4002	0.3927 to 0.4971

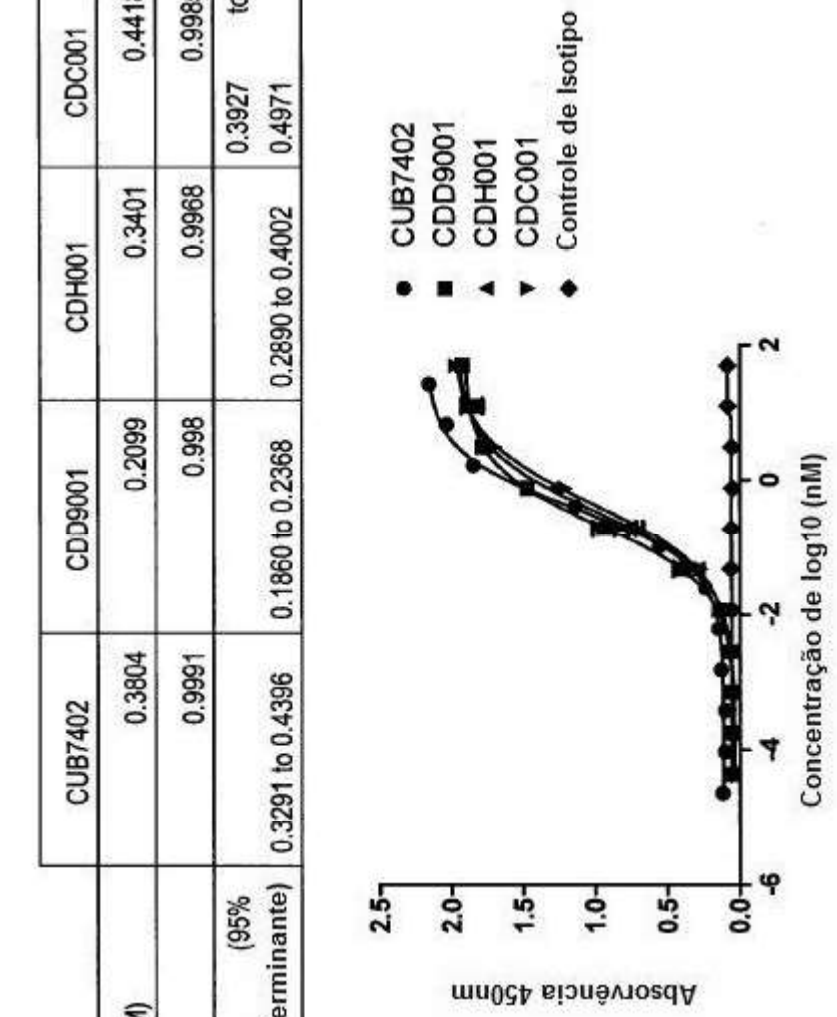
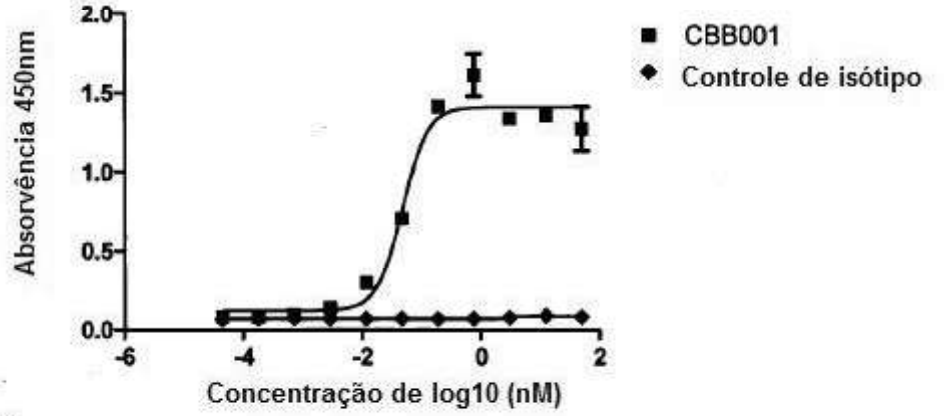


FIG. 35

B

	CBB001
EC50 (nM)	0.04811
r2	0.9682
EC50 (95%taxa determinante)	0.03611 to 0.06410



C

	CAB003
EC50 (nM)	0.06141
r2	0.9568
EC50 (95% taxa determinante)	0.03066 to 0.1230

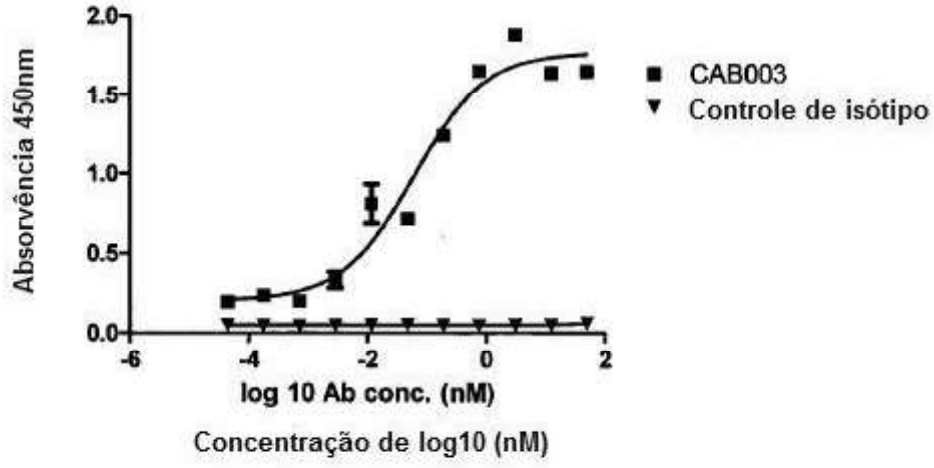
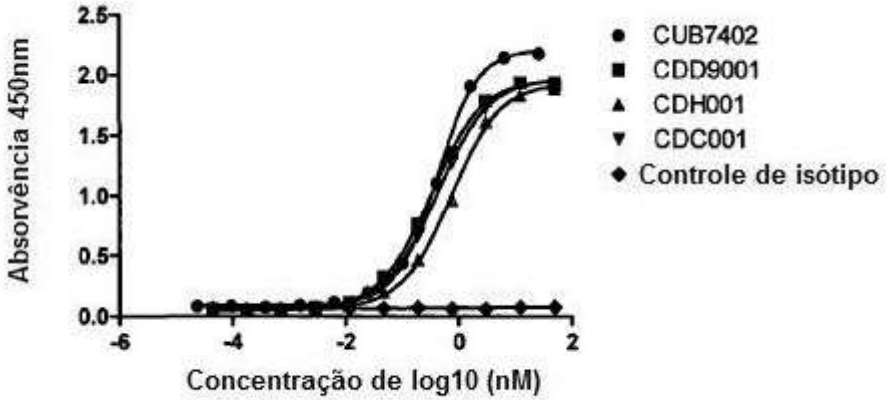


Fig. 35 (continuação)

A

	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (nM)	0.4161	0.3279	0.7385	0.4177
r2	0.9994	0.9992	0.9986	0.9993
EC50 (95% taxa determinante)	0.3762 to 0.4603	0.3040 to 0.3536	0.6682 to 0.8162	0.3887 to 0.4489



B

	CBB001
EC50 (nM)	0.05166
r2	0.9383
EC50 (95% taxa determinante)	0.03303 to 0.08079

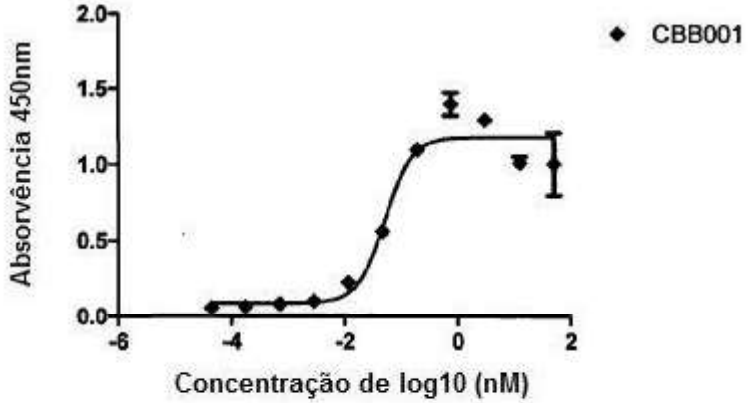


FIG. 36

C

	CAB003
EC50 (nM)	0.05682
r2	0.9837
EC50 (95% taxa determinante)	0.04054 to 0.07966

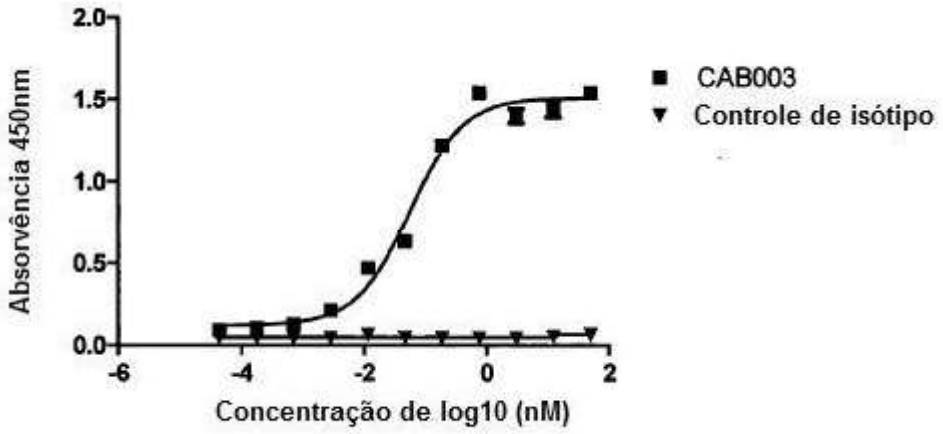
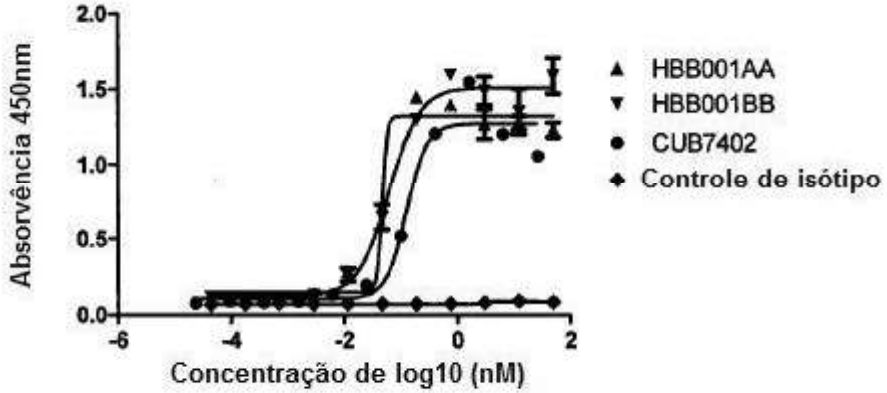


FIG. 36 continuação

A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (nM)	0.1277	~ 0.04739	0.06274
r2	0.9588	0.9792	0.9771
EC50 (95% taxa determinante)	0.06801 to 0.2396	ND	0.04636 to 0.08491



B

	HAB004
EC50 (nM)	0.02001
r2	0.9794
EC50 (95% taxa determinante)	0.01199 to 0.03342

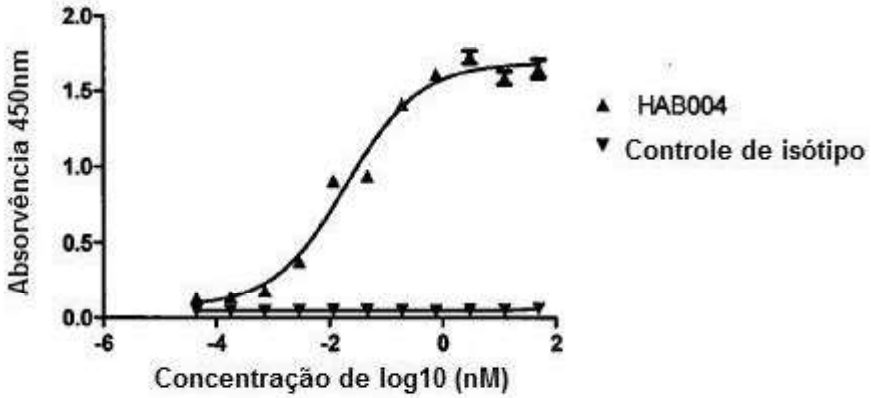
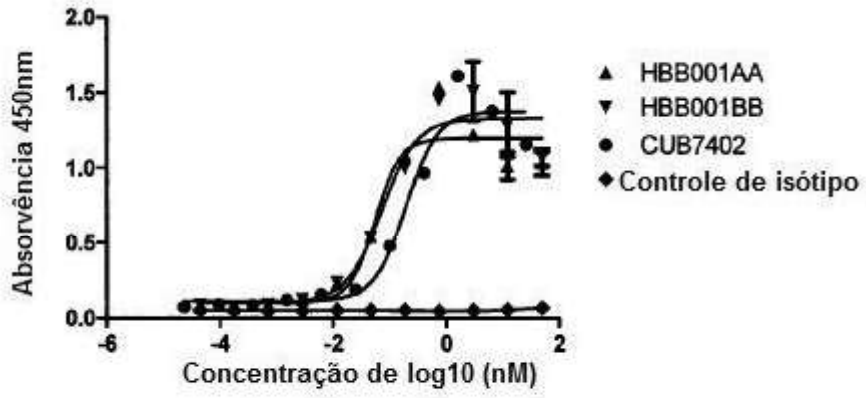


FIG. 37

A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (nM)	0.1982	0.0561	0.07377
r2	0.9586	0.9329	0.9361
EC50 (95% taxa determinante)	0.09303 to 0.4223	0.03522 to 0.08934	0.04198 to 0.1296



B

	HAB004
EC50 (nM)	0.06117
r2	0.9766
EC50 (95% taxa determinante)	0.04047 to 0.09246

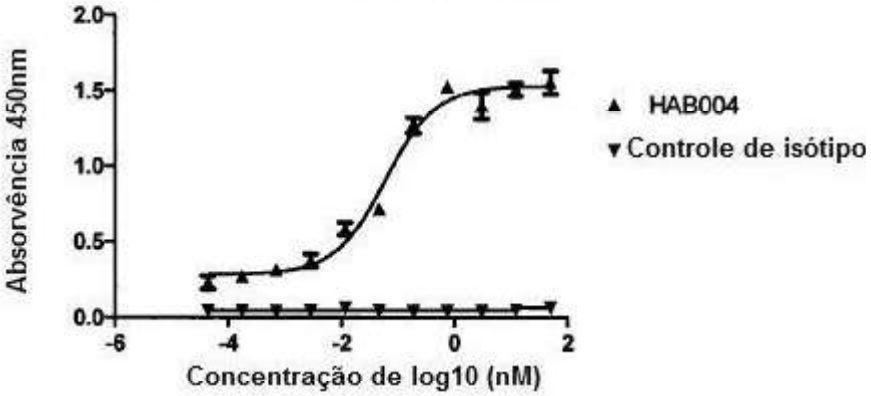
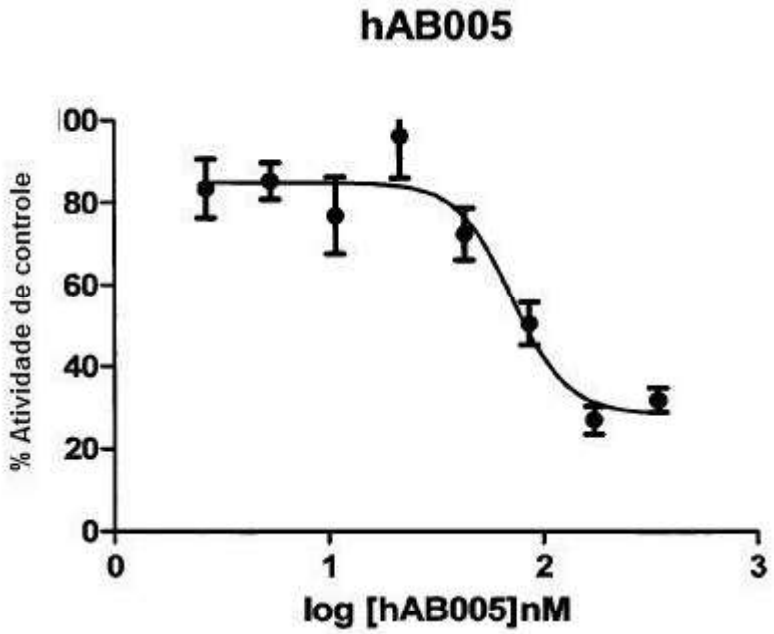


FIG. 38



IC50 = 71.85nM

FIG. 39

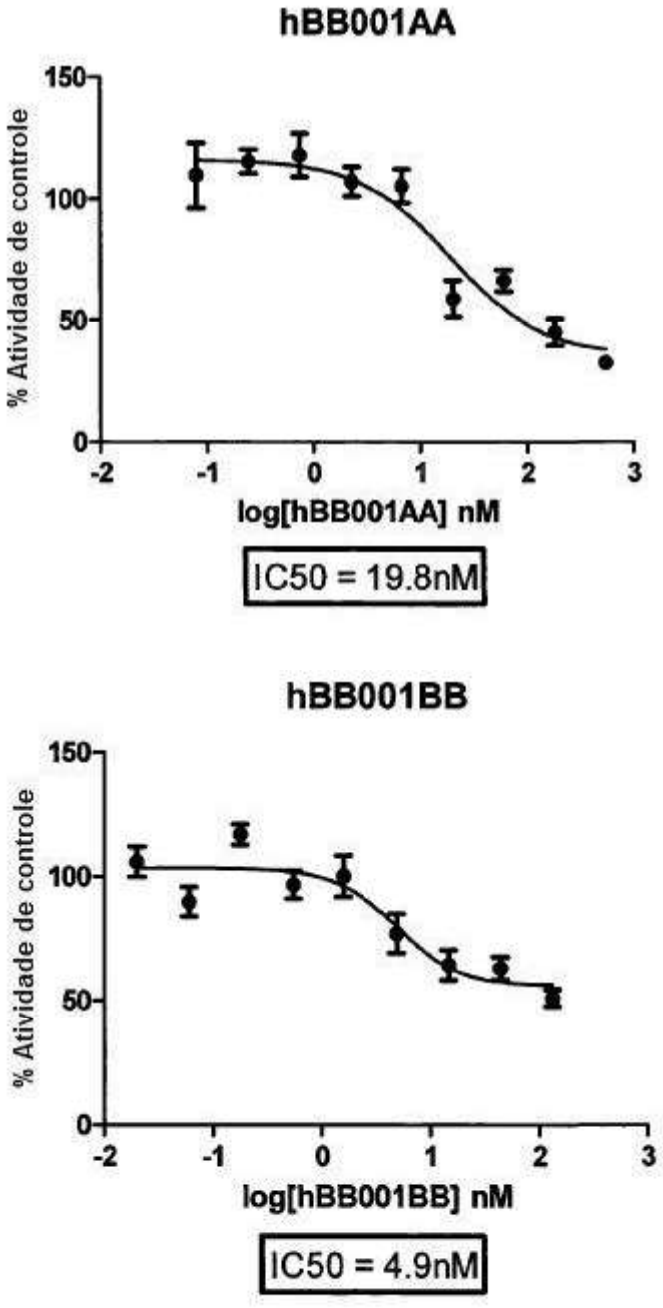

hBB001AA
% Atividade de controle
150
100
50
0
-2
-1
0
1
2
3
log[hBB001AA] nM
IC50 = 19.8nM
hBB001BB
% Atividade de controle
150
100
50
0
-2
-1
0
1
2
3
log[hBB001BB] nM
IC50 = 4.9nM

FIG. 40

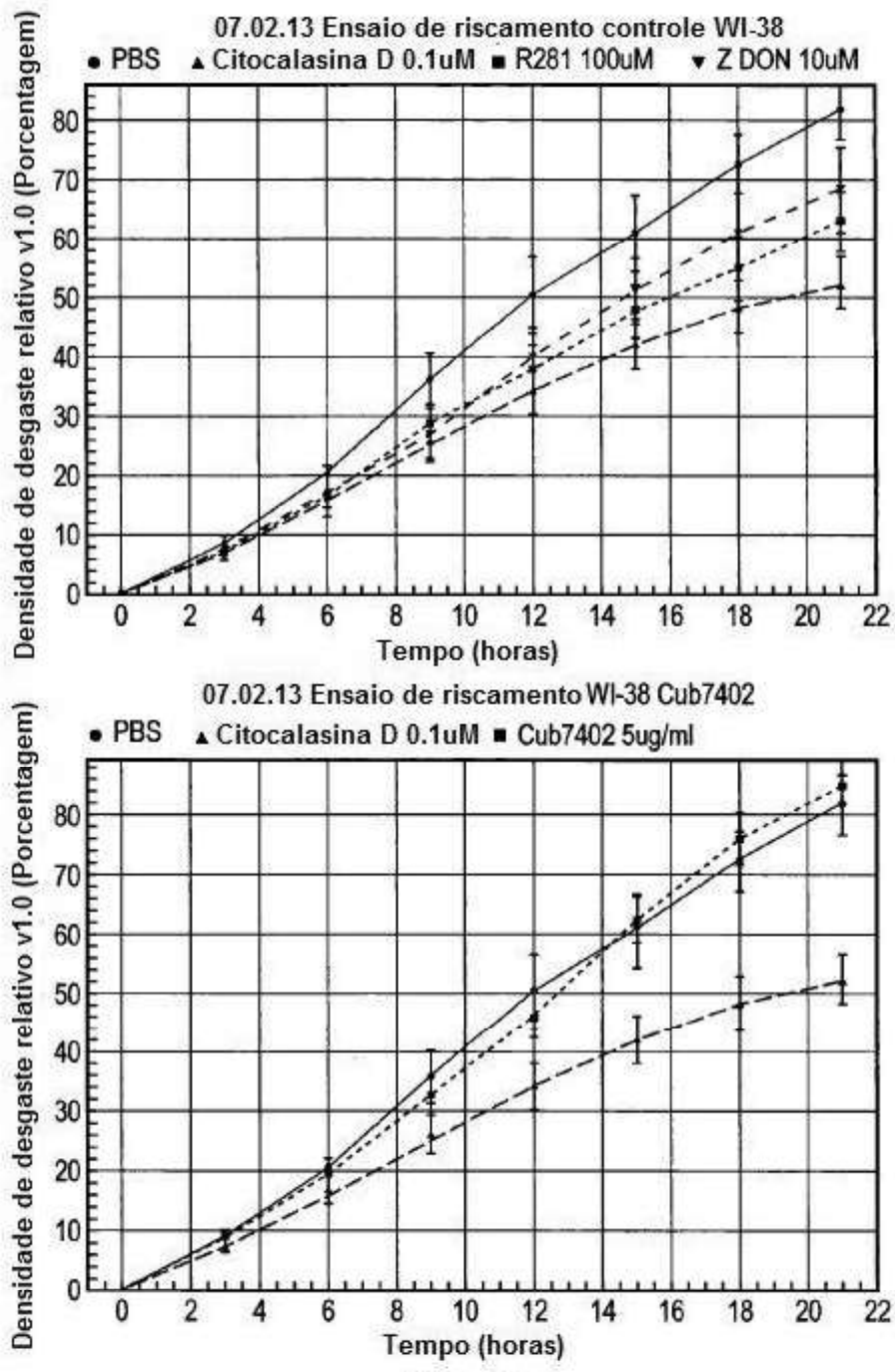
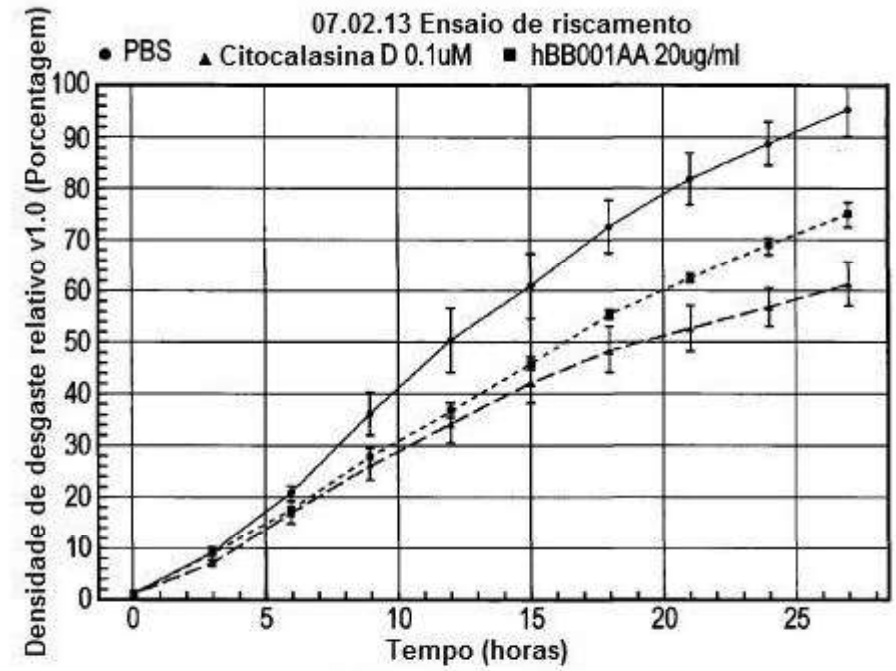

07.02.13 Ensaio de riscamento controle WI-38
● PBS ▲ Citocalasina D 0.1uM ■ R281 100uM ▼ Z DON 10uM
Densidade de desgaste relativo v1.0 (Porcentagem)
Tempo (horas)
07.02.13 Ensaio de riscamento WI-38 Cub7402
● PBS ▲ Citocalasina D 0.1uM ■ Cub7402 5ug/ml
Densidade de desgaste relativo v1.0 (Porcentagem)
Tempo (horas)

FIG. 41


07.02.13 Ensaio de riscamento
● PBS ▲ Citocalasina D 0.1uM ■ hBB001AA 20ug/ml
Densidade de desgaste relativo v1.0 (Porcentagem)
Tempo (horas)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
5
10
15
20
25

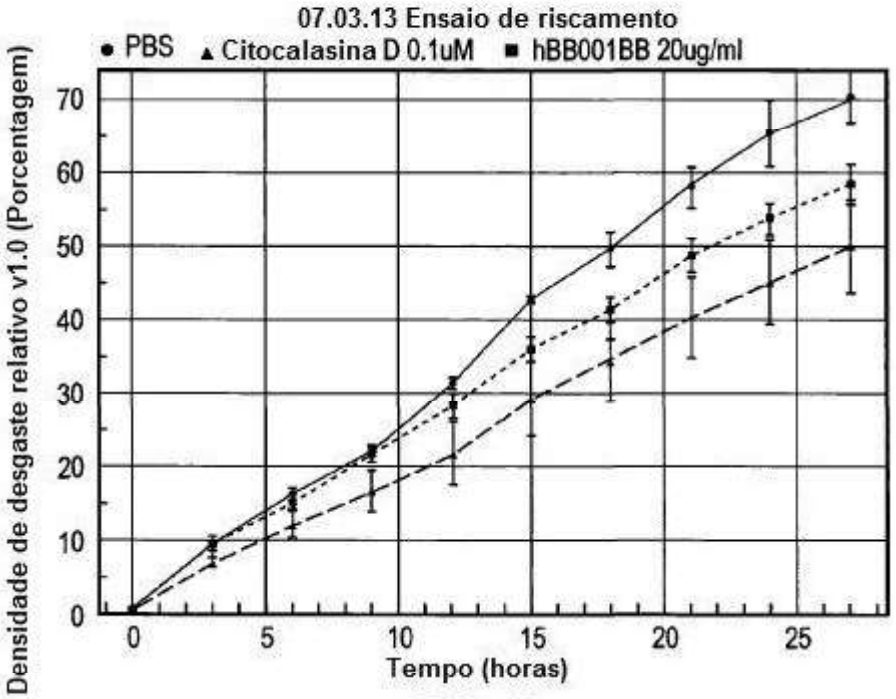

07.03.13 Ensaio de riscamento
● PBS ▲ Citocalasina D 0.1uM ■ hBB001BB 20ug/ml
Densidade de desgaste relativo v1.0 (Porcentagem)
Tempo (horas)
0
10
20
30
40
50
60
70
0
5
10
15
20
25

FIG. 42

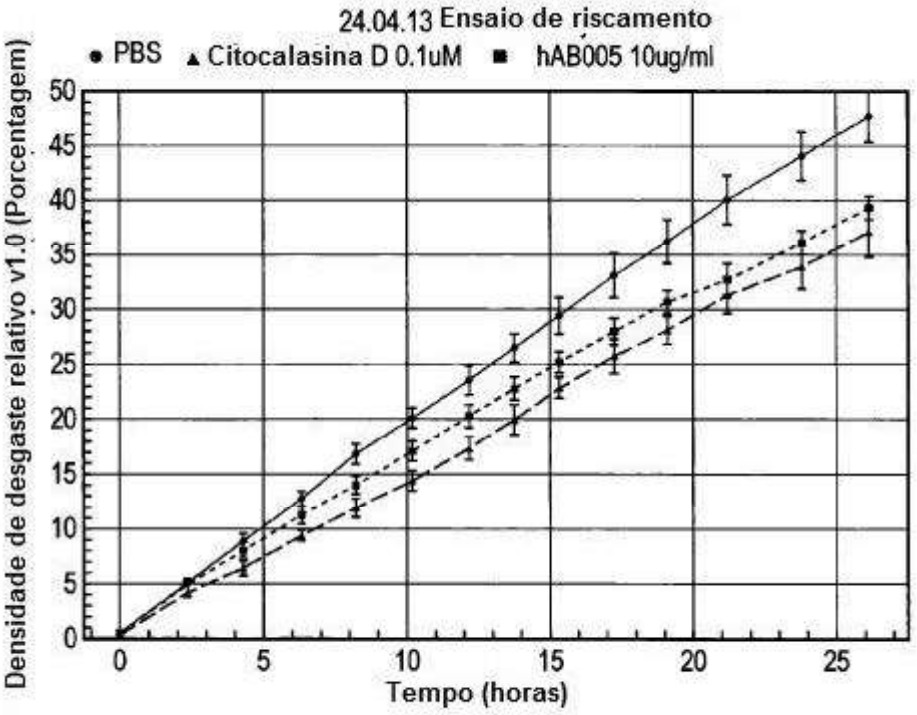

24.04.13 Ensaio de riscamento
● PBS ▲ Citocalasina D 0.1uM ■ hAB005 10ug/ml
Densidade de desgaste relativo v1.0 (Porcentagem)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0
5
10
15
20
25
Tempo (horas)

FIG. 43

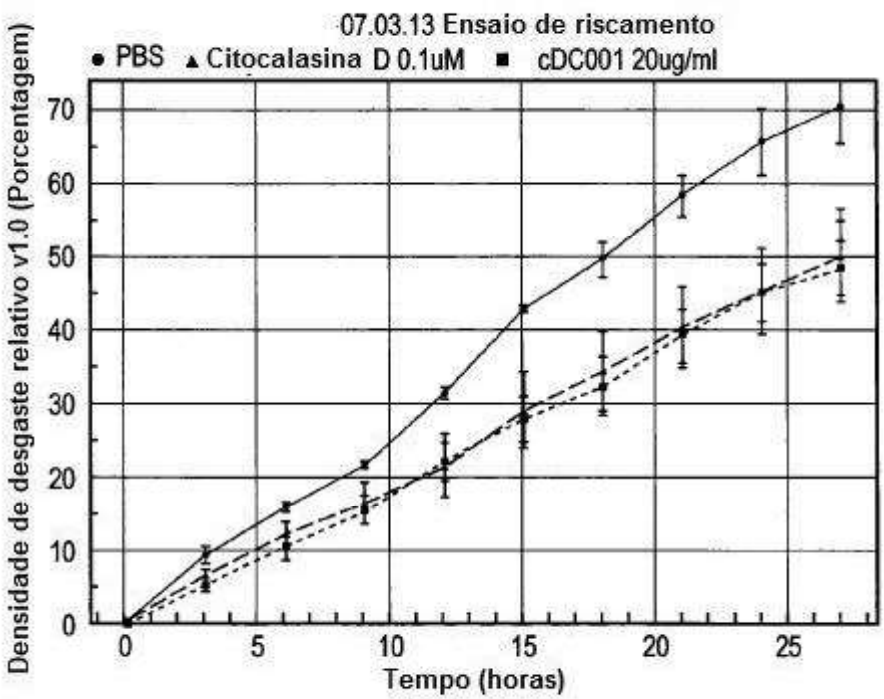

07.03.13 Ensaio de riscamento
• PBS ▲ Citocalasina D 0.1uM ■ cDC001 20ug/ml
Densidade de desgaste relativo v1.0 (Porcentagem)
0
10
20
30
40
50
60
70
0
5
10
15
20
25
Tempo (horas)

FIG. 44

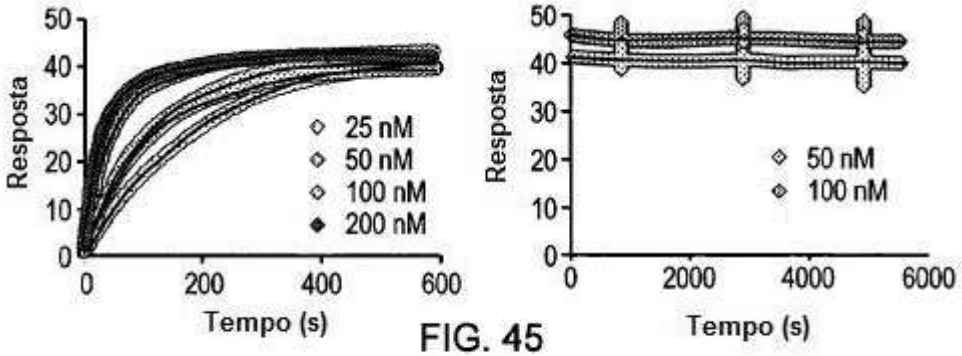


FIG. 45

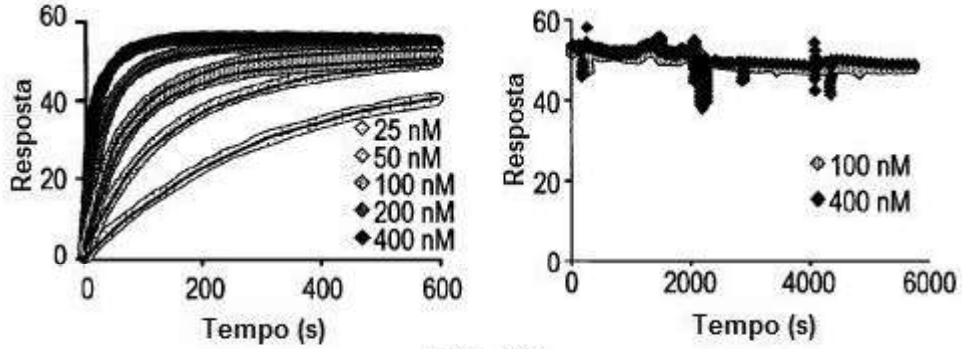


FIG. 46

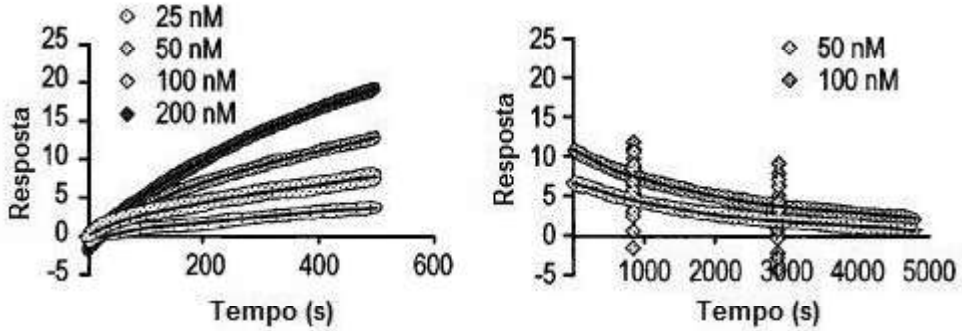


FIG. 47