

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2001.12.12	(73) Titular(es): MEDIMMUNE, LLC ONE MEDIMMUNE WAY GAITHERSBURG, MD 20878 US BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM US
(30) Prioridade(s): 2000.12.12 US 254884 P 2001.05.09 US 289760 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2003.10.29	
(45) Data e BPI da concessão: 2010.11.24 043/2011	(72) Inventor(es): LESLIE S. JOHNSON US WILLIAM DALL'ACQUA US ELIZABETH SALLY WARD US
	(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **MOLÉCULAS COM SEMIVIDA LONGA, COMPOSIÇÕES QUE AS CONTÊM E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA MOLÉCULAS, INCLUINDO AS IGG, IMUNOGLOBULINAS DE TIPO NÃO IGG, PROTEÍNAS E AGENTES NÃO PROTEICOS, QUE POSSUEM MAIORES PERÍODOS DE SEMIVIDA IN VIVO DEVIDO À PRESENÇA DE UM DOMÍNIO CONSTANTE DE IGG OU DE UMA SUA PARTE QUE SE LIGA AO FCRN, EM QUE HÁ UMA OU VÁRIAS MODIFICAÇÕES AO NÍVEL DOS AMINOÁCIDOS QUE AUMENTAM A AFINIDADE DO DOMÍNIO CONSTANTE OU DE UM SEU FRAGMENTO PARA COM O FCRN. TAIS PROTEÍNAS E MOLÉCULAS COM MAIORES PERÍODOS DE SEMIVIDA TÊM A VANTAGEM DE FAZEREM COM QUE SEJAM NECESSÁRIAS QUANTIDADES MAIS PEQUENAS E / OU UMA MENOR FREQUÊNCIA DE DOSAGEM QUANDO DA UTILIZAÇÃO DE TAIS MOLÉCULAS PARA FINS TERAPÊUTICOS, PROFILÁTICOS OU DE DIAGNÓSTICO.

RESUMO**"MOLÉCULAS COM SEMIVIDA LONGA, COMPOSIÇÕES QUE AS CONTÊM E
SUAS UTILIZAÇÕES"**

A presente invenção proporciona moléculas, incluindo as IgG, imunoglobulinas de tipo não IgG, proteínas e agentes não proteicos, que possuem maiores períodos de semivida *in vivo* devido à presença de um domínio constante de IgG ou de uma sua parte que se liga ao FcRn, em que há uma ou várias modificações ao nível dos aminoácidos que aumentam a afinidade do domínio constante ou de um seu fragmento para com o FcRn. Tais proteínas e moléculas com maiores períodos de semivida têm a vantagem de fazerem com que sejam necessárias quantidades mais pequenas e / ou uma menor frequência de dosagem quando da utilização de tais moléculas para fins terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico.

DESCRIÇÃO

"MOLÉCULAS COM SEMIVIDA LONGA, COMPOSIÇÕES QUE AS CONTÊM E SUAS UTILIZAÇÕES"

1. INTRODUÇÃO

A presente invenção diz respeito a moléculas cujos períodos de semivida *in vivo* são aumentados por modificação de um domínio constante de IgG, ou de um seu domínio de ligação ao FcRn (receptor Fc neonatal). Concretamente, estas moléculas possuem modificações de aminoácidos que aumentam a afinidade do domínio constante ou do seu fragmento para o FcRn. O aumento dos períodos de semivida das IgG terapêuticas e de diagnóstico e de outras moléculas bioativas, utilizando os métodos da invenção, tem inúmeros benefícios, incluindo a redução da quantidade e/ou da frequência de dosagem destas moléculas, por exemplo, em vacinas, imunoterapia passiva e noutros métodos terapêuticos e profiláticos. A invenção também diz respeito a proteínas de fusão que contenham um domínio constante de IgG que possua uma ou várias destas modificações de aminoácidos e uma proteína não-IgG ou uma molécula não proteica conjugada com esse domínio constante modificado de IgG, em que a presença do domínio constante modificado de IgG aumenta o período de semivida *in vivo* da molécula ou proteína não-IgG.

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A utilização de imunoglobulinas como agentes terapêuticos aumentou extraordinariamente nos últimos anos e

estendeu-se a diferentes áreas dos tratamentos médicos. Tais aplicações compreendem o tratamento de agamaglobulinemia e hipogamaglobulinemia, a sua utilização como agentes imunossupressores para o tratamento de doenças autoimunitárias e de doenças do hospedeiro *versus* transplante (GVH), o tratamento de doenças malignas linfóides e imunoterapias passivas para o tratamento de diversas doenças sistêmicas e infecciosas. Além disso, as imunoglobulinas são úteis como ferramentas de diagnóstico *in vivo*, por exemplo, em procedimentos de imagiologia de diagnóstico.

Uma questão crítica nestas terapêuticas é a persistência das imunoglobulinas na circulação. A velocidade de depuração das imunoglobulinas afecta, directamente, a quantidade e a frequência da dosagem com as imunoglobulinas. Uma dosagem e uma frequência de dosagem excessivas podem causar efeitos adversos no paciente e implicam também maiores custos médicos.

A IgG constitui a classe mais predominante de imunoglobulinas nos seres humanos e noutros mamíferos e é utilizada em diversos tipos de imunoterapias e procedimentos de diagnóstico. O mecanismo do catabolismo da IgG na circulação foi já esclarecido através de estudos respeitantes à transferência de imunidade passiva da mãe para o feto/recém-nascido através da placenta ou do saco vitelino ou através do colostro (transferência materno-fetal de IgG por transcitose) nos roedores (Brambell, Lancet, ii:1087-1093, 1966; Rodewald, J. Cell Biol., 71:666-670, 1976; Morris *et al.*, em: Antigen Absorption by the Gut, pp. 3-22, 1978, University Park Press, Baltimore; Jones *et al.*, J. Clin. Invest., 51:2916-2927, 1972).

O envolvimento de determinados receptores na transmissão materno-fetal das IgG maternas foi sugerido,

pela primeira vez pelo grupo de Brambell no seu estudo sobre absorção intestinal de anticorpos maternos provenientes do leite ingerido, em ratos recém-nascidos (Halliday, Proc. R. Soc. B., 143:408-413, 1955; Halliday, Proc. R. Soc. B., 144:427-430, 1955; Halliday, Proc. R. Soc. B., 148:92-103, 1957; Morris, Proc. R. Soc. B., 148:84-91, 1957; Brambell et al., Proc. R. Soc. B., 149:1-11, 1958; Morris, Proc. R. Soc. B., 160:276-292, 1964). Brambell et al. sugeriram, com base na observação que as IgG heterólogas interferiam com a transmissão de um anticorpo específico, que as moléculas de IgG de diversas espécies poderiam ter estruturas ou sequências suficientemente similares que se ligam a receptores comuns (Brambell et al., Proc. R. Soc. B., 149:1-11, 1958).

Há um receptor Fc de elevada afinidade, o FcRn, que está implicado neste mecanismo de transferência. O receptor FcRn foi isolado a partir das vilosidades do epitélio duodenal de ratos ainda amamentados (Rodewald et al., J. Cell Biol., 99:154s-164s, 1984; Simister et al., Eur. J. Immunol., 15:733-738, 1985), tendo o gene correspondente sido clonado (Simister et al., Nature, 337:184, 1989 e Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., LIV, 571-580, 1989). As clonagens mais recentes dos genes que codificam o FcRn de murganhos (Ahouse et al., J. Immunol., 151:6076-6088, 1993) e de seres humanos (Story et al., J. Exp. Med., 180: 2377-2381, 1994) demonstram uma elevada homologia destas sequências relativamente ao FcRn do rato, sugerindo a existência de um mecanismo semelhante de transmissão maternofetal das IgG, envolvendo os FcRn nestas espécies.

Entretanto, foi proposto também um mecanismo para o catabolismo da IgG pelo grupo de Brambell (Brambell et al.,

Nature, 203:1352-1355, 1964; Brambell, Lancet, ii: 1087-1093, 1966). Estes autores formularam a hipótese de que há uma proporção de moléculas de IgG na circulação que se ligam a determinados receptores celulares (isto é, os FcRn) que são saturáveis, pelo que as IgG ficam protegidas contra a degradação e são eventualmente recicladas na circulação; por outro lado, as IgG que não estão ligadas aos receptores são degradadas. O mecanismo proposto é consistente com o catabolismo das IgG observado em pacientes hipergamaglobulinémicos ou hipogamaglobulinémicos. Mais ainda, com base nestes estudos e também noutros (ver, v.g., Spiegelberg et al., J. Exp. Med, 121:323-338, 1965; Edelman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63:78-85, 1969), Brambell sugeriu também que os mecanismos implicados na transferência maternofetal de IgG e no catabolismo de IgG podem ser, eventualmente, o mesmo ou, pelo menos, podem ser estreitamente afins (Brambell, Lancet, ii:1087-1093, 1966). Na realidade, foi posteriormente confirmado que uma mutação no fragmento de charneira de Fc originou modificações concumitantes no catabolismo, na transferência maternofetal, na transcitose neonatal e, em particular, na ligação ao FcRn (Ghetie et al., Immunology Today, 18(12):592-598,1997).

Estas observações sugeriram que há porções do domínio constante da IgG que controlam o metabolismo da IgG, incluindo a velocidade de degradação da IgG no soro, através de interações com o FcRn. Na realidade, uma maior afinidade de ligação ao FcRn aumentou o período de semivida sérico da molécula (Kim et al., Eur. J. Immunol., 24:2429-2434, 1994; Popov et al., Mol. Immunol., 33:493-502, 1996; Ghetie et al., Eur. J. Immunol., 26:690-696, 1996; Junghans

et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:5512-5516, 1996; Israel et al., Immunol., 89:573-578, 1996).

Diversas experiências de mutagênese dirigida feitas na região Fc das IgG do murganho levaram à identificação de determinados resíduos aminoácidos críticos, implicados na interação entre IgG e FcRn (Kim et al., Eur. J. Immunol., 24:2429-2434, 1994; Medesan et al., Eur. J. Immunol., 26:2533, 1996; Medesan et al., J. Immunol., 158:2211-2217, 1997). Estes estudos e outros estudos de comparação de sequências permitiram concluir que a isoleucina na posição 253, a histidina na posição 310 e a histidina na posição 435 (em conformidade a numeração de Kabat, Kabat et al., em: Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991, obra que se considera aqui totalmente incorporada por referência), são altamente conservadas nas IgG dos seres humanos e dos roedores, sugerindo a sua importância para a ligação IgG-FcRn.

Além disso, há diversas publicações que descrevem métodos para a obtenção de moléculas fisiologicamente activas cujos períodos de semivida são modificados, quer introduzindo nas moléculas um polipeptido de ligação ao FcRn (WO 97/43316; patente de invenção norte-americana nº 5 869 046; patente de invenção norte-americana nº 5 747 035; WO 96/32478; WO 91/14438), quer fazendo a fusão das moléculas com anticorpos cujas afinidades de ligação ao FcRn se mantêm, mas em que as suas afinidades para com outros receptores de Fc foram fortemente reduzidas (WO 99/43713) quer ainda por fusão com domínios de anticorpos de ligação ao FcRn (WO 00/09560; patente de invenção norte-americana nº 4 703 039). No entanto, nenhuma

destas publicações revela mutações específicas no domínio constante da IgG que afectem o seu período de semivida.

Estudos anteriores demonstraram que determinadas mutações no domínio constante reduzem realmente a ligação ao FcRn e consequentemente reduzem o período de semivida da IgG *in vivo*. A publicação PCT com o nº WO 93/22332 (de Ward *et al.*) descreve diversas IgG recombinantes de murganho cujos períodos de semivida *in vivo* são reduzidos por mutações entre o resíduo 253, aproximadamente, e o resíduo 434, aproximadamente. Em particular, confirmou-se que as substituições de isoleucina na posição 253, histidina na posição 310, glutamina na posição 311, His na posição 433 e asparagina na posição 434 reduzem o período de semivida da IgG.

A modulação de moléculas de IgG por substituição, adição ou deleção de aminoácidos para aumentar ou diminuir a afinidade para o FcRn também está descrita no documento WO 98/23289; no entanto, esta publicação não enumera nenhuns mutantes específicos que manifestem períodos de semivida *in vivo* quer mais longos quer mais curtos.

Na verdade, apenas foi identificado (WO 97/34631) um mutante de IgG1 de murganho que apresentou realmente um maior período de semivida, correspondente à mutação tripla de Thr252 para Ala, de Thr254 para Ser e de Thr256 para Phe.

Tendo em consideração a importância farmacêutica de se aumentar os períodos de semivida *in vivo* de imunoglobulinas e de outras moléculas bioactivas, há a necessidade de se desenvolver moléculas de IgG modificadas e seus fragmentos de ligação ao FcRn (em particular as IgG humanas modificadas), de modo a que as imunoglobulinas ou outras moléculas bioactivas tenham maiores períodos de semivida *in vivo*.

3. DESCRIÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por base uma identificação feita pelos inventores de que há diversas mutações no domínio constante de uma molécula de IgG humana que aumentam a afinidade da molécula de IgG para com o FcRn. Em particular, os inventores da presente invenção pesquisaram bibliotecas de domínios constantes da IgG1 humana com mutações aleatórias de aminoácidos, introduzidas em regiões particulares do domínio constante, para aumentar a afinidade para com o FcRn. Tais mutações aleatórias foram feitas nas regiões dos resíduos 251-256, 285-290 e 308-314, estando todas estas regiões no domínio CH2, e nas regiões dos resíduos 385-389 e 428-436 que estão todas no domínio CH3, pertencentes às regiões de Fc-charneira da IgG1 humana (resíduos correspondentes à ilustração da figura 2 (SEQ ID NO:83, ou resíduos análogos nas regiões de Fc-charneira de outras moléculas de IgG, conforme determinado pelo alinhamento de sequências)). Tal como aqui estipulado, todos os resíduos do domínio constante da IgG são numerados em conformidade com a numeração de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991), são apresentados conforme ilustrado na figura 2 (SEQ ID NO:83) e compreendem os resíduos correspondentes noutros domínios constantes de IgG, conforme determinado por alinhamento de sequências. O período de semivida *in vivo*, ou a persistência no soro ou noutros tecidos de um indivíduo, de anticorpos, de outros agentes terapêuticos e de outras moléculas bioativas é um parâmetro clínico importante que determina a quantidade e a frequência de administração de um anticorpo (ou de

qualquer outras molécula farmacêutica). Assim sendo, tais moléculas, incluindo os anticorpos, com períodos de semivida maiores possuem uma importância farmacêutica significativa.

De acordo com um seu primeiro aspecto, a presente invenção proporciona uma molécula modificada de acordo com a reivindicação 1.

Assim, a presente invenção diz respeito a uma molécula modificada, (de preferência uma proteína, mas pode ser um agente não proteico) que possui um maior período de semivida *in vivo*, devido à presença de um domínio constante modificado de IgG (de preferência de uma IgG humana) em que o domínio constante de IgG é modificado por uma substituição de um aminoácido, para aumentar a sua afinidade para o FcRn. De acordo com uma forma particular de realização, a presente invenção diz respeito a moléculas de IgG modificadas cujos períodos de semivida *in vivo* são aumentados pela modificação de resíduos aminoácidos que se sabe estarem implicados na interacção do domínio de Fc-charneira com o receptor de FcRn. De preferência, o domínio constante possui uma afinidade para com o FcRn a pH 6,0 que é maior do que a pH 7,4. Tais modificações também podem alterar (isto é, aumentar ou diminuir) a biodisponibilidade das moléculas (v.g., transporte para as superfícies das mucosas ou para outros tecidos alvo). A invenção também diz respeito a outros tipos de imunoglobulinas ou seus fragmentos (isto é, imunoglobulinas não-IgG), proteínas não-imunoglobulinas e agentes não proteicos que são fundidos ou conjugados ou manipulados artificialmente para conterem um domínio constante de IgG, ou um seu fragmento, de ligação ao FcRn, possuindo uma ou várias dessas modificações de aminoácidos.

Faz-se observar que todas as moléculas modificadas, aqui descritas, possuem um domínio CH₂ humano em que há uma substituição de um aminoácido no resíduo aminoácido 252, estando este numerado de acordo com o índice EU de Kabat, em que a referida substituição é feita com tirosina, fenilalanina, triptofano ou treonina. Doravante, as referências à modificação de ou a vários resíduos aminoácidos no domínio CH₂ humano compreendem uma substituição do aminoácido no resíduo 252 por tirosina, fenilalanina, triptofano ou treonina.

De acordo com uma forma de realização preferencial, a presente invenção proporciona moléculas modificadas, particularmente imunoglobulinas cujos períodos de semivida *in vivo*, são prolongados pela presença de um domínio constante IgG, em que há modificações de um ou vários resíduos aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e 428-436 que aumentam a afinidade dos domínios constantes, ou seus fragmentos, para com o FcRn. Em formas de realização particulares, a modificação ocorre em um ou vários resíduos expostos à superfície e tal modificação é uma substituição por um resíduo com carga eléctrica, polaridade ou hidrofobicidade semelhantes às do resíduo que é substituído. Em formas de realização preferenciais, o domínio constante modificado da IgG liga-se ao FcRn a pH 6,0 com uma afinidade maior do que a pH 7,4. De acordo com uma forma de realização preferencial, o domínio constante é modificado por substituição de um ou vários resíduos aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e 428-436, o que aumentar a afinidade do domínio constante, ou dos seus fragmentos de ligação ao FcRn, para o FcRn. Estão excluídas as substituições do resíduo 254 por serina, e/ou do resíduo 256

por fenilalanina, particularmente quando o domínio constante, ou o seu fragmento, resulta de uma IgG de murganho.

Em formas de realização concretas, a invenção proporciona imunoglobulinas, ou outras moléculas bioactivas, que contêm um domínio constante de IgG1 (de preferência de um ser humano) que possui modificações de aminoácidos em uma ou várias das posições 308, 309, 311, 312 e 314, possuindo, mais concretamente, substituições em uma ou várias das posições 308, 309, 311, 312 e 314 feitas com treonina, prolina, serina, alanina e leucina, respectivamente. De acordo com uma outra forma de realização, os resíduos em uma ou várias posições 308, 309 e 311 são substituídos por isoleucina, prolina e ácido glutâmico, respectivamente. Ainda de acordo com mais uma outra forma de realização, os resíduos em uma ou várias das posições 308, 309, 311, 312 e 314, são substituídos por treonina, prolina, serina, alanina e leucina, respectivamente. A invenção também diz respeito a combinações destas substituições de aminoácidos.

Além disso, a invenção proporciona imunoglobulinas, ou outras moléculas bioactivas, que contêm um domínio constante de IgG (de preferência, de um ser humano) possuindo modificações de aminoácidos em uma ou várias das posições 251, 252, 254, 255 e 256, possuindo, mais concretamente, substituições em uma ou várias destas posições. Em variantes concretas, o resíduo 251 é substituído por arginina, o resíduo 252 é substituído por tirosina, fenilalanina, triptofano ou treonina, o resíduo 254 é substituído por treonina ou serina, o resíduo 255 é substituído por leucina, glicina, isoleucina ou arginina, e/ou o resíduo 256 é substituído por fenilalanina, serina, arginina, glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico,

alanina ou asparagina. De acordo com uma forma de realização mais concreta, o resíduo 251 é substituído por arginina, o resíduo 252 é substituído por tirosina, o resíduo 254 é substituído por treonina e/ou o resíduo 255 é substituído por arginina. Ainda de acordo com mais uma outra forma de realização concreta, o resíduo 252 é substituído por fenilalanina e/ou o resíduo 256 é substituído por ácido aspártico. De acordo com uma forma de realização preferencial, o resíduo 251 é substituído por arginina, o resíduo 252 é substituído por tirosina, o resíduo 254 é substituído por treonina e/ou o resíduo 255 é substituído por arginina. A invenção, também diz respeito a qualquer combinação destas substituições.

Mais ainda, a invenção proporciona imunoglobulinas, ou outras moléculas biologicamente activas, que contêm um domínio constante de IgG (de preferência, de um ser humano) possuindo modificações de aminoácidos em uma ou várias das posições 428, 433, 434 e 436, possuindo, mais concretamente, substituições em uma ou várias destas posições. Em variantes concretas, o resíduo 428 é substituído por metionina, treonina, leucina, fenilalanina ou serina, o resíduo 433 é substituído por lisina, arginina, serina, isoleucina, prolina, glutamina ou histidina, o resíduo 434 é substituído por fenilalanina, tirosina ou histidina e/ou o resíduo 436 é substituído por histidina, asparagina, arginina, treonina, lisina ou metionina. De acordo com uma forma de realização mais concreta, os resíduos em uma ou várias posições 433, 434 e 436 são substituídos por lisina, fenilalanina e histidina, respectivamente. De acordo com uma forma de realização preferencial, o resíduo 428 é

substituído por metionina e/ou o resíduo 434 é substituído por tirosina.

Além disso, a invenção proporciona imunoglobulinas, ou outras moléculas biologicamente activas, que contêm um domínio constante de IgG (de preferência, de um ser humano) possuindo modificações de aminoácidos em uma ou várias das posições 385, 386, 387 e 389, possuindo, mais concretamente substituições em uma ou várias destas posições. Em variantes concretas, o resíduo 385 é substituído por arginina, ácido aspártico, serina, treonina, histidina, lisina, alanina ou glicina, o resíduo 386 é substituído por treonina, prolina, ácido aspártico, serina, lisina, arginina, isoleucina ou metionina, o resíduo 387 é substituído por arginina, prolina, histidina, serina, treonina, alanina ou prolina e/ou o resíduo 389 é substituído por prolina, serina ou asparagina. Em formas de realização mais concretas, os resíduos em uma ou várias posições 385, 386, 387 e 389 são substituídos por arginina, treonina, arginina e prolina, respectivamente. Ainda de acordo com mais uma outra forma de realização concreta, os resíduos em uma ou várias posições 385, 386 e 389 são substituídos por ácido aspártico, prolina e serina, respectivamente.

As moléculas da invenção compreendem qualquer combinação das substituições descritas *supra*, em um ou vários dos resíduos 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 e/ou 436. De acordo com uma forma de realização preferencial, a molécula da invenção contém um domínio constante de uma IgG, que compreende os domínios CH₂ e CH₃ humanos, possuindo uma ou várias das substituições seguintes: arginina no resíduo 251, tirosina no resíduo 252, treonina no resíduo 254,

arginina no resíduo 255, treonina no resíduo 308, prolina no resíduo 309, serina no resíduo 311, alanina no resíduo 312, leucina no resíduo 314, arginina no resíduo 385, treonina no resíduo 386, arginina no resíduo 387, prolina no resíduo 389, metionina no resíduo 428 e/ou tirosina no resíduo 434.

Também estão abrangidas pela presente invenção as composições farmacêuticas e suas aplicações para profilaxia e terapia, utilizando imunoglobulinas, proteínas e outras moléculas bioativas modificadas, de acordo com a invenção, que possuem períodos de semivida prolongados. Também estão abrangidos métodos de diagnóstico utilizando imunoglobulinas, proteínas e outras moléculas bioativas modificadas, de acordo com a invenção, que possuem períodos de semivida prolongados. De acordo com uma forma de realização concreta, a invenção proporciona um anticorpo antivírus sincicial respiratório (RSV), útil para tratar ou prevenir uma infecção com RSV, tal como SYNAGIS® (ver a patente de invenção norte-americana nº 5 824 307 e a obra de Johnson *et al.*, J. Infectious Disease 176:1215-1224, 1997), e outros anticorpos anti-RSV, incluindo variantes de SYNAGIS® (ver o pedido de patente de invenção norte-americana com o número de série 09/724,396, depositado a 28 de Novembro de 2000, a patente de invenção norte-americana nº 7 229 619, depositada a 28 de Novembro de 2000, a patente de invenção norte-americana nº 2002/0177126, depositada a 28 de Novembro de 2001 e a patente de invenção norte-americana nº 2003/0091584, depositada a 28 de Novembro de 2001, todas com o título "Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment," da autoria de Young *et al.*, em particular as sequências dos domínios variáveis de cadeia pesada e de

cadeia leve e as CDR dos anticorpos anti-RSV ali descritos), o qual possui uma ou várias modificações de aminoácidos no domínio constante que fazem aumentar a afinidade do anticorpo para o FcRn e que possuem um maior período de semivida *in vivo* (ver também a secção 5.1 *infra*).

3.1 DEFINIÇÕES

O termo "região Fc de IgG " tal como aqui utilizado, designa uma parte de uma molécula de IgG que está correlacionada com um fragmento cristalizável obtido por digestão de uma molécula de IgG com papaína. A região Fc é constituída pela metade do terminal C das duas cadeias pesadas de uma molécula de IgG que estão ligadas por pontes dissulfureto. Tal região não possui nenhuma actividade de ligação ao antigénio, mas contém a fracção de hidrato de carbono e os locais de ligação para o complemento e receptores de Fc, incluindo o receptor FcRn (ver *infra*). O fragmento Fc contém a totalidade do segundo domínio constante CH₂ (resíduos 231-340 da IgG1 humana, de acordo com o sistema de numeração de Kabat) (v.g., a SEQ ID NO:80) e o terceiro domínio constante CH₃ (resíduos 341-447) (v.g., SEQ ID NO:81).

O termo "região Fc-charneira de IgG" ou "fragmento de Fc-charneira", tal como aqui utilizado, designa uma região de uma molécula de IgG constituída pela região Fc (resíduos 231-447) e uma região charneira (resíduos 216-230; v.g., SEQ ID NO:82) que se desenvolve desde o terminal N da região Fc. Como exemplo da sequência de aminoácidos da região Fc-charneira da IgG1 humana refere-se a SEQ ID NO:83.

O termo "domínio constante" designa a parte de uma molécula de imunoglobulina que possui uma sequência de aminoácidos mais conservada, comparativamente com outra parte da imunoglobulina, o domínio variável, que contém o local de ligação do antígeno. O domínio constante contém os domínios CH1, CH2 e CH3 da cadeia pesada e o domínio CHL da cadeia leve.

O termo "receptor FcRn" ou "FcRn", tal como aqui utilizado, designa um receptor de Fc ("n" significa neonatal), sobre o qual se sabe que está implicado na transferência das IgG maternas para um feto, através da placenta humana ou de um primata, ou através do saco vitelino (coelhos), e para um recém-nascido a partir do colostro, através do intestino delgado. Também se sabe que o FcRn está implicado na manutenção de níveis constantes de IgG no soro, pelo facto de se ligar às moléculas de IgG e de as reciclar no soro. A ligação do FcRn às moléculas de IgG é estritamente dependente dos valores de pH, ocorrendo a ligação óptima a pH 6,0. O FcRn é constituído por um heterodímero de dois polipeptidos cujas massas moleculares são aproximadamente iguais a 50 kD e 15 kD, respectivamente. Os domínios extracelulares do polipeptido de 50 kD estão conotados com as cadeias α do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e comprovou-se que o polipeptido de 15 kD é a microglobulina β_2 não polimórfica (β_2 -m). Para além da placenta e do intestino dos recém-nascidos, o FcRn também é expresso em diversos tecidos de diferentes espécies e também em vários tipos de linhagens de células endoteliais. Também é expresso no endotélio vascular, na vasculatura muscular e nas sinusóides hepáticas de seres humanos adultos e foi já sugerido que as células endoteliais podem ser as principais

responsáveis pela manutenção de níveis séricos de IgG em seres humanos e murganhos. As sequências de aminoácidos do FcRn humano e do FcRn dos murinos estão identificadas respectivamente por SEQ ID NO:84 e SEQ ID NO:85,. Também estão incluídas as sequências homólogas destas sequências que possuam actividade de FcRn.

O termo "semivida *in vivo*", tal como aqui utilizado, designa um período de semivida biológica de um tipo particular de molécula de IgG, ou seus fragmentos, contendo os locais de ligação do FcRn, existentes na circulação de um determinado animal, e corresponde ao intervalo de tempo necessário para que metade da quantidade administrada a esse animal seja eliminada da circulação e/ou dos tecidos do animal. Quando se constrói uma curva de depuração de uma determinada IgG, em função do tempo, tal curva é normalmente bifásica, com uma fase α rápida que representa a existência de um equilíbrio, respeitante às moléculas de IgG injectadas, entre o espaço intravascular e extravascular e que é, em parte, determinado pelo tamanho das moléculas, e uma fase β , mais longa, que representa o catabolismo das moléculas de IgG no espaço intravascular. O termo "semivida *in vivo*" corresponde, em particular, ao período de semivida das moléculas de IgG na fase β .

Um anticorpo "isolado" ou "purificado", ou equivalentemente uma proteína de fusão, é aquele que se encontra praticamente livre de qualquer material celular ou de outras proteínas contaminantes provenientes da fonte celular ou tecidual donde se obteve a proteína, ou praticamente isento de precursores químicos ou de outras substâncias químicas, quando sintetizado por via química. A terminologia "praticamente isento de material celular"

qualifica as preparações de um anticorpo, ou de uma proteína de fusão, em que o anticorpo, ou a proteína de fusão, é separado dos componentes celulares das células a partir das quais foi isolado ou produzido por via recombinante. Deste modo, um anticorpo, ou uma proteína de fusão, que seja praticamente isento de material celular, compreende as preparações de anticorpo, ou de proteína de fusão, que contenham menos de cerca de 30%, 20%, 10% ou 5% (relativamente ao peso anidro) de proteínas contaminantes. Se o anticorpo, ou a proteína de fusão, for produzido por via recombinante, também é preferível que esteja praticamente isento de meio de cultura, isto é, o meio de cultura deve representar menos de cerca de 20%, 10% ou 5% do volume da preparação proteica. No caso de o anticorpo, ou a proteína de fusão, ser produzido por síntese química, de preferência é praticamente isento de precursores químicos ou de outras substâncias químicas, isto é, é separado dos precursores químicos, ou de outras substâncias químicas, que estejam implicados na síntese da proteína. Assim sendo, tais preparações de anticorpo, ou de proteína de fusão, possuem menos de cerca de 30%, 20%, 10% ou 5% (relativamente ao peso anidro) de precursores químicos ou de compostos diferentes do anticorpo, ou do fragmento de anticorpo, relevante. De acordo com uma forma de realização preferencial da presente invenção, os anticorpos são isolados ou purificados. De acordo com uma outra forma de realização preferencial da invenção, as proteínas de fusão são isoladas ou purificadas.

Uma molécula de ácido nucleico "isolada" é uma molécula que está separada de outras moléculas de ácidos nucleicos que se encontram presentes na fonte natural da molécula de

ácido nucleico. Além disso, uma molécula de ácido nucleico "isolada", tal como uma molécula de ADNc, pode estar praticamente isenta de outro material celular, ou de meio de cultura, quando produzida por técnicas recombinantes, ou pode estar praticamente isenta de precursores químicos, ou de outras substâncias químicas, quando sintetizada por via química. Uma molécula de ácido nucleico "isolada" não inclui moléculas de ADNc pertencentes a uma biblioteca de ADNc. De acordo com uma forma de realização preferencial da invenção, as moléculas de ácidos nucleicos que codificam anticorpos são isoladas ou purificadas. De acordo com uma outra forma de realização preferencial da invenção, as moléculas de ácidos nucleicos que codificam proteínas de fusão são isoladas ou purificadas.

O termo "célula hospedeira", tal como aqui utilizado, diz respeito à célula do sujeito particular transfectada com uma molécula de ácido nucleico ou infectada com um fagomídeo ou bacteriófago e à progenia ou à potencial progenia de tal célula. A progenia de uma tal célula pode não ser idêntica à célula precursora transfectada com a molécula de ácido nucleico, devido a mutações ou a influências ambientais que possam ocorrer em gerações subsequentes, ou por integração da molécula de ácido nucleico no genoma da célula hospedeira.

Os nomes dos aminoácidos aqui enunciados são abreviaturas correspondentes aos símbolos de três letras ou de uma letra apenas.

Para se determinar a identidade percentual de duas sequências de aminoácidos ou de duas sequências de ácidos nucleicos, faz-se o alinhamento das sequências para efeitos de uma comparação óptima (v.g., é possível introduzir espaços

vazios na primeira sequência de aminoácidos ou na primeira sequência de ácidos nucleicos para que tenha lugar um alinhamento óptimo com uma segunda sequências de aminoácidos ou com uma segunda sequência de ácidos nucleicos). Faz-se então a comparação dos resíduos aminoácidos, ou nucleótidos, nas correspondentes posições de aminoácidos, ou posições de nucleótidos. Quando uma posição na primeira sequência está ocupada pelo mesmo resíduo aminoácido, ou nucleótido, que corresponde à posição da segunda sequência, então considera-se que as moléculas são idênticas nessa posição. A identidade percentual entre duas sequências é uma função do número de posições idênticas partilhadas pelas sequências (isto é, $\text{identidade (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ de posições idênticas em sobreposição} / \text{n}^\circ \text{ total de posições}) \times 100\%$). De acordo com uma forma de realização, as duas sequências têm o mesmo comprimento.

Também é possível determinar a identidade percentual entre duas sequências, recorrendo a um algoritmo matemático. A título de exemplo não limitativo, sugere-se como algoritmo matemático preferencial, utilizável para a comparação de duas sequências, o algoritmo de Karlin e Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, modificado por Karlin e Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877. Tal algoritmo está incorporado nos programas informáticos NBLAST e XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403. A pesquisa de nucleótidos pelo protocolo BLAST pode ser efectuada com os parâmetros do programa NBLAST, para nucleótidos, regulados, v.g., para quantificação = 100, comprimento de palavra = 12, para se obter sequências de nucleótidos homólogas de moléculas de ácidos nucleicos da presente invenção. A pesquisa de proteínas pelo protocolo

BLAST pode ser efectuada com os parâmetros do programa XBLAST, regulados, v.g., para quantificação = 50, comprimento de palavra = 3, para se obter sequências de aminoácidos homólogas de uma molécula proteica da presente invenção. Para se obter alinhamentos com intervalos vazios, para efeitos de comparação, é possível utilizar o protocolo 'Gapped BLAST', conforme descrito por Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Em alternativa, é possível utilizar o protocolo PSI-BLAST para se executar uma pesquisa iterativa que detecta relações distantes entre moléculas (*Id*). No caso de serem utilizados os programas BLAST, Gapped BLAST e PSI-Blast, é possível utilizar os parâmetros, por defeito, dos respectivos programas (v.g., dos programas XBLAST e NBLAST) (ver, v.g., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Um outro exemplo não limitativo, também preferencial de um algoritmo matemático utilizado para comparação de sequências, é o algoritmo de Myers e Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Um algoritmo deste tipo está incorporado no programa ALIGN, (versão 2.0) que faz parte do conjunto de aplicações informáticas de alinhamento de sequências GCG. No caso de ser utilizado o programa ALIGN para comparação de sequências de aminoácidos, é possível utilizar um quadro ponderal de resíduos PAM120, uma elisão forçada de comprimento vazio igual a 12 e uma elisão forçada de espaços vazios igual a 4.

É possível determinar a identidade percentual entre duas sequências, recorrendo a técnicas semelhantes às descritas *supra*, permitindo ou não espaços vazios. Ao fazer-se o cálculo da identidade percentual, apenas são contadas as concordâncias exactas.

4. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 ilustra a estrutura da região de Fc-charneira de IgG que indica as localizações dos resíduos identificados como estando implicados na interacção com o receptor FcRn (Ghetie et al., Immunology Today, 18(12):592-598, 1997).

A figura 2 ilustra a sequência de aminoácidos da região de Fc-charneira da IgG1 humana (SEQ ID NO:83), contendo uma região de charneira (SEQ ID NO:82), o domínio CH2 (SEQ ID NO:80) e o domínio CH3 (SEQ ID NO:81).

As figuras 3 (A e B) ilustram as sequências de aminoácidos do (A) FcRn humano (SEQ ID NO:84) e do (B) FcRn de murganho (SEQ ID NO:85), respectivamente.

A figura 4 ilustra a sequência de aminoácidos da região de Fc-charneira da IgG1 humana (SEQ ID NO:83), em que os resíduos característicos de tipo selvagem, que são mutacionados pelas substituições de aminoácidos, estão indicados a negrito e sublinhados.

A figura 5 traduz um diagrama esquemático do processo de *panning* para a biblioteca de *phage display* de regiões de Fc-charneira modificadas.

A figura 6 corresponde a um resumo da ocorrência de resíduos mutantes seleccionados em posições variantes nas bibliotecas pesquisadas

Figuras 7 (A-D). (A) ilustra a ligação do FcRn dos murinos à IgG1 imobilizada que possui as substituições M252Y/S254T/T56E. O FcRn de murino foi injectado em 10 concentrações diferentes, variando entre 1 nM e 556 nM, sobre uma superfície à qual haviam sido acopladas 4000 unidades de ressonância (UR) de IgG1. Depois de o equilíbrio ter sido alcançado, efectuou-se a eluição da proteína ligada residual,

com um pequeno jacto de PBS a pH 7,4. (B) ilustra a ligação do FcRn humano à IgG1/M252Y/5254T/T256E imobilizada. O FcRn de murino foi injectado com 8 concentrações diferentes, variando entre 71 nM e 2,86 μ M, sobre uma superfície à qual haviam sido acopladas 1000 UR de IgG1. Depois de o equilíbrio ter sido alcançado, efectuou-se a eluição da proteína ligada residual, com um pequeno jacto de PBS a pH 7,4. (C) e (D) ilustram as análises de Scatchard para os dados respectivamente de (A) e (B), após a correcção para a ligação não específica. O parâmetro R_{eq} é o valor da resposta de equilíbrio corrigida para uma dada concentração C. Os gráficos são lineares, com coeficientes de correlação respectivamente iguais a 0,97 e 0,998. Os valores K_d aparentes são respectivamente 24 nM e 225 nM.

Figuras 8 (A-H). (A)-(D) mostram os resultados de análises pelo protocolo 'BIAcore' da ligação do FcRn de murino, a pH 6,0 e a pH 7,4, a (A) IgG1 humana de tipo selvagem, (B) M252Y/S254T/T256E, (C) H433K/N434F/Y436H e (D) G385D/G386P/N389S, respectivamente, após a correcção para a ligação não específica. O FcRn de murino foi injectado com uma concentração de 1,1 μ M sobre uma superfície à qual haviam sido acopladas 1000 UR de IgG1 de tipo selvagem, 1000 UR de M252Y/S254T/T256E, 955 UR de H433K/N434F/Y436H e 939 UR de G385D/Q386P/N389S. (E)-(H) mostram os resultados de análises pelo protocolo 'BIAcore' da ligação do FcRn humano a pH 6,0 e a pH 7,4 respectivamente a (E) IgG1 humana de tipo selvagem, (F) M252Y/S254T/T256E, (G) H433K/N434F/Y436H e (H) G385D/Q386P/N389S, após a correcção para a ligação não específica. O FcRn humano foi injectado com uma concentração de 1,4 μ M sobre uma superfície à qual haviam sido acopladas 1000 UR

de IgG1 de tipo selvagem, 1000 UR de M252Y/S254T/T256E, 955 UR de H433K/N434F/Y436H e 939 UR de G385D/Q386P/N389S.

A figura 9 ilustra o modelo de preenchimento de espaços da superfície do fragmento Fc de uma IgG1 humana com base na estrutura da IgG1 humana proposta por Deisenhofer em 1981, *Biochemistry* 20:2361-2370. Os resíduos são codificados por cores, de acordo com o ganho de energia livre de estabilização do complexo Fc-FcRn: vermelho - concluiu-se que as substituições nestas posições aumentam a afinidade segundo um factor multiplicativo pelo menos igual a 2,5 vezes o observado na interacção entre Fc/FcRn humano e pelo menos igual a 5 vezes a interacção observada entre Fc/FcRn de murganho; azul - concluiu-se que as substituições nestas posições aumentam a afinidade segundo um factor multiplicativo inferior a 2 vezes a observada em ambas as interacções Fc-FcRn humano e Fc-FcRn de murganho. A figura foi desenhada utilizando a aplicação informática 'Swiss pdb viewer' (Guex e Peitsch, 1997, *Electrophoresis* 18:2714-2723).

A figura 10 mostra as alterações da concentração sérica ([Mab] ng/mL) ao longo do tempo (em dias) do anticorpo com um domínio constante de tipo selvagem (SYNAGIS®) (quadrados em branco) ou com domínios constantes com as mutações seguintes: M252Y/S254T/T256E (círculos em branco), G385D/Q386P/N389S (quadrados a cheio) e H433K/N434F/Y436H (círculos a cheio). A concentração de anticorpos foi determinada utilizando o protocolo 'ELISA' anti-IgG humana.

5. DESCRIÇÃO MINUCIOSA DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a moléculas modificadas, em particular a proteínas, mais particularmente

imunoglobulinas, que tenham um maior período de semivida *in vivo* e que compreendam um domínio constante de IgG, que se ligam a um FcRn (de preferência um domínio Fc ou Fc-charneira), que contenham uma ou várias modificações de aminoácidos relativamente a um domínio constante de IgG de tipo selvagem, em que tais modificações aumentam a afinidade do domínio constante de IgG, ou de um seu fragmento, para com o FcRn. De acordo com uma forma de realização preferencial, a invenção diz respeito, particularmente, à modificação das IgG humanas ou humanizadas e de outras moléculas bioactivas que contenham partes das IgG humanas que se ligam ao FcRn, as quais têm uma utilização particular em terapia, profilaxia e diagnóstico em seres humanos.

5.1 MOLÉCULAS COM MAIORES PERÍODOS DE SEMIVIDA *IN VIVO*

A presente invenção baseia-se na identificação de modificações de aminoácidos, em particular em partes do domínio constante da IgG que interacciona com o FcRn, modificações essas que aumentam a afinidade da IgG, ou de um seu fragmento, para com o FcRn. Assim sendo, a invenção diz respeito a moléculas modificadas, de preferência proteínas, mais preferencialmente imunoglobulinas, que compreendam um domínio constante de IgG, em que haja uma ou várias substituições de aminoácidos, em uma ou várias regiões que interaccionem com o FcRn, modificações essas que aumentam a afinidade da IgG, ou de um seu fragmento, para com o FcRn, e aumentam também o período de semivida da molécula *in vivo*. Em formas de realização preferenciais, as modificações de aminoácidos, singulares ou múltiplas, são feitas em um ou vários dos resíduos 251-256, 285-290, 308-

314, 385-389 e 428-436 da região de Fc-charneira da IgG (por exemplo, como sucede numa região de Fc-charneira da IgG1 humana ilustrada na figura 4, SEQ ID NO:83), ou dos seus resíduos análogos, conforme determinado por alinhamento de sequências de aminoácidos, noutras regiões de Fc-charneira de IgG. De acordo com uma forma de realização preferencial, as modificações de aminoácidos são feitas no domínio constante da IgG humana, ou no seu domínio de ligação ao FcRn. De acordo com uma determinada forma de realização, as modificações não são feitas nos resíduos 254 ou 256 (isto é, são todas feitas em um ou vários dos resíduos 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389 ou 428-436) do domínio constante da IgG. De acordo com uma variante mais preferencial, as modificações de aminoácidos não prevêem a substituição com serina na posição 254 e/ou com fenilalanina na posição 256. Em particular, tais modificações não são feitas quando o domínio constante da IgG, o domínio de Fc-charneira, um seu fragmento do domínio de Fc-charneira ou outro fragmento de ligação ao FcRn provém de um murganho.

As modificações de aminoácidos são substituições feitas em um ou vários dos resíduos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e 428-436, que aumentam o período de semivida do domínio constante da IgG *in vivo*, e de qualquer molécula que lhe esteja acoplada, e que aumentam também a afinidade da IgG para com o FcRn. De preferência, as modificações singulares ou múltiplas também têm como resultado uma afinidade de ligação do domínio constante para com o FcRn que é maior a pH 6,0 do que a pH 7,4. De acordo com outras formas de realização, as modificações alteram (isto é, aumentam ou diminuem) a biodisponibilidade da molécula, em

particular alteram (isto é, aumentam ou diminuem) o transporte (ou a concentração ou o período de semivida) da molécula para as superfícies das mucosas (v.g., dos pulmões) ou para outras partes de um tecido destinatário. De acordo com uma forma de realização preferencial, as modificações de aminoácidos alteram (de preferência aumentam) o transporte, ou a concentração ou o período de semivida, da molécula para os pulmões. De acordo com outras formas de realização, as modificações de aminoácidos alteram (de preferência, aumentam) o transporte (ou a concentração ou o período de semivida) da molécula para o coração, pâncreas, fígado, rins, bexiga, estômago, intestino grosso ou delgado, tracto respiratório, nodos linfáticos, tecidos nervosos (tecidos nervosos no sistema central e/ou periférico) músculos, epiderme, ossos, cartilagens, articulações, vasos sanguíneos, medula óssea, próstata, ovários, tecidos uterinos, tumorais ou cancerosos, etc.. De acordo com uma forma de realização preferencial, as modificações de aminoácidos não suprimem ou, mais preferencialmente, não alteram outras funções de ligação de receptores ou efectores imunitários do domínio constante, por exemplo, mas sem nenhuma limitação, para complementar a fixação, ADCC e a ligação a $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$, e $Fc\gamma RIII$, conforme se pode determinar por métodos perfeitamente conhecidos e vulgares na especialidade. De acordo com uma outra forma de realização preferencial, o fragmento modificado do domínio constante de ligação ao $FcRn$ não contém sequências que intervenham indirectamente em funções de efectores imunitários ou noutras funções de ligação aos receptores. Tais fragmentos podem ser particularmente úteis para conjugação com uma molécula não-

IgG ou com uma molécula de tipo não-imunoglobulina, para aumentar o seu período de semivida *in vivo*. Ainda de acordo com mais uma outra forma de realização, as funções dos efectores são alteradas selectivamente (v.g., as funções dos efectores são reduzidas ou aumentadas).

De acordo com formas de realização preferenciais, as modificações de aminoácidos são substituições em um ou vários dos resíduos 308, 309, 311, 312 e 314, sendo particularmente substituições com treonina na posição 308, prolina na posição 309, serina na posição 311, alanina na posição 312 e/ou leucina na posição 314. Em alternativa, a modificação é a substituição com uma isoleucina na posição 308, prolina na posição 309 e/ou ácido glutâmico na posição 311. De acordo com mais uma outra forma de realização, os resíduos em uma ou várias das posições 308, 309, 311, 312 e 314 são substituídos respectivamente por treonina, prolina, leucina, alanina e alanina. Assim sendo, em determinadas formas de realização, o resíduo na posição 308 é substituído por treonina ou isoleucina, o resíduo na posição 309 é substituído por prolina, o resíduo na posição 311 é substituído por serina, ácido glutâmico ou leucina, o resíduo na posição 312 é substituído por alanina e/ou o resíduo na posição 314 é substituído por leucina ou alanina. De acordo com uma forma de realização preferencial, a substituição consiste numa treonina na posição 308, uma prolina na posição 309, uma serina na posição 311, um ácido aspártico na posição 312 e/ou uma leucina na posição 314.

Em formas de realização preferenciais, as modificações de aminoácidos são substituições em um ou vários dos resíduos 251, 252, 254, 255 e 256. Em formas de realização concretas, o resíduo 251 é substituído por arginina, o resíduo 252 é

substituído por tirosina, fenilalanina, triptofano ou treonina, o resíduo 254 é substituído por treonina, o resíduo 255 é substituído por arginina, leucina, glicina ou isoleucina e/ou o resíduo 256 é substituído por fenilalanina, serina, arginina, glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico, alanina ou asparagina. De acordo com uma forma de realização mais concreta, o resíduo 251 é substituído por arginina, o resíduo 252 é substituído por tirosina, o resíduo 254 é substituído por treonina ou serina, o resíduo 255 é substituído por arginina e/ou o resíduo 256 é substituído por ácido glutâmico.

Em formas de realização preferenciais, as modificações de aminoácidos são substituições em um ou vários dos resíduos 428, 433, 434 e 436. Em formas de realização concretas, o resíduo 428 é substituído por treonina, metionina, leucina, fenilalanina ou serina, o resíduo 433 é substituído por lisina, arginina, serina, isoleucina, prolina, glutamina ou histidina, o resíduo 434 é substituído por fenilalanina, tirosina ou histidina e/ou o resíduo 436 é substituído por histidina, asparagina, arginina, treonina, lisina ou metionina. De acordo com uma forma de realização mais concreta, os resíduos na posição 428 e/ou 434 são substituídos, respectivamente, por metionina e/ou histidina.

Em formas de realização preferenciais, as modificações de aminoácidos são substituições em um ou vários dos resíduos 385, 386, 387 e 389, sendo as substituições feitas mais concretamente em uma ou várias destas posições. Em formas de realização concretas, o resíduo 385 é substituído por arginina, ácido aspártico, serina, treonina, histidina, lisina, alanina ou glicina, o resíduo 386 é substituído por treonina, prolina, ácido aspártico, serina, lisina, arginina, isoleucina ou metionina, o resíduo 387 é substituído por

arginina, prolina, histidina, serina, treonina ou alanina e/ou o resíduo 389 é substituído por prolina, serina ou asparagina. Em formas de realização mais concretas, os resíduos em uma ou várias das posições 385, 386, 387 e 389 são substituídos, respectivamente, por arginina, treonina, arginina e prolina. Ainda de acordo com mais uma outra forma de realização, os resíduos em uma ou várias das posições 385, 386 e 389 são substituídos, respectivamente, por ácido aspártico, prolina e serina.

Em formas de realização particulares, as modificações de aminoácidos são feitas em um dos resíduos ou numa combinação de resíduos 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 314, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 e/ou 436, em particular se as modificações consistem em uma ou várias das substituições de aminoácidos agora acabadas de descrever, indicadas para tais resíduos.

De acordo com uma forma de realização preferencial, a molécula da invenção contém uma região Fc, ou um seu domínio de ligação ao FcRn, possuindo uma ou várias das substituições seguintes: arginina no resíduo 251, tirosina no resíduo 252, treonina no resíduo 254, arginina no resíduo 255, treonina no resíduo 308, prolina no resíduo 309, serina no resíduo 311, alanina no resíduo 312, leucina no resíduo 314, arginina no resíduo 385, treonina no resíduo 386, arginina no resíduo 387, prolina no resíduo 389, metionina no resíduo 428 e/ou tirosina no resíduo 434.

De acordo com uma forma de realização preferencial, o domínio de ligação ao FcRn possui uma substituição em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16 ou na totalidade dos 18 resíduos 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 314, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 e/ou 436.

As modificações de aminoácidos podem ser feitas por qualquer método conhecido na especialidade e há muitos desses métodos que são vulgares e perfeitamente dominados pelos especialistas na matéria. Por exemplo, mas sem qualquer limitação, as substituições, deleções e inserções de aminoácidos podem ser efectuadas recorrendo a qualquer técnica perfeitamente conhecida, à base de PCR. As substituições de aminoácidos podem ser feitas por mutagénese dirigida ao local (ver, por exemplo, Zoller e Smith, Nucl. Acids Res. 10:6487-6500, 1982; Kunkel, Proc. Natl. Acad Sci USA 82:488, 1985). Os mutantes resultantes, que tenham maior afinidade para com o FcRn e um maior período de semivida *in vivo*, podem ser pesquisados facilmente, recorrendo a ensaios experimentais, vulgares e perfeitamente conhecidos, tais como os descritos na secção 5.11 *infra*. De acordo com um método preferencial, as substituições de aminoácidos são feitas em um ou vários resíduos do domínio constante da IgG, ou num seu fragmento de ligação ao FcRn, e os domínios constantes mutacionados, ou seus fragmentos, são expressos na superfície do bacteriófago, sendo depois seleccionados pela sua maior afinidade de ligação ao FcRn (ver, em particular, as secções 5.2 e 5.11, *infra*).

De preferência, os resíduos aminoácidos, que se pretende modificar, são resíduos expostos à superfície. Além disso, quando são feitas substituições de aminoácidos, então o resíduo aminoácido que se pretende substituir é, de preferência, objecto de uma substituição com conservação do tipo de aminoácido, por exemplo, um resíduo polar é substituído por um resíduo polar, um resíduo hidrofílico é substituído por um resíduo hidrofílico, um resíduo

hidrofóbico é substituído por um resíduo hidrofóbico, um resíduo com carga eléctrica positiva é substituído por um resíduo com carga eléctrica positiva, ou um resíduo com carga eléctrica negativa é substituído por um resíduo com carga eléctrica negativa. Além do mais, de preferência, o resíduo aminoácido que se pretende modificar não é nem forte nem totalmente conservado através das espécies e/ou é crítico para que seja mantida a estrutura terciária do domínio constante ou para a ligação ao FcRn. Por exemplo, mas sem nenhuma limitação, não tem interesse a modificação da histidina no resíduo 310.

No quadro 1 estão enumerados os mutantes específicos do domínio de Fc que têm uma maior afinidade para com o FcRn e que foram isolados após *panning* repetido três vezes (conforme descrito na secção 6) a partir de uma biblioteca de moléculas mutantes de IgG1 humana com mutações nos resíduos 308-314 (a histidina na posição 310 e o triptofano na posição 313 são fixos), os mutantes isolados após a quinta repetição de *panning* da biblioteca de moléculas para os resíduos 251-256 (a isoleucina na posição 253 é fixa), os mutantes isolados após a sexta repetição de *panning* da biblioteca de moléculas para os resíduos 428-436 (a histidina na posição 429, o ácido glutâmico na posição 430, a alanina na posição 431, a leucina na posição 432 e a histidina na posição 435 são fixos) e os mutantes isolados após a sexta repetição de *panning* da biblioteca de moléculas para os resíduos 385-389 (o ácido glutâmico na posição 388 é fixo). A IgG1 humana de tipo selvagem possui uma sequência Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu (SEQ ID NO:86) nas posições 308-314, Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr (SEQ ID NO:87) nas posições 251-256, Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-

His-Tyr (SEQ ID NO:88) nas posições 428-436 e Gly-Gln-Pro-Glu-Asn (SEQ ID NO:89) nas posições 385-389.

Quadro I

MUTANTES ISOLADOS POR PANNING	
BIBLIOTECA	MUTANTES*
251-256	Leu Tyr Ile Thr Arg Glu (SEQ ID NO:90)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Thr (SEQ ID NO:91)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Ser (SEQ ID NO:92)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Arg (SEQ ID NO:93)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Gln (SEQ ID NO:94)
	Leu Trp Ile Ser Arg Thr (SEQ ID NO:95)
	Leu Tyr Ile Ser Leu Gln (SEQ ID NO:96)
	Leu Phe Ile Ser Arg Asp (SEQ ID NO:97)
	Leu Phe Ile Ser Arg Thr (SEQ ID NO:98)
	Leu Phe Ile Ser Arg Arg (SEQ ID NO:99)
	Leu Phe Ile Thr Gly Ala (SEQ ID NO:100)
	Leu Ser Ile Ser Arg Glu (SEQ ID NO:101)
	Arg Thr Ile Ser Ile Ser (SEQ ID NO:102)
308-314	Thr Pro His Ser Asp Trp Leu (SEQ ID NO:103)
	Ile Pro His Glu Asp Trp Leu (SEQ ID NO:104)
385-389	Arg Thr Arg Glu Pro (SEQ ID NO: 105)
	Asp Pro Pro Glu Ser (SEQ ID NO:106)
	Ser Asp Pro Glu Pro (SEQ ID NO:107)
	Thr Ser His Glu Asn (SEQ ID NO:108)
	Ser Lys Ser Glu Asn (SEQ ID NO:109)
	His Arg Ser Glu Asn (SEQ ID NO:110)

MUTANTES ISOLADOS POR <i>PANNING</i>	
BIBLIOTECA	MUTANTES*
	Lys Ile Arg Glu Asn (SEQ ID NO:111)
	Gly Ile Thr Glu Ser (SEQ ID NO:112)
	Ser Met Ala Glu Pro (SEQ ID NO:113)
428-436	<i>Met His Glu Ala Leu</i> Arg Tyr His His (SEQ ID NO:114)
	<i>Met His Glu Ala Leu His</i> Phe His His (SEQ ID NO:115)
	<i>Met His Glu Ala Leu Lys</i> Phe His His (SEQ ID NO:116)
	<i>Met His Glu Ala Leu Ser</i> Tyr His Arg (SEQ ID NO:117)
	Thr <i>His Glu Ala Leu His</i> Tyr His Thr (SEQ ID NO:118)
	<i>Met His Glu Ala Leu His</i> Tyr His Tyr (SEQ ID NO:119)
* Os resíduos substituintes estão indicados a negrito	

As sequências sublinhadas no quadro I correspondem às sequências que ocorreram 10 a 20 vezes na última repetição de *panning* e as sequências em itálico correspondem às sequências que ocorreram 2 a 5 vezes na última repetição de *panning*. As sequências que não estão nem sublinhadas nem em itálico ocorreram uma vez na última repetição de *panning*.

De acordo com uma forma de realização preferencial, a invenção proporciona moléculas de imunoglobulina modificadas (v.g., diversos anticorpos) que possuem um maior período de semivida *in vivo* e uma maior afinidade para com o FcRn, comparativamente com moléculas não

modificadas (e, em casos de realização preferenciais, uma biodisponibilidade alterada, tal como um transporte maior ou menor para as superfícies das mucosas ou para outros tecidos destinatários). Tais moléculas de imunoglobulina compreendem as moléculas de IgG que contêm naturalmente um domínio de ligação ao FcRn e outras imunoglobulinas de tipo não-IgG (v.g., IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) ou fragmentos de imunoglobulinas que tenham sido manipuladas artificialmente para conterem um fragmento de ligação ao FcRn (isto é, proteínas de fusão que compreendam imunoglobulinas de tipo não-IgG, ou uma parte sua, e um domínio de ligação ao FcRn). Em ambos os casos, o domínio de ligação ao FcRn possui uma ou várias substituições de aminoácidos que aumentam a afinidade do fragmento de domínio constante para com o FcRn.

As imunoglobulinas modificadas compreendem todas as moléculas de imunoglobulina que se ligam (de preferência, de uma forma imuno-específica, isto é, competem contra a ligação não específica), conforme determinado por imunoanálises perfeitamente conhecidas na especialidade para a análise da ligação específica antígeno-anticorpo) a um antígeno e que contêm um fragmento de ligação ao FcRn. Tais anticorpos compreendem, mas sem nenhuma limitação, os anticorpos policlonais, monoclonais, biespecíficos, multiespecíficos, humanos, humanizados, quiméricos, anticorpos de cadeia singular, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, os Fv ligados por pontes dissulfureto e os fragmentos que contêm um domínio quer VL quer VH ou mesmo uma região determinante da complementaridade (CDR) que se liga especificamente a um antígeno, em determinados casos, manipulado artificialmente

para conter um domínio de ligação ao FcRn ou para se fundir com este domínio.

As moléculas de IgG da invenção, e os seus fragmentos de ligação ao FcRn, são preferencialmente a subclasse IgG1 das IgG, mas também podem ser quaisquer outras subclasses de IgG de determinados animais. Por exemplo, nos seres humanos, a classe IgG compreende as IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e a classe IgG de murganho compreende as IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3. Sabe-se que há determinadas subclasses de IgG, por exemplo, as IgG2b e IgG2c de murganho, cujas velocidades de depuração são maiores, por exemplo, do que as da IgG1 (Medesan et al., Eur. J. Immunol., 28:2092-2100, 1998). Assim, quando são utilizadas subclasses de IgG diferentes da IgG1, pode ser, eventualmente, vantajoso substituir um ou vários dos resíduos, em particular nos domínios CH2 e CH3, que sejam diferentes dos existentes na sequência de IgG1, pelos da IgG1, assim se aumentando o período de semivida *in vivo* dos outros tipos de IgG.

As imunoglobulinas (e outras proteínas aqui utilizadas) podem ser de uma origem animal qualquer, incluindo aves e mamíferos. De preferência, os anticorpos são de seres humanos, roedores (v.g., murganhos e ratos), burros, ovídeos, coelhos, caprídeos, porcos-da-índia, camelos, equídeos ou galináceos. Conforme aqui utilizados, os anticorpos "humanos" compreendem os anticorpos que possuem a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e compreendem os anticorpos isolados a partir de bibliotecas de imunoglobulina humana ou a partir de animais transgênicos para uma ou várias imunoglobulinas humanas e que não expressem imunoglobulinas endógenas, conforme descrito *infra* e ainda, por exemplo, conforme descrito na

patente de invenção norte-americana nº 5 939 598 de Kucherlapati *et al.*

Os anticorpos da presente invenção podem ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos ou podem ter uma multiespecificidade superior. Os anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para diferentes epítomos de um polipeptido ou podem ser específicos para epítomos heterólogos, tais como um polipeptido heterólogo ou um material de suporte sólido. (ver, *v.g.*, as publicações PCT com os nºs WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, *et al.*, J. Immunol., 147:60-69, 1991; as patentes de invenção norte-americanas nºs 4 474 893; 4 714 681; 4 925 648; 5 573 920; 5 601 819; Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148:1547-1553, 1992.

Os anticorpos da presente invenção compreendem os derivados que sejam modificados de outra maneira, isto é, por acoplamento covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo, de tal modo que o acoplamento covalente não impeça o anticorpo de se ligar ao antígeno e/ou de gerar uma resposta anti-idiotípica. Por exemplo, mas sem nenhuma limitação, os derivados de anticorpos compreendem os anticorpos que tenham sido modificados, *v.g.*, por glicosilação, acetilação, PEGilação, fosforilação, amidação, transformação por meio de grupos conhecidos de protecção/bloqueio, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou a outra proteína, etc.. É possível praticar inúmeras modificações químicas por meio de técnicas conhecidas, incluindo, mas sem nenhuma limitação, a clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica da tunicamicina, etc.. Além disso, o derivado pode conter um ou vários aminoácidos de tipo não clássico.

Os anticorpos monoclonais podem ser preparados recorrendo a diversas técnicas conhecidas na especialidade, incluindo a utilização das tecnologias do hibridoma, recombinantes e de *phage display*, ou uma sua combinação. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando técnicas do hibridoma, incluindo as que são conhecidas na especialidade e explicadas, por exemplo, na obra de Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988); Hammerling, et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). O termo "anticorpo monoclonal", tal como aqui utilizado, não se limita aos anticorpos produzidos por meio da tecnologia do hibridoma. O termo "anticorpo monoclonal" refere-se a uma anticorpo que derive de um clone singular, incluindo um clone eucariótico, procariótico ou bacteriófago, e não ao método pelo qual é produzido.

Os métodos para a produção e pesquisa de anticorpos específicos, utilizando a tecnologia do hibridoma, são vulgares e perfeitamente conhecidos na especialidade. A título de exemplo não limitativo é possível imunizar murganhos com um antigénio relevante ou com uma célula em que tenha lugar a expressão de um tal antigénio. Depois de ter sido detectada uma resposta imunitária, v.g., depois de terem sido detectados anticorpos específicos para o antigénio no soro do murganho, remove-se o baço do murganho e faz-se o isolamento dos esplenócitos. Os esplenócitos são depois fundidos, por meios de técnicas perfeitamente conhecidas, com quaisquer células de mieloma adequadas. Os hibridomas são seleccionados e clonados por diluição limitante. Os clones do hibridoma são depois analisados,

por métodos perfeitamente conhecidos na especialidade, para a pesquisa de células que segreguem anticorpos capazes de se ligarem ao antígeno. É possível gerar fluido ascítico, que contém, geralmente, níveis elevados de anticorpos, inoculando murganhos intraperitonealmente com clones positivos de hibridoma.

É possível gerar, por meio de técnicas conhecidas, fragmentos de anticorpos que reconheçam epítopos específicos. Por exemplo, é possível produzir os fragmentos Fab e $F(ab')_2$ por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, utilizando enzimas tais como as da papaína (para a produção de fragmentos Fab) ou de pepsina (para a produção de fragmentos $F(ab')_2$). Os fragmentos $F(ab')_2$ contêm a região variável e a cadeia leve completas, a região CH1 e a região de charneira de cadeia pesada.

Por exemplo, os anticorpos também podem ser gerados recorrendo a diversos métodos de *phage display*, conhecidos na especialidade. Nos métodos de *phage display*, os domínios funcionais do anticorpo são expostos sobre a superfície das partículas do bacteriófago, que são portadoras das sequências nucleotídicas que os codificam. De acordo com uma forma de realização particular, tais bacteriófagos podem ser utilizados para expor os domínios de ligação do antígeno, tais como Fab e Fv ou então o Fv estabilizado por pontes dissulfureto, expressos a partir de um repertório ou biblioteca combinatória de anticorpos (v.g., de seres humanos ou de murinos). Os bacteriófagos em que tem lugar a expressão de um domínio de ligação ao antígeno, que vai ligar-se ao antígeno relevante, podem ser seleccionados ou identificados por meio do antígeno, v.g., utilizando o antígeno marcado ou o antígeno ligado

ou imobilizado numa superfície sólida, ou em esférulas. Os bacteriófagos utilizados nestes métodos são, tipicamente, bacteriófagos filamentosos, incluindo os fd e M 13. Os domínios de ligação do antigénio são expressos sob a forma de uma proteína fundida, por via recombinante, quer com o gene III do bacteriófago quer com a proteína do gene VIII. Em alternativa, a parte das imunoglobulinas da presente invenção que se liga ao FcRn modificado também pode ser expressa num sistema de *phage display*. Como exemplos de métodos de *phage display* que é possível utilizar para a produção de imunoglobulinas, ou dos seus fragmentos, da presente invenção, refere-se os descritos por Brinkman et al., J. Immunol. Methods, 182:41-50, 1995; Ames et al., J. Immunol. Methods, 184:177-186, 1995; Kettleborough et al., Eur. J. Immunol., 24:952-958, 1994; Persic et al., Gene, 187:9-18, 1997; Burton et al., Advances in Immunology, 57:191-280, 1994; pedido de patente de invenção PCT com o nº PCT/GB91/01134; as publicações PCT com os nºs WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; e as patentes de invenção norte-americanas nºs 5 698 426; 5 223 409; 5 403 484; 5 580 717; 5 427 908; 5 750 753; 5 821 047; 5 571 698; 5 427 908; 5 516 637; 5 780 225; 5 658 727; 5 733 743 e 5 969 108.

Conforme descrito nas referências anteriores, após a selecção do bacteriófago, é possível isolar a partir do bacteriófago as regiões que codificam o anticorpo e utilizá-las para gerar anticorpos inteiros, incluindo anticorpos de seres humanos, ou quaisquer outros fragmentos desejados, e fazer com que sejam expressos em qualquer hospedeiro desejado, incluindo as células de mamíferos, células de insectos, células de plantas, leveduras e

bactérias, *v.g.*, conforme adiante se descreve minuciosamente. Por exemplo, as técnicas para a produção de fragmentos Fab, Fab' e F(ab')₂ por via recombinante também podem ser utilizadas, recorrendo a métodos conhecidos na especialidade, tais como os descritos na publicação PCT com o nº WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques*, 12(6):864-869, 1992; e Sawai et al., *AJRI*, 34:26-34, 1995; e Better et al., *Science*, 240:1041-1043, 1988. Como exemplos de técnicas que é possível utilizar para a produção dos Fv de cadeia singular e de anticorpos, refere-se as descritas nas patentes de invenção norte-americanas nºs 4 946 778 e 5 258 498; Huston et al., *Methods in Enzymology*, 203:46-88, 1991; Shu et al., *PNAS*, 90:7995-7999, 1993; e Skerra et al., *Science*, 240:1038-1040, 1988.

Para algumas aplicações, incluindo a utilização de anticorpos *in vivo* em seres humanos e em análises de detecção *in vitro*, pode ser preferível utilizar anticorpos quiméricos, humanizados ou de seres humanos. Um anticorpo quimérico é uma molécula em que partes diferentes do anticorpo provêm de espécies animais diferentes, possuindo tais anticorpos uma região variável proveniente de um anticorpo monoclonal de murino e uma região constante proveniente de uma imunoglobulina humana. Os métodos para a produção de anticorpos quiméricos são perfeitamente conhecidos na especialidade. Ver, *v.g.*, Morrison, *Science*, 229:1202, 1985; Oi et al., *BioTechniques*, 4:214 1986; Gillies et al., *J. Immunol. Methods*, 125:191-202, 1989; e as patentes de invenção norte-americanas nºs 5 807 715; 4 816 567; e 4 816 397. Os anticorpos humanizados são moléculas de anticorpos provenientes de espécies diferentes da humana e que se ligam ao antigénio desejado que possui

uma ou várias regiões determinantes da complementaridade (CDR) provenientes de uma espécie não humana, e regiões estruturais provenientes de uma molécula de imunoglobulina humana. Por vezes, os resíduos estruturais das regiões estruturais humanas são substituídos pelos correspondentes resíduos provenientes do anticorpo dador das CDR para alterar, de preferência melhorar, a ligação do antigénio. Estas substituições estruturais são identificadas por métodos perfeitamente conhecidos na especialidade, *v.g.*, recorrendo à modulação das interacções das CDR e dos resíduos estruturais para identificar resíduos estruturais importantes para a ligação do antigénio e para a comparação entre sequências para identificar resíduos estruturais invulgares em posições particulares. Ver, *v.g.*, Queen *et al.*, patente de invenção norte-americana nº 5 585 089; Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323, 1988. Os anticorpos podem ser humanizados, recorrendo a diversas técnicas conhecidas na especialidade, incluindo, por exemplo, o transplante de CDR (EP 239,400; publicação PCT com o nº WO 91/09967; patentes de invenção norte-americanas nºs 5 225 539; 5 530 101 e 5 585 089), compensação e recomposição superficial (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498, 1991; Studnicka *et al.*, *Protein Engineering*, 7(6):805-814, 1994; Roguska *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 91:969-973, 1994), e desmantelamento da cadeia (patente de invenção norte-americana nº 5 565 332). .

Os anticorpos totalmente humanos são particularmente desejáveis para o tratamento terapêutico de pacientes humanos. É possível preparar anticorpos humanos recorrendo a diversos métodos conhecidos na especialidade, incluindo os métodos

de *phage display* descritos anteriormente, utilizando bibliotecas de anticorpos derivados de sequências de imunoglobulinas humanas. Ver as patentes de invenção norte-americanas n°s 4 444 887 e 4 716 111; e as publicações PCT com os n°s WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; e WO 91/10741.

Também é possível produzir anticorpos humanos utilizando murganhos transgênicos que sejam incapazes de expressar imunoglobulinas endógenas funcionais, mas que consigam expressar genes de imunoglobulinas humanas. Para se ter uma ideia geral desta tecnologia para a produção de anticorpos humanos, ler a obra de Lonberg e Huszar, *Int. Rev. Immunol.*, 13:65-93, 1995. Para um estudo pormenorizado desta tecnologia para a produção de anticorpos humanos e de anticorpos monoclonais humanos e sobre protocolos para a produção de tais anticorpos ver, *v.g.*, as publicações PCT com os n°s WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; a patente de invenção europeia n° 0 598 877; as patentes de invenção norte-americanas n°s 5 413 923; 5 625 126; 5 633 425; 5 569 825; 5 661 016; 5 545 806; 5 814,318; 5 885 793; 5 916 771; e 5 939 598. Além disso, há empresas, tais como Abgenix, Inc. (Freemont, CA), Medarex (NJ) e Genpharm (San Jose, CA), que podem fornecer anticorpos humanos dirigidos contra um antígeno seleccionado, utilizando tecnologia semelhante à descrita anteriormente.

Os anticorpos totalmente humanos que reconhecem um epítipo seleccionado podem ser gerados recorrendo a uma técnica designada por "selecção orientada". De acordo com esta metodologia, utiliza-se um anticorpo monoclonal seleccionado, não humano, *v.g.*, um anticorpo de murganho, para orientar a selecção de um anticorpo totalmente humano

que reconheça o mesmo epítopo. (Jespers et al., Bio/technology, 12:899-903, 1988).

Em formas de realização particulares, os anticorpos modificados têm aplicações terapêuticas e/ou profiláticas *in vivo*. Como exemplos de anticorpos terapêuticos e profiláticos que podem ser modificados dessa maneira refere-se, mas sem nenhuma limitação, SYNAGIS® (Med-Immune, MD), que é um anticorpo monoclonal humanizado anti-vírus sincicial respiratório (RSV) para o tratamento de pacientes com uma infecção de RSV; HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA), que é um anticorpo monoclonal humanizado anti-HER2 para o tratamento de pacientes com cancro metastático da mama; REMICADE® (infliximab) (Centocor, PA), que é um anticorpo monoclonal quimérico anti-TNF α para o tratamento de pacientes com a doença de Crone; REOPRO® (abciximab) (Centocor), que é um receptor anti-glicoproteína IIb/IIIa nas plaquetas para a prevenção da formação de coágulos; ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suíça), que é um anticorpo monoclonal imunossupressor humanizado anti-CD25 para a prevenção da rejeição aguda de um alotransplante renal. Outros exemplos são o F(ab')₂ humanizado anti-CD18 (Genentech); o CDP860 que é um fragmento F(ab')₂ humanizado anti-CD18 (Celltech, UK); o PRO542 que é um anticorpo de gp120 anti-HIV fundido com a CD4 (Progenics/Genzyme Transgenics); o Ostavir que é um anticorpo humano anti-vírus da hepatite B (Protein Design Lab/Novartis); PROTOVIR™ que é um anticorpo de IgG1 humanizado anti-CMV (Protein Design Lab/Novartis); o MAK-195 (SEGARD) que é um fragmento F(ab')₂ de murino anti-TNF α (Knoll Pharma/BASF); o IC14 que é um anticorpo anti-CD 14 (ICOS Pharm); um anticorpo de IgG1 humanizado anti-VEGF

(Genentech); o OVAREX™ que é um anticorpo de murino anti-CA 125 (Altarex); o PANOREX™ que é um anticorpo de IgG2a de murino contra o antígeno da superfície celular anti-17-IA (Glaxo Wellcome/Centocor); o BEC2 que é um anticorpo de IgG de murino anti-idiotipo (epítipo GD3) (ImClone System); o IMC-C225 que é um anticorpo de IgG quimérico anti-EGFR (ImClone System); o VITAXIN™ que é anticorpo de integrina humanizado anti- $\alpha v \beta 3$ (Applied Molecular Evolution/MedImmune); o Campath 1H/LDP-03 que é um anticorpo de IgG1 humanizado anti-CD52 (Leukosite); o Smart M195 que é um anticorpo de IgG humanizado anti-CD33 (Protein Design Lab/Kanebo); o RITUXAN™ que é um anticorpo de IgG1 quimérico anti-CD20 (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); o LYMPHOCIDE™ que é um anticorpo de IgG humanizado anti-CD22 (Immunomedics); o Smart ID10 que é um anticorpo humanizado anti-HLA (Protein Design Lab); o ONCOLYM™ (Lym-1) que é um anticorpo de murino marcado com radioisótopos anti-HLA DIAGNOSTIC REAGENT (Techniclone); o ABX-IL8 que é um anticorpo humano anti-IL8 (Abgenix); o anti-CD11a que é um anticorpo de IgG1 humanizado (Genetech/Xoma); o ICM3 que é um anticorpo humanizado anti-ICAM3 (ICOS Pharm); o IDEC-114 que é um anticorpo primatizado anti-CD80 (IDEC Pharm/Mitsubishi); o ZEVALIN™ que é um anticorpo de murino marcado com radioisótopos anti-CD20 (IDEC/Schering AG); o IDEC-131 que é um anticorpo humanizado anti-CD40L (IDEC/Eisai); o IDEC-151 que é um anticorpo primatizado anti-CD4 (IDEC); o IDEC-152 que é um anticorpo primatizado anti-CD23 (IDEC/Seikagaku); o SMART anti-CD3 que é um anticorpo de IgG humanizado anti-CD3 (Protein Design Lab); o 5G1.1 que é um anticorpo de factor 5 (C5) humanizado anti-complemento (Alexion Pharm); o D2E7 que é um anticorpo

humanizado anti-TNF- α (CAT/BASF); o CDP870 que é um fragmento Fab humanizado anti-TNF- α (Celltech); o IDEC-151 que é um anticorpo de IgG1 primatizado anti-CD4 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); o MDX-CD4 que é um anticorpo de IgG humana anti-CD4 (Medarex/Eisai/Genmab); o CDP571 que é um anticorpo de IgG4 humanizado anti-TNF- α (Celltech); o LDP-02 que é um anticorpo humanizado anti- $\alpha 4\beta 7$ (LeukoSite/Genentech); o OrthoClone OKT4A que é um anticorpo de IgG humanizado anti-CD4 (Ortho Biotech); o ANTOVA™ que é um anticorpo de IgG humanizado anti-CD40L (Biogen); o ANTEGREN™ que é um anticorpo de IgG humanizado anti-VLA-4 (Elan); o MDX-33 que é um anticorpo humano anti-CD64 (Fc γ R) (Medarex/Centex); o SCH55700 que é um anticorpo de IgG4 humanizado anti-IL-5 (Celltech/Schering); o SB-240563 e o SB-240683 que são anticorpos humanizados respectivamente anti-IL-5 e anti-IL-4 (SmithKline Beecham); o rhuMab-E25 que é um anticorpo de IgG1 humanizado anti-IgE (Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems); o IDEC-152 que é um anticorpo primatizado anti-CD23 (IDEC Pharm); o ABXCBL que é um anticorpo de IgM de murino anti-CD147 (Abgenix); o BTI-322 que é um anticorpo de IgG de rato anti-CD2 (Medimmune/Bio Transplant); o Orthoclone/OKT3 que é um anticorpo de IgG2a de murino anti-CD3 (ortho Biotech); o SIMULECT™ que é um anticorpo de IgG1 quimérico anti-CD25 (Novartis Pharm); o LDP-01 que é um anticorpo de IgG humanizado anti-integrina $\beta 2$ (LeukoSite); o anti-LFA-1 que é um fragmento F(ab')₂ de murino anti-CD18 (Pasteur-Merieux/Immunotech); o CAT-152 que é um anticorpo humano anti-TGF $\beta 2$ (Cambridge Ab Tech); e o Corsevin M que é um anticorpo quimérico anti-Factor VII (Centocor).

De acordo com formas de realização específicas, a invenção proporciona anticorpos modificados que possuem uma ou várias mutações aqui descritas e que se ligam de forma imuno-específica aos RSV, *v.g.*, o SYNAGIS®. A presente invenção proporciona também anticorpos modificados que possuem uma ou várias das mutações aqui descritas e que compreendem um domínio pesado variável (VH) e/ou leve variável (VL) que possui a sequência de aminoácidos de qualquer domínio VH e/ou VL indicado no quadro III. A presente invenção também diz respeito a anticorpos anti-RSV que compreendem uma ou várias regiões determinantes da complementaridade de VH (as CDR) e/ou uma ou várias CDR de VL que possuam a sequência de aminoácidos de uma ou várias das CDR de VH e/ou das CDR de VL indicadas no quadro III ou uma ou várias das CDR indicadas no quadro II, em que um ou vários dos resíduos a negrito e sublinhados possuem uma substituição de um aminoácido, preferencialmente uma que aumente a afinidade do anticorpo para com o RSV. Em formas de realização concretas, o anticorpo que se pretende modificar é AFFF, p12f2, p12f4, p11d4, Ale109, A12a6, A13c4, A17d4, A4B4, A8C7, 1X-493L1FR, H3-3F4, M3H9, Y10H6, DG, AFFF(1), 6H8, L1-7E5, L215B10, A13A11, A1H5, A4B4(1), A4B4L1FR-S28R, A4B4-F52S.

Quadro II.

Sequências das CDR do SYNAGIS®

CDR	Sequência	SEQ ID NO:
VH1	T <u>S</u> GM SVG	1
VH2	DIWWD <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> YNPSLK <u>S</u>	2

VH3	<u>S</u> MI <u>T</u> NWYFDV	3
VL1	<u>KCQLS</u> VGVMH	4
VL2	DT <u>SKLAS</u>	5
VL3	FQGS <u>GYP</u> <u>F</u> T	6

Quadro III

Anticorpos anti-RSV								
Nome do anti-corpo	Do-mínio VH	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH	Do-mínio VL	CDR1 de VL	CDR2 de VL	CDR3 de VL
SYNAGIS	SEQ ID NO: 7	TSGMSVG (SEQ ID NO:1)	DIWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	SMITNWYFDV (SEQ ID NO:3)	SEQ ID NO: 8	KCQLSVGYMH (SEQ ID NO:4)	DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
AFFF	SEQ ID NO: 9	~~T~~ AGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	SMITN <u>F</u> YFDV (SEQ ID NO:12)	SEQ ID NO: 13	<u>SASS</u> SVGYMH (SEQ ID NO:14)	DT <u>F</u> KLAS (SEQ ID NO:15)	FQ <u>F</u> SGYPFT (SEQ ID NO: 16)
p12f2	SEQ ID NO: 17	<u>T</u> PGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWDDKK <u>H</u> YNPSL <u>KD</u> (SEQ ID NO:19)	<u>D</u> MIFN <u>F</u> YFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO: 21	<u>SLSSR</u> VGVMH (SEQ ID NO:22)	DT <u>FY</u> LSS (SEQ ID NO:23)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
p12f4	SEQ ID NO: 24	<u>T</u> PGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWWD <u>GKKH</u> YNPSL <u>KD</u> (SEQ ID NO:25)	<u>D</u> MIFN <u>F</u> YFDW (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO: 26	<u>SLSSR</u> VGVMH (SEQ ID NO:22)	DT <u>RGL</u> PS (SEQ ID NO:27)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
p1ld4	SEQ ID NO: 28	<u>T</u> PGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWWD <u>GKKH</u> YNPSL <u>KD</u> (SEQ ID NO:25)	<u>D</u> MIFNWYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO: 30	<u>SPSSR</u> VGVMH (SEQ ID NO:31)	DT <u>M</u> RLAS (SEQ ID NO:32)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
Ale109	SEQ ID NO: 33	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWD <u>GKKH</u> YNPSL <u>KD</u> (SEQ ID NO:25) (SEQ ID NO:29)	<u>D</u> MIFNWYFDV	SEQ ID NO: 34	<u>SLSSR</u> VGVMH (SEQ ID NO:22)	DT <u>F</u> KL <u>S</u> S (SEQ ID NO:35)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
A12a6	SEQ ID NO: 36	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWD <u>GKK</u> DYNPSL <u>KD</u> (SEQ ID NO:37)	<u>D</u> MIFN <u>F</u> YFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO: 38	<u>SASSR</u> VGVMH (SEQ ID NO:39)	DT <u>F</u> KL <u>S</u> S (SEQ ID NO:35)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
A13c4	SEQ ID NO: 40	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWD <u>GKK</u> <u>S</u> YNPSL <u>KD</u> (SEQ ID NO:41)	<u>D</u> MIFN <u>F</u> YFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO: 42	<u>SLSSR</u> VGVMH (SEQ ID NO:22)	DT <u>MY</u> OSS (SEQ ID NO:43)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)

A17d4	SEQ ID NO: 44	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKK <u>S</u> YNPSLK <u>D</u> (SEQ ID NO:45)	<u>D</u> MIF <u>N</u> FYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO: 46	<u>L</u> PSSRVGYMH (SEQ ID NO:47)	DT <u>M</u> YQSS (SEQ ID NO:43)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
Anticorpos anti-RSV								
Nome do anti- corpo	Do- mí- nio VH	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH	Do- mí- nio VL	CDR1 de VL	CDR2 de VL	CDR3 de VL
A4B4	SEQ ID NO: 48	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKK <u>H</u> YNPSLK <u>D</u> (SEQ ID NO:19)	<u>D</u> MIF <u>N</u> FYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO: 49	<u>S</u> ASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DT <u>F</u> FLDS (SEQ ID NO:50)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
A8C7	SEQ ID NO: 51	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKK <u>S</u> YNPSLK <u>D</u> (SEQ ID NO:45)	<u>D</u> MIF <u>N</u> WYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO: 52	<u>S</u> PSSRVGYMH (SEQ ID NO:31)	DT <u>R</u> YQSS (SEQ ID NO:53)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
IX- 493L1FR	SEQ ID NO: 7	TSGMSVG (SEQ ID NO:1)	DIWWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	SMITN <u>W</u> YFDV (SEQ ID NO:3)	SEQ ID NO: 54	<u>S</u> ASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
H3-3F4	SEQ ID NO: 55	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	<u>D</u> MIF <u>N</u> WYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO: 56	<u>S</u> ASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DT <u>F</u> KLAS (SEQ ID NO:15)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
M3H9	SEQ ID NO: 55	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	<u>D</u> MIF <u>N</u> WYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO: 124	<u>S</u> ASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DT <u>Y</u> KQTS (SEQ ID NO:57)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
Y10H6	SEQ ID NO: 55	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	<u>D</u> MIF <u>N</u> WYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO: 58	<u>S</u> ASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DT <u>R</u> YLS (SEQ ID NO:59)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
DG	SEQ ID NO: 78	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	<u>D</u> MIT <u>N</u> FYFDV (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO: 56	<u>S</u> ASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DT <u>F</u> KLAS (SEQ ID NO:15)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)
AFFF (I)	SEQ ID NO: 9	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	<u>S</u> MIT <u>N</u> FYFDV (SEQ ID NO:12)	SEQ ID NO: 60	<u>S</u> ASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DT <u>F</u> KLAS (SEQ ID NO:15)	FQGS ~~F~~ YPFT (SEQ ID NO:61)
6H8	SEQ ID NO:	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	<u>D</u> MIT <u>N</u> FYFDV (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO:	<u>S</u> ASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DT <u>F</u> KLT (SEQ ID NO:63)	FQGS ~~G~~ YPFT (SEQ ID NO:6)

	78				62			
LI-7E5	SEQ ID NO: 78	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	<u>D</u> MITN <u>F</u> YFDV (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO: 64	<u>S</u> ASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DT <u>F</u> KLAS (SEQ ID NO:15)	FQGSQYPFT (SEQ ID NO:6)
Anticorpos anti-RSV								
Nome do anti- corpo	Do- mí- nio VH	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH	Do- mí- nio VL	CDR1 de VL	CDR2 de VL	CDR3 de VL
L215B10	SEQ ID NO: 78	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	<u>D</u> MITN <u>F</u> YFDV (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO: 65	<u>S</u> ASSRVGYMH (SEQ ID NO:14)	DT <u>F</u> RLAS (SEQ ID NO:66)	FQGSQYPFT (SEQ ID NO:6)
A13A11	SEQ ID NO: 67	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKK <u>H</u> YNPSL <u>KD</u> (SEQ ID NO:19)	<u>D</u> MIFN <u>F</u> YFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO: 68	<u>S</u> PSSRVGYMH (SEQ ID NO:31)	DT <u>Y</u> RHSS (SEQ ID NO:69)	FQGSQYPFT (SEQ ID NO:6)
A1H5	SEQ ID NO: 70	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKK <u>G</u> KK <u>H</u> YNPSL <u>KD</u> (SEQ ID NO:25)	<u>D</u> MIFN <u>F</u> YFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO: 71	<u>S</u> LSSRVGYMH (SEQ ID NO:72)	DTFFHRS (SEQ ID NO:73)	FQGSQYPFT (SEQ ID NO:6)
A4B4 (1)	SEQ ID NO: 48	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKK <u>H</u> YNPSL <u>KD</u> (SEQ ID NO:19)	<u>D</u> MIFN <u>F</u> YFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO: 74	<u>S</u> ASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DT <u>L</u> L <u>L</u> IDS (SEQ ID NO:75)	FQGSQYPFT (SEQ ID NO:6)
A4B4L1F RS28R	SEQ ID NO: 48	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKK <u>H</u> YNPSL <u>KD</u> (SEQ ID NO:19)	<u>D</u> MIFN <u>F</u> YFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO: 11	<u>S</u> ASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	FQGSQYPFT (SEQ ID NO:6)
A4B4- F52S	SEQ ID NO: 48	<u>T</u> AGMSVG (SEQ ID NO: 10)	DIWWDDKK <u>H</u> YNPSL <u>KD</u> (SEQ ID NO:19)	<u>D</u> MIFN <u>F</u> YFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO: 76	<u>S</u> ASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DT <u>S</u> <u>F</u> L <u>I</u> DS (SEQ ID NO:77)	FQGSQYPFT (SEQ ID NO:6)

De acordo com outras formas de realização, o anticorpo é uma anticorpo modificado anti- $\alpha_v\beta_3$, de preferência um anticorpo Vitaxin (ver as publicações PCT com o n°s WO 98/33919 e WO 00/78815, ambas da autoria de Huse et al.).

As IgG modificadas da presente invenção, que possuem períodos de semivida mais longos do que as de tipo selvagem, também podem compreender as IgG cujos locais

bioactivos, tais como os locais de ligação do antigénio, locais de ligação do receptor de Fc ou locais de ligação do complemento, sejam modificados por técnicas de manipulação genética, para aumentar ou reduzir tais actividades, comparativamente com as de tipo selvagem.

A modificação destes e de outros anticorpos terapêuticos, para aumentar o período de semivida *in vivo*, permite fazer a administração de doses eficazes inferiores e/ou doseamentos de menor frequência do anticorpo terapêutico. Tal modificação para aumentar o período de semivida *in vivo* também pode ser útil para melhorar as imunoglobulinas de diagnóstico e ainda, por exemplo, para permitir a administração de doses menores para se conseguir uma sensibilidade de diagnóstico suficiente.

A presente invenção proporciona também proteínas de fusão que compreendem uma molécula bioactiva e/ou um domínio constante de IgG (de preferência humano) em que há uma ou várias modificações (isto é, substituições, deleções ou inserções) nos resíduos aminoácidos identificados por estarem implicados na interacção entre a região de Fc-charneira e o receptor FcRn. Em particular, a presente invenção proporciona proteínas de fusão que compreendem uma molécula bioactiva fundida de forma recombinante ou conjugada quimicamente (incluindo as conjugações de tipo covalente e de tipo não covalente) com um domínio constante de IgG que compreende um domínio CH2 humano em que há uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 251-256, 285-290 e/ou nos resíduos aminoácidos 308-314, e/ou com um domínio CH3 em que há uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 385-389 e/ou 428-436, em particular uma ou várias das substituições de aminoácidos descritas

anteriormente. A fusão de uma molécula bioactiva com um domínio constante, ou com um seu fragmento, com uma ou várias das modificações referidas aumenta o período de semivida da molécula bioactiva *in vivo*.

De acordo com uma forma de realização preferencial, as proteínas de fusão da invenção compreendem uma molécula bioactiva fundida por via recombinante ou conjugada quimicamente com um domínio constante de IgG que compreende um domínio CH2 humano em que há uma ou várias substituições de resíduos aminoácidos nas posições dos resíduos aminoácidos 251-256, 285-290 e/ou dos resíduos aminoácidos 308-314 e/ou com um domínio CH3 em que há uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 385-389 e/ou 428-436. Em determinadas formas de realização, uma proteína de fusão compreende um domínio constante de uma IgG que compreende um domínio CH2 humano de uma molécula de IgG em que os resíduos aminoácidos 253, 310 e 313 não são modificados. De acordo com outras formas de realização, uma proteína de fusão compreende um domínio CH3 de uma molécula de IgG em que os resíduos aminoácidos 388, 429, 430, 431, 432 e 435 não são modificados.

Uma molécula bioactiva pode ser qualquer polipeptido ou fármaco sintético conhecido por um especialista na matéria. De preferência, uma molécula bioactiva é um polipeptido que possui pelo menos 5, de preferência pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90 ou pelo menos 100 resíduos aminoácidos. Como exemplos de polipeptidos bioactivos refere-se, mas sem nenhuma limitação, diversos tipos de anticorpos, citocinas (v.g., IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12,

IL-15, IFN- γ , IFN- α e IFN- β), moléculas de adesão celular (v.g., CTLA4, CD2 e CD28), ligandos (v.g., TNF- α , TNF- β , e um factor antiangiogénico, tal como a endostatina), receptores, anticorpos e factores de crescimento (v.g., PDGF, EGF, NGF e KGF).

Uma molécula bioactiva também pode ser um radical terapêutico, tal como uma citotoxina (v.g., um agente citostático ou citocida), um agente terapêutico ou um elemento radioactivo (v.g., emissores α , emissores γ , etc.). Como exemplos de agentes citostáticos ou citocidas refere-se, mas sem nenhuma limitação, os seleccionados entre paclitaxol, citochalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, di-hidroxi-antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrottestosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puomicina e seus análogos ou homólogos. Os agentes terapêuticos compreendem, mas sem nenhuma limitação, antimetabolitos (v.g., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-decarbазina), agentes alquilantes (v.g., mecloretamina, tioepa-clorambucil, melfalano, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cisdiclorodiamina-platina (II) (DDP) (cisplatina), antraciclinas (v.g., daunorubicina (outrora daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (v.g., dactinomicina (outrora actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes antimitóticos (v.g., vincristina e vinblastina).

A presente invenção também proporciona polinucleótidos que compreendem uma sequência nucleotídica que codifica uma IgG modificada da presente invenção e seus fragmentos que

tenham os locais modificados de ligação do FcRn com maior afinidade e os vectores que compreendem tais polinucleótidos. Além disso, a invenção abrange os polinucleótidos que hibridam em condições restritivas, ou em condições de hibridação de menor restritância, com polinucleótidos que codificam a IgG modificadas da presente invenção.

A sequência nucleotídica das IgG modificadas e os polinucleótidos que as codificam podem ser obtidos por quaisquer métodos conhecidos na especialidade, incluindo o método geral de sequenciação de ADN, por exemplo, o método de terminação de cadeia didesoxi (sequenciação de Sanger) e o tratamento preparatório de oligonucleótidos em combinação com a PCR, respectivamente.

5.2. IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NA REGIÃO DE FC-CHARNEIRA DE MOLÉCULAS DE IMUNOGLOBULINA

É possível introduzir uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e 428-436 do domínio constante, recorrendo a qualquer técnica conhecida pelos especialistas na matéria. O domínio constante, ou um seu fragmento, em que haja uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e 428-436 pode ser pesquisado, por exemplo, por meio de uma análise de ligação para identificar esse domínio constante, ou um seu fragmento, com maior afinidade para com o receptor FcRn (v.g., conforme descrito na secção 5.11, *infra*). Tais modificações no domínio de Fc-charneira, ou nos seus fragmentos, que aumentam a afinidade do domínio constante, ou dos seus fragmentos, para com o receptor FcRn,

podem ser introduzidas em anticorpos para aumentar os períodos de semivida dos referidos anticorpos *in vivo*. Mais ainda, tais modificações do domínio constante, ou nos seus fragmentos, que aumentam a afinidade do domínio constante, ou dos seus fragmentos, para com o receptor FcRn podem ser fundidas com moléculas bioativas para aumentar os períodos de semivida das referidas moléculas bioativas *in vivo* (e alterar, preferencialmente (aumentar ou diminuir), a biodisponibilidade da molécula, por exemplo, para aumentar ou diminuir o transporte para as superfícies das mucosas (ou para outros tecidos destinatários) (v.g., os pulmões)

5.2.1. MUTAGÉNESE

A mutagénese pode ser executada em conformidade com quaisquer técnicas conhecidas na especialidade, incluindo, mas sem nenhuma limitação, a síntese de um oligonucleótido em que haja uma ou várias modificações na sequência do domínio constante de um anticorpo, ou de um seu fragmento (v.g., os domínios CH2 ou CH3), que se pretenda modificar. A mutagénese específica do local permite a produção de mutantes mediante a utilização de sequências oligonucleotídicas específicas que codificam a sequência de ADN da mutação desejada, bem como de um número suficiente de nucleótidos adjacentes, para proporcionar uma sequência iniciadora com um comprimento suficiente e com uma complexidade sequencial para formar um duplex estável em ambos os lados da junção de deleção em causa. Tipicamente, é preferível uma sequência iniciadora com um comprimento entre cerca de 17 e cerca de 75 nucleótidos, ou mais, que tenha entre cerca de 10 e cerca de 25 ou mais resíduos nos

dois lados da junção da sequência que se pretende alterar. É possível utilizar diversas dessas sequências iniciadoras, introdutoras de um conjunto de diferentes mutações em uma ou várias posições, para gerar uma biblioteca de mutantes.

A técnica da mutagénese específica do local é perfeitamente conhecida na especialidade, tal como exemplificado em diversas publicações (ver, v.g., Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, 154:367-82, 1987). Em geral, a mutagénese dirigida ao local é realizada obtendo, em primeiro lugar, um vector de cadeia singular, ou fundindo separadamente as duas cadeias de um vector de cadeia dupla que contenha dentro da sua sequência uma sequência de ADN que codifique o péptido desejado. Prepara-se um iniciador oligonucleotídico, portador da desejada sequência mutacionada, geralmente por via sintética. O iniciador é depois recombinado com o vector de cadeia singular e é submetido à acção de enzimas polimerizadoras de ADN, tais como a polimerase do ADN de T7, com o intuito de se fazer completar a síntese da cadeia portadora da mutação. Deste modo, forma-se um heteroduplex em que uma cadeia codifica a sequência original não mutacionada e a outra cadeia é portadora da mutação desejada. Este vector heteroduplex é depois utilizado para transformar ou transfectar células adequadas, tais como as células de *E. coli*, sendo seleccionados os clones que contenham os vectores recombinantes portadores dos elementos com a sequência mutacionada. Faz-se observar que esta técnica utiliza, tipicamente, um vector bacteriófago que existe quer sob a forma de cadeia singular quer sob a forma de cadeia dupla. Os vectores típicos, úteis em mutagénese dirigida ao local, compreendem os vectores tais como o bacteriófago M13. Estes bacteriófagos estão disponíveis nos circuitos comerciais e a

sua utilização é geralmente bem conhecida pelos especialistas na matéria. Os plasmídeos de cadeia dupla também são vulgarmente utilizados em mutagénese dirigida ao local, o que permite eliminar o passo de transferência do gene relevante de um plasmídeo para um bacteriófago.

Em alternativa, é possível recorrer à PCR™ com enzimas termoestáveis, existentes nos circuitos comerciais, tais como a polimerase de ADN de *Taq*, para incorporar um iniciador oligonucleotídico mutagénico num fragmento de ADN amplificado que possa ser depois clonado num vector de expressão ou de clonagem adequado. Ver, *v.g.*, Tomic *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 18(6):1656, 1987, e Upender *et al.*, *Biotechniques*, 18(1):29-30, 32, 1995, for PCR™ - mediated mutagenesis procedures. A técnica de PCR™, em que se utiliza uma ligase termoestável conjuntamente com uma polimerase termoestável, também pode ser utilizada para incorporar um oligonucleótido mutagénico fosforilado num fragmento de ADN amplificado que possa ser depois clonado num vector de expressão ou de clonagem adequado (ver, *v.g.*, Michael, *Biotechniques*, 16(3):410-2, 1994).

É possível utilizar outros métodos conhecidos pelos especialistas na matéria para a produção de variantes de sequências do domínio Fc de um anticorpo ou de um seu fragmento, Por exemplo, é possível tratar vectores recombinantes, que codifiquem a sequência de aminoácidos do domínio constante de um anticorpo, ou de um seu fragmento, com agentes mutagénicos, tais como hidroxilamina, para se obter variantes de sequências.

5.2.2. PANNING

É possível pesquisar vectores, em particular, bacteriófagos, em que tenha lugar a expressão dos domínios constantes, ou seus fragmentos, em que haja uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e/ou 428-436, para identificar os domínios constantes, ou seus fragmentos, que tenham uma maior afinidade para com o FcRn para seleccionar e isolar os ligadores de mais elevada afinidade, a partir de uma população de bacteriófagos. As imunoanálises que é possível efectuar para analisar a ligação do domínio constante, ou seus fragmentos, em que haja uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e/ou 428-436, ao FcRn compreendem, mas sem nenhuma limitação, as radioimunoanálises, ELISA (ensaio imunoenzimático), imunoanálises em "sanduíche" e as imunoanálises fluorescentes. Tais procedimentos de análise são vulgares e perfeitamente conhecidos na especialidade (ver, v.g., Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Descreve-se aqui, mais adiante e de forma abreviada, imunoanálises exemplificativas, mas sem que isso constitua qualquer limitação. Também é possível utilizar a análise cinética 'BIAcore' para se determinar os parâmetros de velocidade de ligação, ou de dissociação, de um domínio constante, ou de um seu fragmento, em que haja uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e/ou 428-436, ao FcRn. A análise cinética 'BIAcore' consiste em analisar a ligação e a dissociação de um domínio constante, ou de um seu fragmento, em que haja uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e/ou 428-436 a partir de microplacas com os FcRn

imobilizados sobre a sua superfície (ver a secção 5.1 e a secção dos exemplos, *infra*).

5.2.3. SEQUENCIACÃO

É possível recorrer a um conjunto de reacções de sequenciação, conhecidas na especialidade, para sequenciar directamente a sequência de nucleótidos que codifica os domínios constantes, ou seus fragmentos, em que haja uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e/ou 428-436. Como exemplos de reacções de sequenciação refere-se os que se baseiam nas técnicas desenvolvidas por Maxim e Gilbert (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:560, 1977) ou por Sanger (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463, 1977). Também está previsto que possam ser utilizados todos os procedimentos automáticos de sequenciação (Bio/Techniques, 19:448, 1995), incluindo a sequenciação por espectrometria de massa (ver, v.g., a publicação PCT com o nº WO 94/16101, Cohen *et al.*, Adv. Chromatogr., 36:127-162, 1996, e Griffin *et al.*, Appl. Biochem. Biotechnol., 38:147-159, 1993).

5.3. MÉTODOS RECOMBINANTES PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Os anticorpos da invenção, ou os seus fragmentos, podem ser produzidos por meio de qualquer método conhecido na especialidade para a síntese de anticorpos, em particular por síntese química ou então, preferencialmente, por meio de técnicas de expressão recombinante.

A sequência de nucleótidos que codificam o anticorpo pode ser obtida a partir de toda a informação facultada aos

especialistas na matéria (isto é, a partir do Genbank, na literatura ou por clonagem rotineira). Se um clone que contenha um ácido nucleico que codifica um anticorpo particular, ou um seu fragmento de ligação ao epítopo, não estiver disponível, mas se a sequência da molécula de anticorpo, ou do seu fragmento de ligação ao epítopo, for conhecida, é possível sintetizar quimicamente um ácido nucleico que codifica a imunoglobulina ou é possível obtê-lo a partir de uma fonte adequada (v.g., a partir de uma biblioteca de ADNc de anticorpos ou a partir de uma biblioteca de ADNc gerado a partir de ácido nucleico, de preferência ARN poli A+, isolado a partir de quaisquer tecidos ou células em que tenha lugar a expressão do anticorpo, tais como as células de hibridoma seleccionadas para a expressão de um anticorpo), por amplificação por PCR, utilizando iniciadores sintéticos que possam ser hibridados nas extremidades 3' e 5' da sequência, ou por clonagem, utilizando uma sonda oligonucleotídica específica para a sequência do gene particular, para se identificar, v.g., um clone de ADNc a partir de uma biblioteca de ADNc que codifique o anticorpo. Os ácidos nucleicos amplificados, gerados por PCR, podem ser então clonados em vectores de clonagem replicáveis, praticando qualquer método perfeitamente conhecido na especialidade.

Depois de determinada a sequência de nucleótidos do anticorpo, essa sequência de nucleótidos do anticorpo pode ser manipulada, utilizando métodos perfeitamente conhecidos na especialidade para a manipulação de sequências de nucleótidos, v.g., as técnicas de ADN recombinante, a mutagénese dirigida ao local, PCR, etc. (ver, por exemplo, as técnicas descritas por Sambrook et al., 1990, Molecular

Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; e Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para gerar anticorpos que tenham uma sequência de aminoácidos diferente, por exemplo, mediante a introdução de substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos nas regiões dos anticorpos nas quais se encontra o domínio de ligação dos epítomos e, preferencialmente, nas regiões de Fc-charneira dos anticorpos que estão implicados na interação com o FcRn. De acordo com uma forma de realização preferencial, são gerados anticorpos em que há uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e 428-436.

A expressão recombinante de um anticorpo exige a construção de um vector de expressão que contenha uma sequência de nucleótidos que codifique o anticorpo. Depois de se obter uma sequência de nucleótidos que codifique uma molécula de anticorpo ou uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou uma parte sua (de preferência, mas não necessariamente, que contenha a região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve), o vector para a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido por meio de tecnologia de ADN recombinante, recorrendo a técnicas perfeitamente conhecidas na especialidade. Assim, são aqui descritos métodos para a preparação de uma proteína mediante a expressão de um polinucleótido que contenha uma sequência de nucleótidos que codifique um anticorpo. É possível utilizar métodos perfeitamente conhecidos pelos especialistas na matéria para a construção de vectores de expressão que contenham sequências codificadoras de

anticorpos e sinais adequados de controlo transcricional e traducional. Estes métodos compreendem, por exemplo, as técnicas de ADN recombinante *in vitro*, as técnicas sintéticas e a recombinação genética *in vivo*. Deste modo, a invenção proporciona vectores replicáveis que compreendem uma sequência de nucleótidos que codificam a região constante da molécula de anticorpo em que há uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos implicados na interacção com o FcRn (ver, v.g., a publicação PCT com o nº WO 86/05807; a publicação PCT com o nº WO 89/01036; e a patente de invenção norte-americana nº 5 122464). A sequência de nucleótidos que codifica a região variável de cadeia pesada, a região variável de cadeia leve, ambas as regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve, ou um fragmento da região variável de cadeia pesada e/ou de cadeia leve para ligação ao epítipo, uma ou várias regiões determinantes da complementaridade (CDR) de um anticorpo, pode ser clonada em tal vector para expressão.

O vector de expressão é transferido para uma célula hospedeira por meio de técnicas convencionais e as células transfectadas são depois criadas em cultura por meio de técnicas convencionais para a produção de um anticorpo que tenha uma maior afinidade para com o FcRn e um maior período de semivida *in vivo*. Assim, a invenção compreende células hospedeiras que contêm um polinucleótido que codifica um anticorpo, um domínio constante em que há uma ou várias modificações nos resíduos aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 e/ou 428-436, de preferência funcionalmente ligado a um promotor heterólogo.

É possível utilizar diversos sistemas de tipo hospedeiro-vector de expressão para que tenha lugar a

expressão de moléculas de anticorpo da invenção. Tais sistemas hospedeiro-vector de expressão representam veículos pelos quais as sequências codificadoras relevantes podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas representam também células em que pode ter lugar a expressão, quando transformadas ou transfectadas com as sequências de nucleótidos codificadoras, de uma molécula de anticorpo da invenção *in situ*. Tais sistemas compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, microrganismos tais como bactérias (v.g., *E. coli* e *B. subtilis*) transformadas com o ADN recombinante do bacteriófago, vectores de expressão de ADN plasmídico ou de ADN cosmídico que contenham sequências codificadoras de anticorpos; leveduras (v.g., *Saccharomyces* e *Pichia*) transformadas com vectores recombinantes de expressão de leveduras que contenham sequências codificadoras de anticorpos; sistemas de células de insectos infectadas com vectores recombinantes de expressão viral (v.g., baculovírus) que contenham sequências codificadoras de anticorpos; sistemas de células de plantas infectadas com vectores recombinantes de expressão viral (v.g., vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; e vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformadas com vectores recombinantes de expressão plasmídica (v.g., o plasmídeo Ti) que contenham sequências codificadoras de anticorpos; e sistemas de células de mamíferos (v.g., células COS, CHO, BHK, 293, 3T3 e NSO) que albergam construções de expressão recombinante que contêm promotores provenientes do genoma das células de mamífero (v.g., o promotor metalotioneína) ou a partir de vírus de mamíferos (v.g., o promotor final de adenovírus, o promotor de vírus de vacínia de 7,5K). De preferência, são

utilizadas células bacterianas, tais como as de *Escherichia coli*, e mais preferencialmente células eucarióticas, especialmente para a expressão da molécula de anticorpo recombinante inteiro, para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante. Por exemplo, as células de mamíferos, tais como as células de ovário de criceto chinês (CHO), em conjunto com um vector, tal como o elemento promotor principal do gene inicial intermédio, proveniente do citomegalovírus humano, constituem um sistema de expressão eficaz para os anticorpos (Foecking et al., Gene, 45:101, 1986, e Cockett et al., Bio/Technology, 8:2, 1990).

Em sistemas bacterianos é possível seleccionar, vantajosamente, diversos vectores de expressão, consoante a utilização prevista para a molécula de anticorpo que irá ser expressa. Por exemplo, no caso de se pretender produzir uma grande quantidade de tal proteína, para a preparação de composições farmacêuticas de uma molécula de anticorpo, podem ser eventualmente desejáveis vectores que comandem a expressão de níveis elevados de produtos de proteínas de fusão que são facilmente purificados. Tais vectores compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, o vector pUR278 de expressão em *E. coli* (Ruther et al., EMBO, 12:1791, 1983), em que a sequência que codifica o anticorpo pode ser ligada individualmente ao vector de forma concatenada com a região de codificação lacZ, sendo assim produzida uma proteína de fusão; e os vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109, 1985 and Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem., 24:5503-5509, 1989).

Num sistema de insectos utiliza-se o vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como

vector para expressar genes exógenos. O vírus desenvolve-se em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência que codifica o anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais (por exemplo, o gene da poliedrina) do vírus e pode ser colocada sob o controle de um promotor de AcNPV (por exemplo, o promotor de poliedrina).

Em células hospedeiras de mamíferos é possível utilizar diversos sistemas de expressão de base viral para expressar uma molécula de um anticorpo da invenção. Nos casos em que se utiliza um adenovírus como vector de expressão, a sequência relevante que codifica o anticorpo pode ser ligada a um complexo de controlo adenoviral de transcrição/tradução, *v.g.*, o promotor final e a sequência líder tríplice. O gene quimérico pode ser inserido depois no genoma adenoviral por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção numa região não essencial do genoma viral (*v.g.*, as regiões E1 ou E3) irá ter como resultado um vírus recombinante que é viável e que consegue realizar a expressão da molécula de anticorpo em hospedeiros infectados (*v.g.*, ver Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:355-359, 1984). Eventualmente, também podem ser necessários sinais específicos de iniciação para que haja uma tradução eficiente das sequências codificadoras do anticorpo inserido. Estes sinais compreendem o sinal de iniciação ATG e as sequências adjacentes. Além disso, o códon de iniciação tem de estar em fase com a grelha de leitura da sequência codificadora desejada, para garantir a tradução de toda a inserção. Estes sinais exógenos de controlo traducional e os codões de iniciação podem ser provenientes de diversas origens, tanto naturais como sintéticas. É possível aumentar a eficiência da expressão

mediante a inclusão de elementos apropriados intensificadores da transcrição, terminadores da transcrição, etc. (ver, v.g., Bitter et al., *Methods in Enzymol.*, 153:516-544, 1987).

Além disso, é possível escolher uma estirpe de células hospedeiras que modulem a expressão das sequências do anticorpo, ou que modifiquem ou façam o processamento do anticorpo da maneira específica desejada. Tais modificações (v.g., glicosilação) e processamento (v.g., clivagem) de produtos proteicos podem ser importantes para a actividade do anticorpo. Há diferentes células hospedeiras que têm mecanismos característicos e específicos para o processamento pós-traducional e para a modificação de proteínas e produtos génicos. É possível escolher linhagens celulares e sistemas hospedeiros convenientes para garantir a modificação e o processamento correctos do anticorpo expresso. Para tal, é possível utilizar células hospedeiras eucarióticas que possuam a maquinaria celular para o processamento correcto do transcrito primário, para a glicosilação e para a fosforilação do produto génico. Tais células hospedeiras de mamíferos compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, as células de CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138 e, em particular, as células de mieloma, tais como as células NS0, e linhagens de células congéneres; ver, por exemplo, Morrison et al., patente de invenção norte-americana nº 5 807 715.

Para uma produção de anticorpos recombinantes, de longo prazo e com elevado rendimento, é preferível uma expressão estável. Por exemplo, as linhagens de células que expressam de forma estável a molécula de anticorpo podem ser manipuladas por engenharia genética. Em vez de se utilizar vectores de expressão que contenham origens de replicação

virais, é possível transformar células hospedeiras com ADN controlado por elementos adequados de controlo de expressão (v.g., promotores, intensificadores, sequências, terminadores de transcrição, locais de poliadenilação, etc.), e com um marcador seleccionável. A seguir à introdução do ADN exógeno, as células geneticamente manipuladas podem ficar a desenvolver-se durante 1-2 dias num meio enriquecido, sendo depois transferidas para um meio selectivo. O marcador seleccionável, no plasmídeo recombinante, confere resistência à selecção e permite que as células integrem, de forma estável, o plasmídeo nos seus cromossomas e se desenvolvam para formarem focos que podem, por sua vez, ser clonados e expandidos em linhagens celulares. Este método pode ser utilizado, vantajosamente, para manipular linhagens de células em que tenha lugar a expressão da molécula de anticorpo. Tais linhagens de células geneticamente manipuladas podem ser particularmente úteis para pesquisar e avaliar composições que interactuem directa ou indirectamente com a molécula de anticorpo.

É possível utilizar diversos sistemas de selecção, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os sistemas constituídos por vírus do herpes simplex e timidina-cinase (Wigler et al., Cell, 11:223, 1977), hipoxantina-guanina e fosforribosiltransferase (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:202, 1992) e adenina e fosforribosiltransferase (Lowy et al., Cell, 22:8-17, 1980), em que tais genes podem ser utilizados correspondentemente em células tk^- , $hgpert^-$ ou $aprt^-$. Além disso, também é possível utilizar a resistência aos antimetabolitos como base de selecção para os genes seguintes: *dhfr*, que confere resistência ao metotrexato

(Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA, 77:357, 1980 e O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527, 1981); *gpt*, que confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072, 1981); *neo*, que confere resistência ao aminoglicósido G-418 (Wu and Wu, Biotherapy, 3:87-95, 1991; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:573-596, 1993; Mulligan, Science, 260:926-932, 1993; e Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62: 191-217, 1993; e May, TIB TECH, 11(5):155-215, 1993); e *hygro*, que confere resistência à higromicina (Santerre et al., Gene, 30:147, 1984). É possível aplicar métodos vulgarmente conhecidos na especialidade da tecnologia do ADN recombinante para seleccionar o clone recombinante desejado, estando tais métodos descritos, por exemplo, nas obras de Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; nos capítulos 12 e 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY; e Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1, 1981, considerando-se todas elas aqui integralmente incorporadas por referência.

Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem ser aumentados por amplificação vectorial (para uma leitura elucidativa, ver Bebbington and Hentschel, 1987, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. Academic Press, New York). Se um marcador do sistema vectorial que expressa o anticorpo for amplificável, um aumento do nível de inibidor presente na cultura de células hospedeiras irá aumentar o número de

cópias do gene marcador. Uma vez que a região amplificada está associada ao gene do anticorpo, a produção do anticorpo também irá aumentar (Crouse et al., Mol., Cell. Biol., 3:257,1983).

A célula hospedeira pode ser co-transfectada com dois vectores de expressão da invenção, em que o primeiro vector codifica um polipeptido derivado da cadeia pesada e o segundo vector codifica um polipeptido derivado da cadeia leve. Os dois vectores podem conter marcadores seleccionáveis idênticos que possibilitem uma expressão igual de polipeptidos de cadeia pesada e de cadeia leve, ou marcadores seleccionáveis diferentes, para garantir a manutenção dos dois plasmídeos. Em alternativa, é possível utilizar um só vector que codifique, e seja capaz de expressar, ambos os polipeptidos de cadeia pesada e de cadeia leve. Em tais situações, a cadeia leve deve ser colocada antes da cadeia pesada para se evitar um excesso de cadeia pesada tóxica livre (Proudfoot, Nature, 322:52, 1986; e Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2 197, 1980). As sequências codificadoras para as cadeias pesada e leve podem compreender ADNc ou ADN genómico.

Depois de ter sido produzida uma molécula de anticorpo da invenção por expressão recombinante, é possível purificá-la por meio de qualquer método conhecido na especialidade para a purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (v.g., cromatografia de permuta de iões, de afinidade, em particular por afinidade para com o antigénio específico após a purificação de proteína A, e cromatografia em coluna de exclusão dimensional), por centrifugação, pela solubilidade diferencial ou por meio de quaisquer outras

técnicas convencionais para a purificação de proteínas. Além do mais, os anticorpos da presente invenção, ou os seus fragmentos, podem ser fundidos com sequências polipeptídicas heterólogas aqui descritas ou de algum modo conhecidas na especialidade, para facilitar a purificação.

5.3.1. CONJUGADOS DE ANTICORPOS

A presente invenção diz respeito a anticorpos fundidos por via recombinante ou conjugados quimicamente (incluindo as conjugações de tipo covalente e de tipo não covalente) com polipeptidos heterólogos (isto é, um polipeptido não conotado com eles; ou uma parte sua, que tenha pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90 ou pelo menos 100 aminoácidos do polipeptido) para geração de proteínas fundidas. A fusão não tem necessariamente de ser directa, podendo ocorrer através de sequências ligadoras. Os anticorpos fundidos ou conjugados com polipeptidos heterólogos também podem ser utilizados em imunoanálises *in vitro* e em métodos de purificação, em conformidade com preceitos conhecidos na especialidade. Ver, *v.g.*, a publicação PCT com o nº WO 93/21232; o documento EP 439 095; Naramura *et al.*, Immunol. Lett., 39:91-99, 1994; a patente de invenção norte-americana nº 5 474 981; Gillies *et al.*, PNAS, 89:1428-1432, 1992; e Fell *et al.*, J. Immunol., 146:2446-2452, 1991.

Os anticorpos podem ser fundidos com sequências marcadoras, tais como um péptido, para facilitar a purificação. Em formas de realização preferenciais, a sequência de aminoácidos marcadora é um péptido de hexa-

histidina, tal como o identificador associado a um vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre outros, muitos dos quais estão disponíveis nos circuitos comerciais. Conforme descrito por Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, 1989, por exemplo, o péptido de hexa-histidina propicia uma purificação conveniente da proteína de fusão. Outros identificadores peptídicos, úteis para a purificação, compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, o identificador hemaglutinina "HA", que corresponde a um epítopo derivado da proteína hemaglutinina da gripe (Wilson et al., Cell, 37:767 1984) e o identificador "flag" (Knappik et al., Biotechniques, 17(4):754-761, 1994).

A presente invenção também diz respeito a anticorpos conjugados com um agente de diagnóstico ou terapêutico ou com qualquer outra molécula para a qual seja desejável aumentar o seu período de semivida *in vivo*. Os anticorpos podem ser utilizados como elementos de diagnóstico, por exemplo, para monitorizar o desenvolvimento ou a progressão de uma doença, patologia ou infecção, enquanto parte de um procedimento de testes clínicos, v.g., para determinação da eficácia de um dado regime de tratamento. A detecção pode ser facilitada acoplando o anticorpo a uma substância detectável. Como exemplos de substâncias detectáveis refere-se diversas enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioactivos, metais emissores de positrões e iões de metais paramagnéticos não radioactivos. A substância detectável pode ser acoplada ou conjugada, quer directamente ao anticorpo quer indirectamente, através de um intermediário (por exemplo, um

ligador conhecido na especialidade), utilizando técnicas conhecidas na especialidade. Ver, por exemplo, a patente de invenção norte-americana nº 4 741 900 para iões de metais que podem ser conjugados com anticorpos para fins de diagnóstico de acordo com a presente invenção. Como exemplos de enzimas convenientes refere-se a peroxidase de *Armoracia rusticana*, fosfatase alcalina, β -galactosidase ou acetilcolinesterase; como exemplos de complexos de grupos prostéticos convenientes refere-se os de estreptavidina/biotina e de avidina/biotina; como exemplos de materiais fluorescentes convenientes refere-se os seleccionados entre umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; como exemplo de um material luminescente refere-se o luminol; como exemplos de materiais bioluminescentes refere-se a luciferase, a luciferina e a equorina; e como exemplos de materiais radioactivos convenientes refere-se ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In ou ^{99m}Tc .

Um anticorpo pode ser conjugado com um radical terapêutico, tal como uma citotoxina (v.g., um agente citostático ou citocida), um agente terapêutico ou um elemento radioactivo (v.g., emissores α , emissores γ , etc.). As citotoxinas ou agentes citotóxicos compreendem qualquer agente que seja detrimental para as células. Como exemplos refere-se os seleccionados entre paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, di-hidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrot testosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina e seus análogos ou homólogos. Os agentes terapêuticos

compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, antimetabolitos (v.g., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-decarbазина), agentes alquilantes (v.g., mecloretamina, tioepa-clorambucil, melfalano, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cisdiclorodiamina-platina (II) (DDP) (cisplatina), antraciclinas (v.g., daunorrubicina (outrora daunomicina) e doxorrubicina), antibióticos (v.g., dactinomicina (outrora actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)), e agentes antimitóticos (v.g., vincristina e vinblastina).

Além disso, é possível conjugar um anticorpo com um agente terapêutico ou com um radical de um fármaco que modifique uma determinada resposta biológica. Os agentes terapêuticos ou os radicais farmacológicos não irão ser construídos de modo a ficarem limitados aos agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, o radical farmacológico pode ser uma proteína ou um polipeptido que possua uma actividade biológica desejada. Tais proteínas podem compreender, por exemplo, uma toxina, tal como a abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas ou a toxina da difteria; uma proteína, tal como um factor de necrose tumoral, interferão α (IFN- α), interferão β (IFN- β), factor do crescimento dos nervos (NGF), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), activador plasminogénico tecidual (TPA), um agente apoptótico (v.g., TNF- α , TNF- β , AIM I conforme descrito na publicação PCT com o nº WO 97/33899), AIM II (ver, publicação PCT com o nº WO 97/34911), ligandos Fas (Takahashi et al., J. Immunol., 6:1567-1574, 1994) e VEGI (publicação PCT com o nº. WO 99/23105), um agente trombótico ou um agente

antiangiogénico (v.g., angiostatina ou endostatina); ou um modificador de uma resposta biológica, tal como, por exemplo, uma linfoquina (v.g., interleucina-1 ("IL- 1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colónias de macrófagos granulocíticos ("GMCSF"), e factor estimulador de colónias de granulócitos ("G-CSF")), ou um factor de crescimento (v.g., a hormona do crescimento ("GH")).

As técnicas para conjugar tais radicais terapêuticos com anticorpos são bem conhecidas; ver, v.g., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), 1985, pp. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; e Thorpe et al., *Immunol. Recombinant expression vector*, 62:119-58, 1982.

Como agente terapêutico é possível utilizar um anticorpo ou um seu fragmento, com ou sem um radical terapêutico que esteja conjugado com ele, administrado por si só ou em combinação com factores citotóxicos e/ou citoquinas.

Em alternativa, é possível conjugar um anticorpo com um segundo anticorpo para se formar um heteroconjugado de anticorpos, conforme descrito por Segal na patente de invenção norte-americana nº 4 676 980.

Os anticorpos também podem ser fixados em suportes sólidos que são particularmente úteis para imunoanálises ou para a purificação do antigénio destinatário. Tais suportes sólidos compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, lamelas de vidro, celulose, poliacrilamida, nylon, polistireno, poli(cloreto de vinilo) ou polipropileno.

5.4 MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO

As proteínas de fusão podem ser produzidas por meio de técnicas convencionais de ADN recombinante ou por meio de técnicas de síntese de proteínas, v.g., mediante a utilização de um sintetizador de péptidos. Por exemplo, é possível sintetizar uma molécula de ácido nucleico que codifique uma proteína de fusão, recorrendo a técnicas convencionais, incluindo os sintetizadores automáticos de ADN. Em alternativa, é possível efectuar a amplificação de fragmentos de genes por PCR, utilizando iniciadores ancorados que dão origem a formações salientes complementares entre dois fragmentos génicos consecutivos que podem ser depois recombinados e reamplificados para gerarem uma sequência de um gene quimérico (ver, v.g., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992). Além disso, é possível clonar um ácido nucleico que codifique uma molécula bioactiva num vector de expressão que contenha o domínio Fc, ou um seu fragmento, de tal modo que a molécula

bioactiva fique concatenadamente ligada ao domínio constante ou a um seu fragmento.

Os métodos para fundir ou conjugar com as regiões constantes de anticorpos são perfeitamente conhecidos na especialidade. Ver, *v.g.*, as patentes de invenção norte-americanas n°s 5 336 603, 5 622 929, 5 359 046, 5 349 053, 5 447 851, 5 723 125, 5 783 181, 5 908 626, 5 844 095 e 5 112 946; as patentes de invenção EP 307 434; EP 367 166; EP 394 827; as publicações PCT com os n°s WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 e WO 99/04813; as obras de Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 88: 10535-10539, 1991; Traunecker *et al.*, Nature, 331:84-86, 1988; Zheng *et al.*, J. Immunol., 154:5590-5600, 1995; e Vil *et al.*, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 89:11337-11341, 1992.

A sequência nucleotídica que codifica uma molécula bioactiva pode ser obtida a partir de toda a informação disponível e acessível aos especialistas na matéria (*v.g.*, existente no Genbank, na literatura ou por clonagem vulgar) e a sequência nucleotídica que codifica um domínio constante, ou um seu fragmento, com maior afinidade para com o FcRn pode ser determinada por análise sequencial dos mutantes produzidos, utilizando as técnicas aqui descritas, ou pode ser obtida no Genbank ou a partir da literatura. A sequência nucleotídica que codifica uma proteína de fusão pode ser inserida num vector de expressão adequado, isto é, um vector que contenha os elementos necessários para a transcrição e para a tradução da sequência que codifica a proteína inserida. É possível utilizar diversos sistemas de tipo hospedeiro-vector na presente invenção para a expressão da sequência que codifica a proteína. Tais sistemas compreendem, mas sem que isso constitua qualquer

limitação, os sistemas de células de mamíferos infectadas com vírus (v.g., vírus de vacínia, adenovírus, etc.); sistemas de células de insectos infectadas com vírus (v.g., baculovírus); microrganismos, tais como leveduras contendo vectores de leveduras; ou bactérias transformadas com bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico ou ADN cosmídico. Os elementos de expressão de vectores variam em termos de potência e especificidades. Consoante o sistema hospedeiro-vector utilizado, assim é possível utilizar diversos elementos adequados de transcrição e tradução.

A expressão de uma proteína de fusão pode ser controlada por qualquer elemento promotor ou intensificador conhecido na especialidade. Os promotores que é possível utilizar para controlar a expressão do gene que codifica a proteína de fusão compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, a região do promotor inicial de SV40 (Bemoist and Chambon, *Nature*, 290:304-310, 1981), o promotor contido na repetição do terminal comprido de 3' do vírus do sarcoma de Rous (Yamamoto, et al., *Cell*, 22:787-797, 1980), o promotor da timidina-cinase do herpes (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:1441-1445, 1981), as sequências reguladoras do gene da metalotioneína (Brinster et al., *Nature*, 296:39-42, 1982), o promotor da tetraciclina (Tet) (Gossen et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551, 1995); os vectores de expressão procarióticos, tais como o promotor da β -lactamase (Villa-Kamaroff, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-3731, 1978), ou o promotor tac (DeBoer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25, 1983; ver também "Useful proteins from recombinant bacteria" em *Scientific American*, 242:74-94, 1980); vectores de expressão de plantas que

compreendam a região do promotor da nopalina-sintetase (Herrera-Estrella et al., *Nature*, 303:209-213, 1983), ou o promotor de ARN do vírus 35S do mosaico da couve-flor (Gardner, et al., *Nucl. Acids Res.*, 9:2871, 1981) e o promotor da enzima fotossintética ribulose-bifosfato-carboxilase (Herrera-Estrella et al., *Nature*, 310:115-120, 1984); os elementos promotores obtidos a partir de leveduras ou de outros fungos, tais como o promotor Gal 4, o promotor ADC (desidrogenase do álcool), o promotor PGK (fosfoglicerol-cinase) o promotor da fosfatase alcalina e ainda as seguintes regiões de controlo transcricional em animais, as quais manifestam especificidade tecidual e têm sido utilizadas em animais transgénico:: a região de controlo do gene da elastase I, que é activa em células acinares pancreáticas (Swift et al., *Cell* 38:639-646, 1984; Ornitz et al., 50:399-409, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1986; MacDonald, *Hepatology* 7:425-515, 1987); a região de controlo do gene da insulina, que é activa nas células β pancreáticas (Hanahan, *Nature* 315:115-122, 1985), a região de controlo do gene da imunoglobulina, que é activa nas células linfóides (Grosschedl et al., *Cell*, 38:647-658, 1984; Adames et al., *Nature* 318:533-538, 1985; Alexander et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-1444, 1987), a região de controlo do vírus do tumor mamário dos murganhos, que é activa em células testiculares, da mama, linfóides e mastócitos (Leder et al., *Cell*, 45:485-495, 1986), a região de controlo do gene da albumina, que é activa no fígado (Pinkert et al., *Genes and Devel.*, 1:268-276, 1987), a região de controlo do gene da α -fetoproteína, que é activa no fígado (Krumlauf et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-1648, 1985; Hammer et al., *Science*, 235:53-58, 1987; a região de

controlo do gene de α 1-antitripsina, que é activa no fígado (Kelsey et al., *Genes and Devel.*, 1:161-171, 1987), a região de controlo do gene da β -globina, que é activa em células mielóides (Mogam et al., *Nature*, 315:338-340, 1985; Kollias et al., *Cell*, 46:89-94, 1986; a região de controlo do gene da proteína básica da mielina, que é activa em células oligodendrocíticas no cérebro (Readhead et al., *Cell*, 48:703-712, 1987); a região de controlo do gene da cadeia leve 2 da miosina, que é activa nos músculos do esqueleto (Sani, *Nature*, 314:283-286, 1985); a enolase específica neuronal (NSE), que é activa em células neuronais (Morelli et al., *Gen. Virol.*, 80:571-83, 1999); a região de controlo do gene do factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que é activa em células neuronais (Tabuchi et al., *Biochem. Biophysic. Res. Comprising.*, 253:818-823, 1998); o promotor da proteína acídica fibrilar glial (GFAP) que é activo nos astrócitos (Gomes et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32(5):619-631, 1999; Morelli et al., *Gen. Virol.*, 80:571-83, 1999) e a região de controlo do gene da hormona libertadora da gonadotropina, que é activa no hipotálamo (Mason et al., *Science*, 234:1372-1378, 1986).

De acordo com uma forma de realização específica, a expressão de uma proteína de fusão é regulada por um promotor constitutivo. De acordo com uma outra forma de realização, a expressão de uma proteína de fusão é regulada por um promotor induzível. De acordo com estas formas de realização, o promotor pode ser um promotor específico de um tecido.

De acordo com uma forma de realização concreta, utiliza-se um vector que compreende um promotor

funcionalmente ligado a um ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão, a uma ou várias origens de replicação e, facultativamente, a um ou vários marcadores seleccionáveis (v.g., um gene que confira resistência aos antibióticos).

Em células hospedeiras de mamíferos é possível utilizar diversos sistemas de expressão de base viral. Nos casos em que se utiliza um adenovírus como vector de expressão, a sequência que codifica a proteína de fusão pode ser ligada a um complexo de controlo de transcrição/tradução do adenovírus, v.g., o promotor final e a sequência líder tríplice. Este gene quimérico pode ser inserido depois no genoma do adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção numa região não essencial do genoma viral (v.g., uma das regiões E1 ou E3) irá ter como resultado um vírus recombinante que é viável e capaz de expressar a molécula de anticorpo em hospedeiros infectados (v.g., ver Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:355-359, 1984). Eventualmente também podem ser necessários sinais de iniciação específicos para uma tradução eficiente das sequências codificadoras da proteína de fusão inserida. Estes sinais compreendem o codão de iniciação ATG e as sequências adjacentes. Além disso, o codão de iniciação tem de estar em fase com a grelha de leitura da sequência de codificação desejada para se garantir a tradução de toda a inserção. Estes sinais exógenos de controlo traducional e os codões de iniciação podem ser provenientes de diversas origens, tanto naturais como sintéticas. A eficiência da expressão pode ser melhorada mediante a inclusão de elementos adequados intensificadores da transcrição, terminadores de transcrição, etc. (ver Bitter et al., Methods in Enzymol., 153:516-544, 1987).

Os vectores de expressão que contêm inserções de um gene que codifica uma proteína de fusão podem ser identificados por meio de três metodologias gerais: (a) hibridação de ácido nucleico, (b) presença ou ausência de funções de um gene "marcador" e (c) expressão das sequências inseridas. De acordo com a primeira metodologia, é possível detectar a presença de um gene que codifica uma proteína de fusão num vector de expressão de ácido nucleico, utilizando sondas que compreendem sequências que são homólogas com as de um gene inserido que codifica a proteína de fusão. De acordo com a segunda metodologia, o sistema vector/hospedeiro pode ser identificado e seleccionado com base na presença ou da ausência de determinadas funções de um gene "marcador" (v.g., actividade de timidina-cinase, resistência aos antibióticos, fenótipo de transformação, formação de corpos de oclusão em baculovírus, etc.), causadas pela inserção de uma sequência nucleotídica que codifique uma proteína de fusão no vector. Por exemplo, se a sequência nucleotídica que codifica a proteína de fusão for inserida dentro da sequência do gene marcador do vector, então os recombinantes que contêm o gene que codifica a proteína de fusão inserida podem ser identificados pela ausência da função do gene marcador. De acordo com a terceira metodologia, os vectores de expressão recombinantes podem ser identificados analisando o produto génico (isto é, a proteína de fusão) expresso pelos recombinantes. Tais análises assentam, por exemplo, em propriedades físicas ou funcionais da proteína de fusão em sistemas de análise *in vitro*, v.g., a ligação com um anti-anticorpo de moléculas bioactivas.

Além disso, é possível escolher uma estirpe de células hospedeiras que modulem a expressão das sequências

inseridas ou que modifiquem e efectuem o processamento do produto génico de acordo com a maneira particular desejada. A expressão de determinados promotores pode ser elevada na presença de determinados indutores; assim, é possível controlar a expressão da proteína de fusão geneticamente manipulada. Por outro lado, diversas células hospedeiras possuem mecanismos característicos e específicos para processamento e modificação traducional e pós-traducional (v.g., glicosilação, fosforilação de proteínas). É possível escolher linhagens de células convenientes ou sistemas hospedeiros para garantir a modificação desejada e o processamento da proteína exógena expressa. Por exemplo, a expressão num sistema bacteriano irá produzir um produto não glicosilado e a expressão em leveduras irá produzir um produto glicosilado. É possível utilizar células hospedeiras eucarióticas que possuam a maquinaria celular para o processamento correcto do transcrito primário, para a glicosilação e para a fosforilação do produto génico. Tais células hospedeiras de mamíferos compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, as células de CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38 e, em particular, as linhagens de células neuronais, tais como, por exemplo, as dos neuroblastomas humanos SK-N-AS, SK-N-FI, SK-N-DZ (Sugimoto *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 73: 51-57, 1984), as do neuroblastoma humano SK-N-SH (Biochim. Biophys. Acta, 704: 450-460, 1982), as do neuroblastoma cerebelar humano de Daoy (He *et al.*, Cancer Res., 52: 1144-1148, 1992) as células do glioblastoma DBTRG-05MG (Kruse *et al.*, 1992, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 28A:609-614, 1992), as do neuroblastoma humano IMR-32 (Cancer Res., 30: 2110-2118, 1970), as dos astrocitoma humano 1321N1 (Proc. Natl

Acad. Sci. USA, 74: 4816, 1997), as dos astrocitoma humano MOG-G-CCM (Br. J. Cancer, 49: 269, 1984), as de glioblastoma-astrocitoma humano U87MG (Acta Pathol. Microbiol. Scand., 74: 465-486, 1968), as do glioblastoma humano A172 (Olopade et al., Cancer Res., 52: 2523-2529, 1992), as células C6 de glioma do rato (Benda et al., Science, 161: 370-371, 1968), as do neuroblastoma de murganho Neuro-2a (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 65: 129-136, 1970), as do neuroblastoma de murganho NB41A3 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 1184-1190, 1962), as do plexo coróide de ovídeos SCP (Bolin et al., J. Virol. Methods, 48: 211-221, 1994), astrócitos normais de gato G355-5, PG-4 (Haapala et al., J. Virol., 53: 827-833, 1985), as de cérebro de furão Mpf (Trowbridge et al., In Vitro, 18: 952-960, 1982) e as linhagens de células normais tais como, por exemplo, as de córtex cerebral normal de rato CTX TNA2 (Radany et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6467-6471, 1992) ou, por exemplo, CRL7030 e Hs578Bst. Mais ainda, diferentes sistemas de expressão de tipo vector/hospedeiro podem afectar as reacções de processamento segundo graus diferentes.

Para uma produção de proteínas recombinantes a longo prazo e com elevado rendimento é preferível uma expressão estável. Por exemplo, é possível manipular geneticamente linhagens de células em que ocorra estavelmente a expressão de proteínas de fusão. Em vez de se recorrer à utilização de vectores de expressão que contenham origens de replicação viral, as células hospedeiras podem ser transformadas com ADN controlado por elementos adequados de controlo da expressão (v.g., promotores, intensificadores, sequências, terminadores de transcrição, locais de

poliadenilação, etc.) e com um marcador seleccionável. A seguir à introdução do ADN exógeno, espera-se que as células geneticamente manipuladas se desenvolvam durante 1 a 2 dias num meio enriquecido, sendo depois transferidas para um meio selectivo. O marcador seleccionável no plasmídeo recombinante confere resistência à selecção e permite que as células integrem estavelmente o plasmídeo nos seus cromossomas e se desenvolvam para formarem focos que irão ser, por sua vez, clonados e expandidos em linhagens celulares. Este método pode ser utilizado vantajosamente para manipular linhagens celulares em que ocorra a expressão da proteína diferencialmente expressa, ou o conjunto de interacções entre genes. Tais linhagens de células geneticamente manipuladas podem ser particularmente úteis para pesquisar e avaliar compostos que afectem a actividade endógena da proteína diferencialmente expressa, ou do conjunto de interacções entre genes.

É possível utilizar diversos sistemas de selecção, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, o sistema constituído pelo vírus do herpes simplex e timidina-cinase (Wigler, et al., Cell, 11:223, 1977), o sistema de hipoxantina-guanina e fosforribosiltransferase (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026, 1962) e de adenina e fosforribosiltransferase (Lowy, et al., 1980, Cell, 22:817, 1980). Os genes podem ser utilizados respectivamente em células tk^- , $hgp\text{rt}^-$ ou $ap\text{rt}^-$. Por outro lado, é possível utilizar a resistência aos antimetabolitos como base para a selecção dos genes *dhfr* que confere resistência ao metotrexato (Wigler, et al., Natl. Acad. Sci. USA, 77:3567, 1980; O'Hare, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527, 1981); *gpt* que confere

resistência ao ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072, 1981); *neo* que confere resistência ao aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin, et al., J. Mol. Biol., 150:1, 1981); e *hygro* que confere resistência à higromicina (Santerre, et al., Gene, 30:147, 1984).

Depois de a proteína de fusão da invenção ter sido produzida por expressão recombinante, pode ser purificada por meio de qualquer método conhecido na especialidade para a purificação de uma proteína, por exemplo, por cromatografia (v.g., cromatografia de permuta iônica, de afinidade, em particular por afinidade com um antígeno específico depois da proteína A, e cromatografia em coluna de exclusão dimensional), por centrifugação, pela solubilidade diferencial ou por meio de qualquer outra técnica convencional para a purificação de proteínas.

5.5. APLICAÇÕES PROFILÁTICAS E TERAPÊUTICAS DOS ANTICORPOS

A presente invenção compreende terapias à base de anticorpos, as quais consistem em administrar anticorpos a um animal, de preferência um mamífero e mais preferencialmente um ser humano, para prevenir, tratar ou mitigar os sintomas associados a uma doença, patologia ou infecção. Os compostos profiláticos e terapêuticos da invenção compreendem, mas sem qualquer limitação, anticorpos e ácidos nucleicos que codifiquem os anticorpos. Os anticorpos podem ser fornecidos em composições farmacologicamente aceitáveis, de tipo conhecido na especialidade, ou conforme aqui descrito.

Os anticorpos da presente invenção, que funcionam como antagonistas de uma doença, patologia ou infecção, podem

ser administrados a um animal, de preferência um mamífero e mais preferencialmente um ser humano, para tratar, prevenir ou mitigar um ou vários dos sintomas associados à doença, patologia ou infecção. Por exemplo, os anticorpos que destroem ou impedem a interacção entre um antigénio viral e o seu receptor na célula hospedeira podem ser administrados a um animal, de preferência um mamífero e mais preferencialmente um ser humano, para tratar, prevenir ou mitigar um ou vários dos sintomas associados a uma infecção viral.

De acordo com uma forma de realização concreta, um anticorpo, ou um seu fragmento, impede que um antigénio viral ou bacteriano se ligue ao seu receptor na célula hospedeira pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20% ou pelo menos 10%, comparativamente com o antigénio que se liga ao seu receptor na célula hospedeira na ausência dos referidos anticorpos. De acordo com uma outra forma de realização, uma combinação de anticorpos impede que um antigénio viral ou bacteriano se ligue ao seu receptor na célula hospedeira pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20% ou pelo menos 10%, comparativamente com o antigénio que se liga ao seu receptor na célula hospedeira na ausência dos referidos anticorpos. De acordo com uma variante preferencial, utiliza-se o anticorpo para tratar ou prevenir uma infecção com RSV.

Os anticorpos que não evitam que um antígeno viral ou bacteriano se ligue ao seu receptor na célula hospedeira, mas que inibem ou diminuem a replicação viral ou bacteriana, também podem ser administrados a um animal para tratar, prevenir ou mitigar um ou vários dos sintomas associados a uma infecção viral ou bacteriana. A aptidão de um anticorpo para inibir ou diminuir a replicação viral ou bacteriana pode ser determinada por meio de técnicas aqui descritas ou explicitadas em obras da especialidade. Por exemplo, a inibição ou a diminuição da replicação viral pode ser determinada detectando a concentração viral no animal.

De acordo com uma forma de realização concreta, um anticorpo inibe ou diminui a replicação viral ou bacteriana pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20% ou pelo menos 10%, relativamente à replicação viral ou bacteriana na ausência do referido anticorpo. De acordo com uma outra forma de realização, uma combinação de anticorpos inibe ou diminui a replicação viral ou bacteriana pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20% ou pelo menos 10%, relativamente à replicação viral ou bacteriana na ausência do referido anticorpo.

Os anticorpos podem ser utilizados para prevenir, inibir ou reduzir o desenvolvimento ou metástases de

células cancerosas. De acordo com uma forma de realização concreta, um anticorpo inibe ou reduz o desenvolvimento ou as metástases de células cancerosas pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20% ou pelo menos 10%, relativamente ao desenvolvimento ou às metástases na ausência do referido anticorpo. De acordo com uma outra forma de realização, uma combinação de anticorpos inibe ou reduz o desenvolvimento ou as metástases de cancro pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20% ou pelo menos 10%, relativamente ao desenvolvimento ou às metástases na ausência dos referidos anticorpos. Como exemplos de cancros refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, leucemia (v.g., leucemia aguda, tal como a leucemia linfocítica aguda, e a leucemia mielocítica aguda), neoplasmas, tumores (v.g., fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliossarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, carcinoma do cólon, cancro pancreático, cancro da mama, cancro dos ovários, cancro da próstata, carcinoma das glândulas sudoríparas, carcinoma das glândulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma das células renais, hepatoma, carcinoma dos canais biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma

embrional, tumor de Wilms, cancro cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequenas, carcinoma da bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma), doença da cadeia pesada, metástases ou qualquer doença ou patologia que se caracterize pelo desenvolvimento celular descontrolado.

Os anticorpos também podem ser utilizados para reduzir a inflamação experimentada por animais, em particular mamíferos, com patologias inflamatórias. De acordo com um forma de realização concreta, um anticorpo reduz a inflamação num animal pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20% ou pelo menos 10%, relativamente à inflamação num animal a que não tenha sido administrado o referido anticorpo. De acordo com uma outra forma de realização, uma combinação de anticorpos reduz a inflamação num animal pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20% ou pelo menos 10%, relativamente à inflamação num animal a que não tenham sido administrados os referidos anticorpos.

Em determinadas formas de realização, o anticorpo utilizado para tratar a inflamação (ou o cancro) é um anticorpo modificado anti- $\alpha\text{v}\beta 3$, de preferência um anticorpo

'Vitaxin' (ver, as publicações PCT com os n°s WO 98/33919 e WO 00/78815 da autoria de Huse et al.).

Os anticorpos também podem ser utilizados para evitar a rejeição de transplantes. Os anticorpos também podem ser utilizados para evitar a formação coágulos. Além disso, os anticorpos que funcionam como agonistas da resposta imunitária também podem ser administrados a um animal, de preferência um mamífero e mais preferencialmente um ser humano, para tratar, prevenir ou mitigar um ou vários dos sintomas associados à doença, patologia ou infecção.

É possível utilizar, local ou sistemicamente, como agente terapêutico aplicado ao corpo, um ou vários anticorpos que se liguem de forma imuno específica a um ou vários antigénios. Os anticorpos da presente invenção também podem ser utilizados, vantajosamente, em combinação com outros anticorpos monoclonais ou quiméricos, ou com linfoquinas ou factores de crescimento hematopoiéticos (tais como, v.g., IL-2, IL-3 e IL-7), que servem, por exemplo, para aumentar o número ou a actividade de células efectoras que interactuem com os anticorpos. Os anticorpos da presente invenção também podem ser utilizados, vantajosamente, em combinação com outros anticorpos monoclonais ou quiméricos, ou com linfoquinas ou factores de crescimento hematopoiéticos (tais como, v.g., IL-2, IL-3 e IL-7), que servem, por exemplo, para aumentar a resposta imunitária. Os anticorpos da presente invenção também podem ser utilizados, vantajosamente, em combinação com um ou vários fármacos que sirvam para tratar uma doença, patologia ou infecção, por exemplo, agentes anticancro, agentes anti-inflamatórios ou agentes antivirais. Como exemplos de agentes anticancro refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os seleccionados entre isplatina, ifosfamida, paclitaxel,

taxanos, inibidores da topoisomerase I (v.g., CPT-11, topotecan, 9-AC e GG-211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatina, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorin, vinorelbina, temodal e taxol. Como exemplos de agentes antivirais refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, citocinas (v.g., IFN- α , IFN- β , IFN- γ), inibidores da transcriptase inversa (v.g., AZT, 3TC, D4T, ddC, ddI, d4T, 3TC, adefovir, efavirenz, delavirdina, nevirapina, abacavir e outros didesoxinucleósidos ou didesoxifluoronucleósidos), inibidores da protecção terminal do ARNm viral, tais como ribavirina, inibidores de proteases, tais como os inibidores das proteases dos VIH (v.g., amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir e saquinavir), anfotericina B, castanospermina, enquanto inibidor do processamento de glicoproteínas, inibidores de neuraminidases tais como os inibidores da neuraminidase, do vírus da gripe (v.g., zanamivir e oseltamivir), inibidores da topoisomerase I (v.g., camptotecinas e seus análogos), amantadina e rimantadina. Como exemplos de agentes anti-inflamatórios refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os fármacos anti-inflamatórios não esteróideais tais como os inibidores de COX-2 (v.g., meloxicam, celecoxib, rofecoxib, flosulide, SC-58635 e MK-966), ibuprofeno e indometacina, e esteróides (v.g., deflazacort, dexametasona e metilprednisolona).

De acordo com uma forma de realização concreta, os anticorpos administrados a um animal têm origem numa espécie ou têm uma reactividade própria da espécie, isto é, são da mesma espécie dos anticorpos do animal. Assim, de acordo com uma forma de realização preferencial, os anticorpos humanos ou humanizados, ou os ácidos nucleicos que codificam os anticorpos humanos ou humanizados, são

administrados a um paciente humano para efeitos de terapia ou profilaxia.

De acordo com formas de realização preferenciais, são utilizadas imunoglobulinas que possuem maiores períodos de semivida *in vivo* em imunoterapia passiva (quer para terapia quer para profilaxia). Devido ao maior período de semivida, a imunoterapia passiva, ou profilaxia, pode ser efectuada utilizando doses menores e/ou recorrendo a administrações menos frequentes de agente terapêutico, daí resultando menos efeitos secundários, melhor anuência por parte do paciente, uma terapia/profilaxia menos dispendiosa, etc.. De acordo com uma forma de realização preferencial, o agente terapêutico/profilático é um anticorpo que se liga ao RSV, por exemplo, SYNAGIS® ou outro anticorpo anti-RSV. Tais anticorpos anti-RSV e os métodos para a sua administração estão descritos nos pedidos de patentes de invenção norte-americanas com os números de série 09/724 396 e 09/724 531, ambas com o título "Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies For Prophylaxis and Treatment," sendo as duas da autoria de Young *et al.* e tendo sido ambas depositadas a 28 de Novembro de 2000, e nos pedidos de patentes de invenção que são continuações parciais dos pedidos referidos, nas patentes de invenção norte-americanas n.ºs 2003/0091584 e 2002/0177126, também elas intituladas "Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment," da autoria de Young *et al.* Também estão abrangidos os anticorpos anti-RSV descritos na secção 5.1, *supra*.

De acordo com uma forma de realização concreta, as proteínas de fusão administradas a um animal têm origem numa espécie ou têm uma reactividade própria da espécie,

isto é, são da mesma espécie dos anticorpos do animal. Assim, de acordo com uma variante preferencial, as proteínas de fusão humanas, ou os ácidos nucleicos que codificam as proteínas de fusão humanas, são administradas a um ser humano para terapia ou profilaxia.

5.6. APLICAÇÕES PROFILÁTICAS E TERAPÊUTICAS DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO E DAS MOLÉCULAS CONJUGADAS

A presente invenção diz respeito a terapias baseadas em proteínas de fusão e baseadas em moléculas conjugadas, as quais consistem em administrar proteínas de fusão ou moléculas conjugadas a um animal, de preferência um mamífero e mais preferencialmente um ser humano, para prevenir, tratar ou mitigar os sintomas associados a uma doença, patologia ou infecção. Os compostos profiláticos ou terapêuticos da invenção compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, proteínas de fusão e ácidos nucleicos que codificam as proteínas de fusão e moléculas conjugadas. As proteínas de fusão e as moléculas conjugadas podem ser fornecidas em composições farmacologicamente aceitáveis, do tipo conhecido na especialidade ou conforme aqui descrito.

As proteínas de fusão e as moléculas conjugadas da presente invenção, que funcionam como antagonistas de uma doença, patologia ou infecção, podem ser administradas a um animal, de preferência a um mamífero e mais preferencialmente a um ser humano, para tratar, prevenir ou mitigar um ou vários dos sintomas associados à doença, patologia ou infecção. Além disso, as proteínas de fusão e as moléculas conjugadas da presente invenção, que funcionem como agonistas

da resposta imunitária, podem ser administradas a um animal, de preferência um mamífero e mais preferencialmente um ser humano, para tratar, prevenir ou mitigar um ou vários dos sintomas associados à doença, patologia ou infecção.

É possível utilizar, local ou sistemicamente, no corpo, como agente terapêutico, uma ou várias proteínas de fusão e moléculas conjugadas. As proteínas de fusão e as moléculas conjugadas da presente invenção também podem ser utilizadas, vantajosamente, em combinação com anticorpos monoclonais ou quiméricos, ou com linfoquinas ou factores de crescimento hematopoiéticos (tais como, *v.g.*, IL-2, IL-3 e IL-7), que servem, por exemplo, para aumentar o número ou a actividade de células efectoras que interactuam com os anticorpos. As proteínas de fusão e as moléculas conjugadas da presente invenção também podem ser utilizadas vantajosamente em combinação com anticorpos monoclonais ou quiméricos, ou com linfoquinas ou factores de crescimento hematopoiéticos (tais como, *v.g.*, IL-2, IL-3 e IL-7), que servem, por exemplo, para aumentar a resposta imunitária. As proteínas de fusão e as moléculas conjugadas da presente invenção também podem ser utilizadas, vantajosamente, em combinação com um ou vários fármacos que servem para tratar uma doença, patologia ou infecção, tais como, por exemplo, os agentes anticancro, agentes anti-inflamatórios ou agentes antivirais. Como exemplos de agentes anticancro refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os seleccionados entre isplatina, ifosfamida, paclitaxel, taxanos, inibidores da topoisomerase I (*v.g.*, CPT-11, topotecan, 9-AC e GG-211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatina, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorin, vinorelbina, temodal e taxol. Como exemplos de agentes antivirais refere-se, mas sem que isso constitua

qualquer limitação, citocinas (v.g., IFN- α , IFN- β , IFN- γ), inibidores da transcriptase inversa (v.g., AZT, 3TC, D4T, ddC, ddI, d4T, 3TC, adefovir, efavirenz, delavirdina, nevirapina, abacavir e outros didesoxinucleósidos ou didesoxifluoronucleósidos), inibidores da protecção terminal do ARNm viral, tais como ribavirina, inibidores de proteases, tais como os inibidores das proteases dos VIH (v.g., amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir e saquinavir), anfotericina B, castanospermina enquanto inibidor do processamento de glicoproteínas, inibidores de neuraminidases, tais como os inibidores da neuraminidase do vírus da gripe (v.g., zanamivir e oseltamivir), inibidores da topoisomerase I (v.g., camptotecinas e seus análogos), amantadina e rimantadina. Como exemplos de agentes anti-inflamatórios refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os fármacos anti-inflamatórios não esteróideais, tais como os inibidores de COX-2 (v.g., meloxicam, celecoxib, rofecoxib, flosulide, SC-58635 e MK-966), ibuprofeno e indometacina, e esteróides (v.g., deflazacort, dexametasona e metilprednisolona).

5.7. ADMINISTRAÇÃO DE ANTICORPOS OU DE PROTEÍNAS DE FUSÃO

A invenção proporciona medicamentos para o tratamento, profilaxia e mitigação de um ou vários dos sintomas associados a uma doença, patologia ou infecção, compreendendo os referidos medicamentos um anticorpo da invenção, ou uma composição farmacêutica que contenha um anticorpo da invenção. A invenção também proporciona medicamentos para o tratamento, profilaxia e mitigação de um ou vários dos sintomas associados a uma doença, patologia ou infecção, compreendendo os referidos

medicamentos uma proteína de fusão ou uma molécula conjugada da invenção, ou uma composição farmacêutica que compreenda uma proteína de fusão ou moléculas conjugadas da presente invenção. De acordo com um aspecto preferencial, um anticorpo, ou uma proteína de fusão ou uma molécula conjugada, é substancialmente purificado (isto é, praticamente isento de substâncias que limitem o seu efeito ou que produzam efeitos secundários indesejados). De acordo com uma forma de realização concreta, o paciente é um animal, de preferência um mamífero, tal como um não primata (v.g., bovinos, suínos, equinos, felinos, caninos, ratos, etc.) ou um primata (v.g., macacos, tais como o macaco cinomólogo e um ser humano). De acordo com uma forma de realização preferencial, o paciente é um ser humano.

São conhecidos diversos sistemas de administração que podem ser utilizados para administrar um anticorpo, ou uma proteína de fusão ou uma molécula conjugada da invenção, v.g., encapsulação em lipossomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressarem o anticorpo ou a proteína de fusão, endocitose mediada pelo receptor (ver, v.g., Wu and Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432, 1987), construção de um ácido nucleico como parte de um vector retroviral ou de outro tipo, etc.. Os métodos para administrar um anticorpo, uma proteína de fusão ou uma molécula conjugada, ou uma composição farmacêutica, compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os métodos de administração parentérica (v.g., intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e subcutânea), epidural e mucosal (v.g., pelas vias intranasal e oral). De acordo com uma forma de realização concreta, os anticorpos, as proteínas de fusão, as moléculas conjugadas ou as

composições farmacêuticas, são administrados pelas vias intramuscular, intravenosa ou subcutânea. As composições podem ser administradas por qualquer via conveniente, por exemplo, por infusão ou por injeção de tipo *bolus*, por absorção através dos revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (v.g., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) ou podem ser administradas conjuntamente com outros agentes biologicamente activos. A administração pode ser sistémica ou local. Além disso, também é possível recorrer à administração pulmonar, v.g., mediante a utilização de um inalador ou de um nebulizador, e fazendo a formulação com um agente atomizador. Ver, v.g., as patentes de invenção norte-americanas n.ºs 6 019 968; 5 985 320; 5 985 309; 5 934 272; 5 874 064; 5 855 913; 5 290 540; e 4 880 078; e as publicações PCT números WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; e WO 99/66903. De acordo com uma forma de realização preferencial, administra-se um anticorpo, uma proteína de fusão, moléculas conjugadas ou uma composição farmacêutica utilizando a tecnologia de administração de fármacos pulmonares 'Alkermes AIR™' (Alkermes, Inc., Cambridge, MA).

A invenção proporciona também um anticorpo, uma proteína de fusão ou uma molécula conjugada, acondicionadas num recipiente hermeticamente fechado, tal como uma ampola ou saqueta, indicando a quantidade de anticorpo, de proteína de fusão ou de molécula conjugada. De acordo com uma forma de realização, o anticorpo, a proteína de fusão ou a molécula conjugada são fornecidos sob a forma de um pó liofilizado, esterilizado e anidro, ou sob a forma de um concentrado isento de água, no recipiente hermeticamente fechado, podendo ser reconstituídos, v.g., com água ou com

soluto salino, até à concentração adequada, para administração a um paciente. De preferência, o anticorpo, a proteína de fusão ou a molécula conjugada são fornecidos sob a forma de um pó liofilizado, esterilizado e anidro, num recipiente hermeticamente fechado que irá conter uma dosagem unitária pelo menos igual a 5 mg, mais preferencialmente pelo menos 10 mg, pelo menos 15 mg, pelo menos 25 mg, pelo menos 35 mg, pelo menos 45 mg, pelo menos 50 mg ou pelo menos 75 mg. O anticorpo, a proteína de fusão ou a molécula conjugada liofilizados devem ser guardados a uma temperatura entre 2 e 8°C no seu recipiente original e o anticorpo, a proteína de fusão ou as moléculas conjugadas devem ser administrados em menos de 12 horas, de preferência em menos de 6 horas, em menos de 5 horas, em menos de 3 horas ou em menos de 1 hora após terem sido reconstituídos. De acordo com uma forma de realização alternativa, um anticorpo, uma proteína de fusão ou uma molécula conjugada são fornecidos no estado líquido no recipiente hermeticamente fechado, com indicação da quantidade e concentração do anticorpo, da proteína de fusão ou da molécula conjugada. De preferência, a forma líquida de anticorpo, de proteína de fusão ou de molécula conjugada é fornecida num recipiente hermeticamente fechado com uma concentração pelo menos igual a 1 mg/mL, mais preferencialmente pelo menos 2,5 mg/mL, pelo menos 5 mg/mL, pelo menos 8 mg/mL, pelo menos 10 mg/mL, pelo menos 15 mg/kg ou pelo menos 25 mg/mL.

De acordo com uma forma de realização concreta, pode ser desejável administrar as composições farmacêuticas da invenção localmente, na zona que necessite de tratamento; isto pode ser conseguido, por exemplo, sem qualquer

limitação, por infusão local, por injeção ou por meio de um implante, sendo o referido implante um material poroso, não poroso ou gelatinoso, incluindo as membranas, tais como as membranas sialásticas ou fibras. De preferência, quando se administra um anticorpo ou uma proteína de fusão, é necessário tomar precauções, no sentido em que devem ser utilizados materiais que não absorvam o anticorpo ou a proteína de fusão.

De acordo com uma outra forma de realização, a composição pode ser fornecida numa vesícula, em particular um lipossoma (ver, Langer, *Science*, 249:1527-1533, 1990; Treat et al., em *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; ver genericamente *ibidem*).

De acordo com mais uma outra forma de realização, a composição pode ser fornecida num sistema de libertação controlada ou num sistema de libertação prolongada. É possível recorrer a qualquer técnica conhecida pelos especialistas na matéria para se produzir formulações de libertação prolongada que contenham um ou vários anticorpos ou uma ou várias proteínas de fusão. Ver, v.g., a patente de invenção norte-americana nº 4 526 938; a publicação PCT com o nº WO 91/05548; a publicação PCT com o nº WO 96/20698; Ning et al., "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology*, 39: 179-189, 1996; Song et al., "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 50:372-397 1995; Cleek et al., "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular

Application," *Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24:853-854, 1997; e Lam et al., "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 24:759-760, 1997. De acordo com uma forma de realização, é possível utilizar uma bomba num sistema de libertação controlada (ver, Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed Eng.*, 14:20, 1987; Buchwald et al., *Surgery*, 88:507, 1980; e Saudek et al., *N. Engl. J. Med*, 321:574, 1989). De acordo com uma outra forma de realização, é possível utilizar materiais poliméricos para se conseguir que haja uma libertação controlada de anticorpos ou de proteínas de fusão (ver, v.g., *Medical Applications of Controlled Release*, Langer e Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen e Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger e Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 23:61, 1983; ver também Levy et al., *Science*, 228:190, 1985; During et al., *Ann. Neurol.*, 25:351, 1989; Howard et al., *J. Neurosurg.*, 71:105, 1989); a patente de invenção norte-americana nº 5 679 377; a patente de invenção norte-americana nº 5 916 597; a patente de invenção norte-americana nº 5 912 015; a patente de invenção norte-americana nº 5 989 463; a patente de invenção norte-americana nº 5 128 326; a publicação PCT com o nº WO 99/15154; e a publicação PCT com o nº WO 99/20253). Ainda de acordo com uma mais uma outra forma de realização, é possível colocar um sistema de libertação controlada na proximidade do alvo terapêutico (v.g., os pulmões), o que faz com que apenas seja necessária uma fracção da dose

sistémica (ver, v.g., Goodson, em *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Há outros sistemas de libertação controlada descritos na obra de Langer, *Science*, 249:1527-1533, 1990).

De acordo com uma forma de realização concreta, no caso de a composição da invenção ser um ácido nucleico que codifique um anticorpo, ou uma proteína de fusão, então o ácido nucleico pode ser administrado *in vivo* para favorecer a expressão do anticorpo, ou da proteína de fusão, por ele codificado, sendo para isso construído como parte de um vector conveniente de expressão de ácido nucleico e sendo administrado de modo a que passe a ser intracelular, v.g., mediante a utilização de um vector retroviral (ver a patente de invenção norte-americana nº 4 980 286), ou por injeção directa, ou recorrendo ao bombardeamento com micropartículas (v.g., uma pistola de genes; Biolistic, Dupont), ou recobrando-o com lípidos ou com receptores da superfície celular ou com agentes de transfecção, ou sendo administrado conjugadamente com um péptido semelhante a 'homeobox', sobre o qual se sabe que penetra no núcleo (ver, v.g., Joliot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1864-1868, 1991), etc.. Em alternativa, é possível introduzir um ácido nucleico intracelularmente e incorporá-lo no ADN da célula hospedeira para expressão por recombinação homóloga.

A presente invenção também proporciona composições farmacêuticas. Tais composições compreendem uma quantidade profilática ou terapêuticamente eficaz de um anticorpo, de uma proteína de fusão ou de uma molécula conjugada, conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável. De acordo com uma forma de realização concreta, o termo

"farmaceuticamente aceitável" significa que houve aprovação por uma agência reguladora do Governo Federal, ou de um Estado, ou o que consta da farmacopeia norte-americana ou de outra farmacopeia geralmente aceite, para utilização em animais e mais particularmente em seres humanos. O termo "veículo" designa um diluente, adjuvante (v.g., meios completo e incompleto de Freund, geles minerais, tais como hidróxido de alumínio, substâncias tensioactivas, tais como lisolecitina, polióis plurónicos, polianióes, péptidos, emulsões em óleo, hemocianinas de moluscos gastrópodes, dinitrofenol e os adjuvantes potencialmente úteis para os seres humanos, tais como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*), excipientes ou veículos com os quais o agente terapêutico seja administrado. Tais veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tais como a água e os óleos, incluindo os derivados de petróleo, de origem animal, vegetal ou sintética, tais como o óleo de amendoim, o óleo de soja, um óleo mineral, óleo de sésamo e não só. A água é o veículo preferível quando a composição farmacêutica é administrada por via intravenosa. Também é possível utilizar soluções salinas e soluções aquosas de dextrose e glicerol como veículos líquidos, em particular para soluções injectáveis. Os excipientes farmacêuticos convenientes compreendem os seleccionados entre amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, carbonato de cálcio, gel de sílica, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite em pó desnatado, glicerol, propileno-glicol, água, etanol e não só. Se desejado, a composição também pode conter quantidades menores de agentes humectantes ou emulsionantes ou agentes de tamponamento do pH. Estas

composições podem assumir a forma de soluções, suspensões, emulsões, comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, formulações de libertação prolongada e não só. Uma formulação oral pode conter veículos convencionais, tais como manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, etc., de qualidade farmacêutica. Como exemplos de veículos farmacêuticos adequados refere-se os descritos na obra "Remington's Pharmaceutical Sciences" da autoria de E.W. Martin. Tais composições irão conter uma quantidade profilática ou terapeuticamente eficaz do anticorpo, ou de um seu fragmento, ou de proteína de fusão ou de molécula conjugada, de preferência numa forma purificada, conjuntamente com uma quantidade conveniente de veículo, de modo a obter-se a forma adequada para administração ao paciente. A formulação deve corresponder ao modo de administração.

De acordo com uma forma de realização preferencial, a composição é formulada de acordo com procedimentos vulgares, sob a forma de uma composição farmacêutica adaptada para administração intravenosa a seres humanos. Tipicamente, as composições para administração intravenosa são soluções em tampão aquoso isotónico estéril. Sempre que necessário, a composição também pode conter um agente solubilizador e um anestésico local, tal como a lignocaína, para mitigar a dor no local da injeção.

De um modo geral, os ingredientes das composições da invenção são fornecidos, quer separadamente quer misturados conjuntamente, numa forma de dosagem unitária, por exemplo, sob a forma de um pó liofilizado anidro ou sob a forma de um concentrado isento de água num recipiente hermeticamente fechado, tal como uma ampola ou saqueta, com indicação da

quantidade de agente activo. No caso de a composição se destinar a ser administrada por infusão, pode ser fornecida com um frasco de infusão que contenha água ou um soluto salino estéril de qualidade farmacêutica. No caso de a composição ser administrada por injeção, a ampola de água estéril para injeção ou de soluto salino pode ser fornecida de modo a que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

As composições da invenção podem ser formuladas em formas neutras ou salinas. Os sais farmaceuticamente aceitáveis compreendem aqueles que são formados com aniões, tais como os derivados dos ácidos clorídrico, fosfórico, acético, oxálico e tartárico, etc. e os que são obtidos com catiões, tais como os derivados dos hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio e férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etc..

A quantidade da composição da invenção que irá ser eficaz para tratar, prevenir ou mitigar um ou vários dos sintomas associados a uma doença, patologia ou infecção pode ser determinada por meio de técnicas clínicas convencionais. A dose exacta que irá ser utilizada na formulação irá depender da via de administração, da idade do paciente e da gravidade da doença, patologia ou infecção e deve ser decidida de acordo com a opinião do médico assistente e tendo em conta as circunstâncias de cada paciente. As doses eficazes podem ser extrapoladas a partir de curvas de tipo dose-resposta obtidas por meio de sistemas experimentais com modelos *in vitro* ou com animais (v.g., o rato branco ou o macaco cinomólogo).

Para as proteínas de fusão, a dose terapêutica ou profilaticamente eficaz administrada a um paciente varia

entre cerca de 0,001 e 50 mg/kg de massa corporal, de preferência entre 0,01 e 25 mg/kg de massa corporal, mais preferencialmente entre cerca de 0,1 e 20 mg/kg de massa corporal e ainda mais preferencialmente, entre cerca de 1 e 10 mg/kg, 2 e 9 mg/kg, 3 e 8 mg/kg, 4 e 7 mg/kg ou 5 e 6 mg/kg de massa corporal. No caso dos anticorpos, a dose terapêutica ou profilaticamente eficaz administrada a um paciente está compreendida tipicamente entre 0,1 mg/kg e 200 mg/kg de massa corporal do paciente. De preferência, a dose administrada a um paciente está compreendida entre 0,1 mg/kg e 20 mg/kg de massa corporal do paciente e ainda mais preferencialmente a dose administrada a um paciente está compreendida entre 1 mg/kg e 10 mg/kg de massa corporal do paciente. No entanto, a dose irá depender do aumento conferido ao período de semivida da molécula *in vivo*. De um modo geral, os anticorpos humanos e as proteínas de fusão humanas possuem períodos de semivida dentro do corpo humano mais longos do que os anticorpos ou do que as proteínas de fusão provenientes de outras espécies, devido à resposta imunitária aos polipeptídeos exógenos. Deste modo, é possível, quase sempre, fazer a administração menos frequente ou em doses menores de anticorpos humanos ou de proteínas de fusão humanas. Além disso, a dosagem e a frequência de administração de anticorpos, de proteínas de fusão ou de moléculas conjugadas podem ser reduzidas no caso de se aumentar a incorporação e a penetração nos tecidos (v.g., nos pulmões) por parte dos anticorpos ou das proteínas de fusão, mediante modificações tais como, por exemplo, a lipidação.

O tratamento de um paciente com uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um anticorpo, de

uma proteína de fusão ou de uma molécula conjugada pode ser um tratamento único ou então, de preferência, pode consistir num conjunto de tratamentos. De acordo com um exemplo preferencial, trata-se um paciente com um anticorpo, uma proteína de fusão ou uma molécula conjugada em doses compreendidas no intervalo entre cerca de 0,1 e 30 mg/kg de massa corporal, uma vez por semana, durante um período compreendido entre cerca de 1 e 10 semanas, de preferência entre 2 e 8 semanas, mais preferencialmente entre cerca de 3 e 7 semanas e ainda mais preferencialmente durante cerca de 4, 5 ou 6 semanas. De acordo com outras formas de realização, a composição farmacêutica da invenção é administrada uma vez por dia, duas vezes por dia ou três vezes por dia. De acordo com outras formas de realização, a composição farmacêutica é administrada uma vez por semana, duas vezes por semana, uma vez em cada duas semanas, uma vez por mês, uma vez em cada seis semanas, uma vez em cada dois meses, duas vezes por ano ou uma vez por ano. Faz-se observar que a posologia eficaz do anticorpo, da proteína de fusão ou da molécula conjugada, utilizados para o tratamento, como é evidente, pode aumentar ou diminuir no decurso de um tratamento particular.

5.7.1. TERAPIA GÉNICA

De acordo com uma forma de realização concreta, os ácidos nucleicos que compreendem sequências que codificam os anticorpos ou as proteínas são administrados para tratar, prevenir ou mitigar um ou vários dos sintomas associados a uma doença, patologia ou infecção, por via de terapia génica. A terapia génica é uma terapia que se

realiza administrando a um paciente um ácido nucleico expresso ou expressável. De acordo com esta forma de realização da invenção, os ácidos nucleicos produzem os seus anticorpos codificados ou proteínas de fusão que vão mediar um efeito terapêutico ou profilático.

De acordo com a presente invenção é possível praticar todos os métodos de terapia génica conhecidos na especialidade. Descreve-se adiante métodos exemplificativos.

Para uma leitura geral dos métodos de terapia génica ver as obras de Goldspiel *et al.*, *Clinical Pharmacy*, 12:488-505, 1993; Wu e Wu, *Biotherapy*, 3:87-95, 1991; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:573-596, 1993; Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993; e Morgan e Anderson, *Ann. Rev. biochem.* 62:191-217, 1993; TIBTECH 11(5):155-215, 1993. Os métodos vulgarmente conhecidos na especialidade da tecnologia do ADN recombinante, que é possível utilizar, foram descritos por Ausubel *et al.* (eds.), em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); e Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

De acordo com um aspecto preferencial, uma composição da invenção compreende ácidos nucleicos que codificam um anticorpo, sendo os referidos ácidos nucleicos uma parte de um vector de expressão que expressa o anticorpo num hospedeiro conveniente. Em particular, tais ácidos nucleicos possuem promotores, de preferência promotores heterólogos, funcionalmente ligados à região codificadora do anticorpo, sendo o referido promotor induzível ou constitutivo e, facultativamente, específico do tecido. De acordo com uma outra forma de realização particular, são utilizadas moléculas de ácidos nucleicos em que as

sequências que codificam o anticorpo e quaisquer outras sequências desejadas são flanqueadas por regiões que favorecem a recombinação homóloga num local desejado no genoma, favorecendo assim a expressão intracromossômica dos ácidos nucleicos que codificam o anticorpo (Koller e Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932-8935, 1989; e Zijlstra et al., Nature, 342:435-438, 1989).

De acordo com um outro aspecto preferencial, uma composição da invenção compreende ácidos nucleicos que codificam uma proteína de fusão, sendo os referidos ácidos nucleicos uma parte de um vector de expressão que expressa a proteína de fusão num hospedeiro conveniente. Em particular, tais ácidos nucleicos possuem promotores, de preferência promotores heterólogos, funcionalmente ligados a uma região codificadora de uma proteína de fusão, sendo o referido promotor induzível ou constitutivo e, facultativamente, específico do tecido. De acordo com uma outra forma de realização particular, são utilizadas moléculas de ácidos nucleicos em que a sequência codificadora da proteína de fusão e quaisquer outras sequências desejadas são flanqueadas por regiões que favorecem a recombinação homóloga num local desejado no genoma, favorecendo assim a expressão intracromossômica dos ácidos nucleicos que codificam a proteína de fusão.

A administração dos ácidos nucleicos a um paciente pode ser directa, caso em que o paciente é exposto directamente ao ácido nucleico ou aos vectores portadores do ácido nucleico, ou indirecta, caso em que as células são transformadas primeiro com os ácidos nucleicos *in vitro*, e são depois transplantadas para o paciente. Estas duas

metodologias são designadas, respectivamente, por terapia génica *in vivo* ou *ex vivo*.

De acordo com uma forma de realização concreta, as sequências de ácidos nucleicos são administradas directamente *in vivo*, para serem então expressas de modo a produzirem o produto codificado. Isto pode ser realizado por qualquer dos inúmeros métodos conhecidos na especialidade, *v.g.*, construindo-as como uma parte do vector adequado de expressão do ácido nucleico e administrando-as por forma a que passem a ser intracelulares, *v.g.*, por infecção, utilizando vectores retrovirais ou outros vectores virais imperfeitos ou atenuados (ver a patente de invenção norte-americana nº 4 980 286), ou por injeção directa de ADN desguarnecido, ou recorrendo ao bombardeamento com micropartículas (*v.g.*, uma pistola de genes; Biolistic, Dupont) ou recobrimo-as com lípidos ou com receptores da superfície celular ou com agentes de transfecção, por encapsulação em lipossomas, com micropartículas ou em microcápsulas, ou administrando-as conjugadamente com um péptido sobre o qual se sabe que penetra no núcleo, administrando-o conjugadamente com um ligando sujeito à endocitose mediada pelo receptor (ver, *v.g.*, Wu e Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987) (que pode ser utilizado para atingir tipos de células que expressem especificamente os receptores), etc.. De acordo com uma outra forma de realização, é possível preparar complexos de ácido nucleico-ligando em que o ligando compreende um péptido viral fusogénico para destruir os endossomas, permitindo que o ácido nucleico escape à degradação lipossómica. Ainda de acordo com mais uma outra forma de realização, o ácido nucleico pode ser aproveitado

in vivo para incorporação e expressão específicas na célula, sendo orientado para um receptor específico (ver, v.g., as publicações PCT com os n°s 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188; WO 93/20221). Em alternativa, o ácido nucleico pode ser introduzido intracelularmente e incorporado no ADN da célula hospedeira para expressão, por meio de recombinação homóloga (Koller e Smithies, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 86:8932-8935, 1989; e Zijlstra et al., Nature, 342:435-438, 1989).

De acordo com uma forma de realização concreta, são utilizados vectores virais que contêm sequências de ácidos nucleicos que codificam um anticorpo ou uma proteína de fusão. Por exemplo, é possível utilizar um vector retroviral (ver Miller et al., Meth. Enzymol., 217:581-599, 1993). Estes vectores retrovirais contêm os componentes necessários para o acondicionamento correcto do genoma viral e para a integração no ADN da célula hospedeira. As sequências de ácidos nucleicos que codificam o anticorpo ou a proteína de fusão, utilizáveis em terapia génica, são clonadas em um ou em vários vectores, o que facilita a administração da sequência nucleotídica a um paciente. É possível encontrar mais pormenores sobre vectores retrovirais na obra de Boesen et al., Biotherapy, 6:291-302, 1994, a qual descreve a utilização de um vector retroviral para administrar o gene *mdr 1* a células estaminais hematopoiéticas com a finalidade de se fazer com que as células estaminais sejam mais resistentes à quimioterapia. Outras obras de referência, que ilustram a utilização de vectores retrovirais em terapia génica, são: Clowes et al., J. Clin. Invest., 93:644-651, 1994; Klein et al., Blood 83:1467-1473, 1994; Salmons e

Gunzberg, *Human Gene Therapy*, 4:129-141, 1993; e Grossman e Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.*, 3:110-114, 1993.

Os adenovírus são outros vectores virais que podem ser utilizados em terapia génica. Os adenovírus são veículos especialmente atractivos para administrar genes aos epitélios respiratórios. Os adenovírus infectam naturalmente os epitélios respiratórios, causando uma doença ligeira. Outros alvos destinatários para os sistemas de administração à base de adenovírus são o fígado, o sistema nervoso central, as células endoteliais e os músculos. Os adenovírus têm a vantagem de serem capazes de infectarem células não divisoras. Os autores Kozarsky e Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development*, 3:499-503, 1993, apresentaram uma obra sobre a terapia génica à base de adenovírus. Os autores Bout et al., *Human Gene Therapy*, 5:3-10, 1994, demonstraram a utilização de vectores adenovirais para transferir genes para os epitélios respiratórios de macacos *Rhesus*. É possível encontrar outros exemplos da utilização de adenovírus em terapia génica nas obras de Rosenfeld et al., *Science*, 252:431-434, 1991; Rosenfeld et al., *Cell*, 68:143-155, 1992; Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.*, 91:225-234, 1993; na publicação PCT com o nº WO 94/12649; e na obra de Wang et al., *Gene Therapy*, 2:775-783, 1995. De acordo com uma forma de realização preferencial, são utilizados vectores adenovirais.

Também foi já proposto o vírus associado ao adenovírus (AAV) para utilização em terapia génica (ver, v.g., Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 204:289-300, 1993, e a patente de invenção norte-americana nº 5 436 146).

Uma outra metodologia para a terapia génica consiste em transferir um gene para células em cultura tecidual por

meio de métodos tais como electroporação, lipofecção, transfecção mediada pelo fosfato de cálcio ou por infecção viral. Normalmente, o método de transferência prevê a transferência de um marcador seleccionável para as células. As células são depois colocadas em condições de selecção para se isolar aquelas que tenham incorporado e que expressem o gene transferido. Tais células são depois administradas a um paciente.

De acordo com esta forma de realização, o ácido nucleico é introduzido numa célula antes de a célula recombinante resultante ser administrada *in vivo*. Tal introdução pode ser efectuada por meio de qualquer método conhecido na especialidade, incluindo, mas sem qualquer limitação, os métodos de transfecção, electroporação, microinjecção, infecção com um vector viral ou bacteriófago que contenha as sequências de ácido nucleico, fusão celular, transferência dos genes mediada pelos cromossomas, transferência dos genes mediada pelas micromicelas, fusão de esferoplastos, etc.. São conhecidas na especialidade diversas técnicas para a introdução de genes exógenos em células (ver, v.g., Loeffler e Behr, Meth. Enzymol., 217:599-618, 1993; Cohen et al., Meth. Enzymol., 217:618-644, 1993; e Clin. Pharma. Ther., 29:69-92, 1985), podendo todos eles ser utilizados em conformidade com a presente invenção, desde que não sejam afectadas as necessárias funções fisiológicas e as necessárias ao desenvolvimento das células beneficiadas. A técnica deve prever que haja uma transferência estável do ácido nucleico para a célula, de modo a que o ácido nucleico seja expressável pela célula e preferencialmente transmissível e expressável pela sua progenia celular.

As células recombinantes resultantes podem ser administradas a um paciente por meio de diversos métodos conhecidos na especialidade. As células sanguíneas recombinantes (v.g., células progenitoras ou estaminais hematopoiéticas) são administradas, preferencialmente, por via intravenosa. A quantidade prevista de células para tal utilização depende do efeito desejado, do estado de saúde do paciente, etc., podendo esse valor ser determinado por um especialista na matéria.

As células em que é possível introduzir um ácido nucleico, para efeitos de terapia génica, compreendem todos os tipos de células disponíveis e desejáveis, podendo ser, sem qualquer limitação, células epiteliais, células endoteliais, ceratinócitos, fibroblastos, células dos músculos, hepatócitos; células do sangue, tais como os linfócitos T, linfócitos B, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariócitos, granulócitos; diversas células progenitoras ou estaminais, em particular células progenitoras ou estaminais hematopoiéticas, v.g., tais como as obtidas a partir de medula óssea, a partir do sangue do cordão umbilical, do sangue periférico, de fígado fetal, etc..

De acordo com uma forma de realização preferencial, a célula utilizada para terapia génica é autóloga para o paciente.

De acordo com uma forma de realização em que são utilizadas células recombinantes em terapia génica, as sequências de ácidos nucleicos que codificam um anticorpo ou uma proteína de fusão são introduzidas nas células por forma a que sejam expressáveis pelas células ou pela sua progenia, sendo as células recombinantes administradas depois *in vivo* para efeitos terapêuticos. De acordo com uma

variante concreta, são utilizadas células progenitoras ou estaminais. De acordo com esta forma de realização da presente invenção é possível utilizar, potencialmente, todas as células progenitoras e/ou estaminais que possam ser isoladas e mantidas *in vitro* (ver, v.g., a publicação PCT com o nº WO 94/08598; Stemple e Anderson, Cell, 71:973-985, 1992; Rheinwald, Meth. Cell Bio., 21A:229, 1980; e Pittelkow e Scott, Mayo Clinic Proc., 61:771, 1986).

De acordo com uma forma de realização concreta, o ácido nucleico que irá ser introduzido para efeitos de terapia génica compreende um promotor induzível funcionalmente ligado a uma região codificadora, de tal modo que a expressão do ácido nucleico possa ser controlada mediante o controlo da presença ou da ausência do indutor de transcrição conveniente.

5.8. CARACTERIZAÇÃO E DEMONSTRAÇÃO DA UTILIDADE TERAPÊUTICA OU PROFILÁTICA

Os anticorpos, as proteínas de fusão e as moléculas conjugadas da presente invenção podem ser caracterizados de diversas maneiras. Em particular, é possível analisar os anticorpos da invenção para se pesquisar a sua aptidão para se ligarem imuno especificamente a um antigénio. Uma análise deste tipo pode ser efectuada em solução (v.g., Houghten, Bio/Techniques, 13:412-421, 1992), ou sobre esférulas (Lam, Nature, 354:82-84, 1991), sobre microplacas (Fodor, Nature, 364:555-556, 1993), em bactérias (patente de invenção norte-americana nº 5 223 409), em esporos (patentes de invenção norte-americanas nºs 5 571 698; 5 403 484; e 5 223 409), em plasmídeos (Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 89:1865-1869, 1992) ou em bacteriófagos (Scott e Smith, Science, 249:386-390, 1990; Devlin, Science, 249:404-406, 1990; Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382, 1990; e Felici, J. Mol. Biol., 222:301-310, 1991). Os anticorpos que tenham sido identificados pelo facto de se ligarem imunoespecificamente a um antígeno, ou a um seu fragmento, podem ser depois objecto de análise para se pesquisar a sua afinidade específica para com o antígeno

É possível analisar os anticorpos da invenção, ou os seus fragmentos, para se pesquisar a ligação imunoespecífica a um antígeno e para se pesquisar a inter-reactividade com outros antígenos, por meio de quaisquer métodos conhecidos na especialidade. As imunotálises que é possível fazer para se analisar a ligação imunoespecífica e a inter-reactividade compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os sistemas de análise competitiva e não competitiva, recorrendo a técnicas tais como a transferência de Western, radioimunotálises, protocolo ELISA (ensaio imunoenzimático), imunotálises em "sanduíche", análises por imunoprecipitação, reacções com precipitina, reacções com precipitina por difusão em gel, análises por imunodifusão, análises de aglutinação, análises de fixação competente, análises imunorradiométricas, imunotálises fluorescentes, imunotálises com proteína A, isto apenas para designar alguns desses métodos. Tais análises são vulgares e perfeitamente conhecidas na especialidade (ver, v.g., Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Descreve-se adiante imunotálises exemplificativas, de uma forma abreviada (mas não se pretende com isso impor qualquer limitação).

Os protocolos de imunoprecipitação compreendem geralmente a lise de uma população de células num tampão de lise, tal como o tampão RIPA (1% de NP-40 ou Triton X-100, 1% de desoxicolato de sódio, 0,1% de SDS, NaCl 0,15 M, fosfato de sódio 0,01 M a pH 7,2, 1% de Trasilol) enriquecido com fosfatase proteica e/ou inibidores das proteases (v.g., EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sódio), acrescentando-se o anticorpo relevante ao lisado celular e mantendo tudo a incubar durante um intervalo de tempo (v.g., entre 1 e 4 horas) a 40°C, acrescentando ao lisado celular esférulas de sefarose contendo proteína A e/ou proteína G, mantendo tudo a incubar durante cerca de 1 hora ou mais a 40°C, lavando as esférulas em tampão de lise e recolocando as esférulas em suspensão em tampão de SDS/amostra. É possível determinar a aptidão do anticorpo relevante para imunoprecipitar um antigénio particular, v.g., por análise de transferência de Western. Um especialista na matéria sabe quais são os parâmetros que podem modificar para aumentar a ligação do anticorpo a um antigénio e para reduzir os fenómenos espontâneos (v.g., limpando previamente o lisado celular com esférulas de sefarose). Para um estudo complementar sobre protocolos de imunoprecipitação, ver, v.g., Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York a 10.16.1.

A análise de transferência de Western consiste, geralmente, em preparar amostras de proteínas, efectuar a electroforese das amostras de proteínas num gele de poliacrilamida (v.g., SDS-PAGE entre 8%-20%, consoante o peso molecular do antigénio), transferir a amostra de proteína do gel de poliacrilamida para uma membrana, por

exemplo, de nitrocelulose, PVDF ou nylon, bloquear a membrana uma solução de bloqueio (v.g., PBS com 3% de BSA ou leite magro), lavar a membrana com tampão de lavagem (v.g., PBS-Tween 20), bloquear a membrana com o anticorpo primário (o anticorpo relevante) diluído em tampão de bloqueio, lavar a membrana em tampão de lavagem, bloquear a membrana com um anticorpo secundário (que reconheça o anticorpo primário, v.g., um anti-anticorpo humano) conjugado com um substrato enzimático (v.g., peroxidase de *Armoracia rusticana* ou fosfatase alcalina) ou com uma molécula radioactiva (v.g., ^{32}P ou ^{125}I) diluída no tampão de bloqueio, lavar a membrana com tampão de lavagem e detectar a presença do antigénio. Um especialista na matéria sabe quais são os parâmetros que pode modificar para aumentar o sinal detectado e para reduzir o ruído espontâneo. Para um estudo suplementar dos protocolos de transferência de Western, ver, v.g., Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York a 10.8.1.

O protocolo ELISA consiste em preparar o antigénio, recobrir com o antigénio as cavidades de uma placa de microtitulação de 96 cavidades, acrescentar à cavidade o anticorpo relevante conjugado com um composto detectável, tal como um substrato enzimático (v.g., peroxidase de *Armoracia rusticana* ou fosfatase alcalina) e manter tudo a incubar durante um intervalo de tempo, detectando a presença do antigénio. Nos protocolos ELISA o anticorpo relevante não tem de estar conjugado com um composto detectável; em vez disso, é possível acrescentar à cavidade um anticorpo secundário (que reconheça o anticorpo relevante) conjugado com um composto detectável. Além

disso, em vez de se recobrir a cavidade com o antigénio, é possível recobrir a cavidade com o anticorpo. Neste caso, é possível acrescentar um anticorpo secundário conjugado com um composto detectável, seguindo-se a adição do antigénio relevante à cavidade recoberta. Um especialista na matéria sabe quais são os parâmetros que pode modificar para aumentar o sinal detectado e conhece também outras variantes dos protocolos ELISA existentes na especialidade. Para um estudo complementar sobre protocolos ELISA, ver, *v.g.*, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York a 11.2.1.

A afinidade de ligação de um anticorpo a um antigénio e o índice de dissociação de uma interacção anticorpo-antigénio podem ser determinados por meio de análises de ligação competitiva. Como exemplo de uma análise de ligação competitiva refere-se uma radioimunoanálise que compreende a incubação de um antigénio marcado (*v.g.*, ^3H ou ^{125}I) com o anticorpo relevante, na presença de quantidades cada vez maiores de antigénio não marcado, e a detecção do anticorpo ligado ao antigénio marcado. A afinidade do anticorpo da presente invenção, ou de um seu fragmento, para com o antigénio e os parâmetros de dissociação podem ser determinados a partir dos dados de saturação, por análise de Scatchard. Também é possível determinar a competição com um segundo anticorpo, recorrendo a radioimunoanálises. Neste caso, mantém-se o antigénio a incubar com um anticorpo da presente invenção, ou com um seu fragmento, conjugado com um composto marcado (*v.g.*, ^3H ou ^{125}I) na presença de quantidades cada vez maiores de um segundo anticorpo não marcado.

De acordo com uma forma de realização preferencial, utiliza-se a análise cinética BIAcore para se determinar os parâmetros de ligação e de dissociação entre anticorpos e um antigénio. A análise cinética BIAcore consiste em analisar a ligação e a dissociação de um antigénio a partir de microplacas com anticorpos imobilizados sobre a sua superfície (ver o exemplo da secção *infra*).

Também é possível analisar os compostos da invenção, as proteínas de fusão e as moléculas conjugadas, para se pesquisar a sua aptidão para inibirem a ligação de um antigénio ao seu receptor na célula hospedeira, utilizando técnicas perfeitamente conhecidas pelos especialistas na matéria. Por exemplo, as células em que tem lugar a expressão do receptor para um antigénio viral podem ser levadas a contactar com o vírus na presença ou na ausência de um anticorpo e é possível medir a aptidão do anticorpo para inibir a ligação ao antigénio viral, por exemplo, por citometria de fluxo ou por meio de um contador de cintilação. O antigénio, ou o anticorpo, pode ser marcado com um composto detectável, tal como um identificador radioactivo (v.g., ^{32}P , ^{35}S e ^{125}I) ou um identificador fluorescente (v.g., isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldeído e fluorescamina) para permitir a detecção de uma interacção entre o antigénio e o seu receptor na célula hospedeira. Em alternativa, é possível determinar a aptidão dos anticorpos para inibirem a ligação de um antigénio ao seu receptor, por meio de análises sem células. Por exemplo, é possível fazer contactar um vírus ou um antigénio viral (v.g., a glicoproteína F do RSV), numa análise sem células, com um anticorpo e é possível determinar a aptidão do anticorpo

para inibir a ligação do vírus, ou do antígeno viral, ao seu receptor na célula hospedeira. De preferência, imobiliza-se o anticorpo sobre um suporte sólido e marca-se o antígeno com um composto detectável. Em alternativa, imobiliza-se o antígeno sobre um suporte sólido e marca-se o anticorpo com um composto detectável. O antígeno pode ser parcial ou totalmente purificado (v.g., parcial ou totalmente isento de outros polipeptidos) ou pode fazer parte de um lisado celular. Além disso, o antígeno pode ser uma proteína de fusão que compreenda o antígeno viral e um domínio tal como o de glutathionina-S-transferase. Em alternativa, é possível biotinilar o antígeno, recorrendo a técnicas perfeitamente conhecidas pelos especialistas na matéria (v.g., utilizando um estojo de biotinilação, Pierce Chemicals; Rockford, IL).

Também é possível analisar os anticorpos, as proteínas de fusão e as moléculas conjugadas da presente invenção, para se pesquisar a sua aptidão para inibirem ou diminuírem a replicação viral ou bacteriana, utilizando técnicas perfeitamente conhecidas pelos especialistas na matéria. Por exemplo, é possível analisar a replicação viral por meio de um teste de análise em placas, tal como o descrito, v.g., por Johnson et al., *Journal of Infectious Diseases*, 176:1215-1224, 1997. Também é possível analisar os anticorpos, proteínas de fusão e moléculas conjugadas da invenção para se pesquisar a sua aptidão para inibirem ou diminuírem a expressão de polipeptidos virais ou bacterianos. É possível recorrer a técnicas conhecidas pelos especialistas na matéria, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, a análise de transferência de Western, a análise de absorção Northern e o protocolo de

RT-PCR para se medir a expressão de polipeptidos virais ou bacterianos. Além disso, é possível analisar os anticorpos, as proteínas de fusão e as moléculas conjugadas da invenção, para se avaliar a sua aptidão para prevenirem a formação de sincícios.

Os anticorpos, as proteínas de fusão, as moléculas conjugadas e as composições da invenção são testados preferencialmente *in vitro* e depois *in vivo* para se pesquisar a desejada actividade terapêutica ou profilática, antes da sua utilização em seres humanos. Por exemplo, as análises *in vitro* a que é possível recorrer para se determinar se a administração de um anticorpo concreto, uma proteína de fusão concreta, uma molécula conjugada concreta ou uma composição da presente invenção é considerada apropriada, compreendem as análises de culturas de células *in vitro* em que uma amostra de um tecido de um indivíduo é objecto de desenvolvimento em cultura e é exposta ou de qualquer outra forma colocada em contacto com um anticorpo, uma proteína de fusão, uma molécula conjugada ou uma composição da presente invenção e se observa o efeito de tal anticorpo, proteína de fusão, molécula conjugada ou composição da presente invenção sobre a amostra de tecido. Em diversas formas de realização concretas, é possível efectuar experiências *in vitro* com células representativas de tipos celulares, implicadas numa doença ou numa patologia, para se determinar se um anticorpo, uma proteína de fusão, uma molécula conjugada ou uma composição da presente invenção tem o efeito desejado sobre tais tipos celulares. De preferência, os anticorpos, as proteínas de fusão, as moléculas conjugadas ou as composições da invenção também são objecto de experiências e análises *in*

vitro e em sistemas ou modelos com animais antes da sua administração a seres humanos.

Os anticorpos, as proteínas de fusão, as moléculas conjugadas ou as composições da presente invenção para utilização em terapia podem ser experimentados para se pesquisar a sua toxicidade em sistemas adequados de modelos com animais, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, ratos, murganhos, bovinos, macacos e coelhos. Para os testes *in vivo*, para se pesquisar a toxicidade de um anticorpo, de uma proteína de fusão, de uma molécula conjugada ou de uma composição, é possível recorrer a todos os sistemas de modelos com animais, conhecidos na especialidade.

A eficácia no tratamento ou na prevenção de uma infecção viral pode ser demonstrada detectando a aptidão de um anticorpo, de uma proteína de fusão, de uma molécula conjugada ou de uma composição da invenção para inibir a replicação do vírus, para inibir a transmissão ou para impedir que o vírus se instale no hospedeiro, ou para prevenir, melhorar ou mitigar um ou vários dos sintomas associados à infecção viral. Considera-se que o tratamento é terapêutico se houver, por exemplo, uma redução da carga viral, a mitigação de um ou vários sintomas ou a diminuição de mortalidade e/ou morbidade após a administração de um anticorpo, de uma proteína de fusão, de uma molécula conjugada ou de uma composição da invenção. Os anticorpos, as proteínas de fusão, as moléculas conjugadas ou as composições da invenção também podem ser testados para se pesquisar a sua aptidão para inibirem a replicação viral ou para reduzirem a carga viral em experiências *in vitro* e *in vivo*.

A eficácia no tratamento ou prevenção de uma infecção bacteriana pode ser demonstrada detectando a aptidão de um anticorpo, de uma proteína de fusão ou de uma composição da invenção para inibir a replicação bacteriana ou para prevenir, melhorar ou mitigar um ou vários dos sintomas associados à infecção bacteriana. O tratamento é considerado terapêutico se houver, por exemplo, uma redução dos índices bacterianos, uma melhoria de um ou vários sintomas ou uma diminuição da mortalidade e/ou morbidade após a administração de um anticorpo, de uma proteína de fusão ou de uma composição da invenção.

É possível demonstrar a eficácia no tratamento de cancro detectando a aptidão de um anticorpo, de uma proteína de fusão, de uma molécula conjugada ou de uma composição da invenção para inibir ou reduzir o crescimento ou as metástases de células cancerosas ou para melhorar ou mitigar um ou vários dos sintomas associados ao cancro. Considera-se que o tratamento é terapêutico se houver, por exemplo, uma redução do crescimento ou das metástases de células cancerosas, uma melhoria de um ou vários dos sintomas associados ao cancro ou uma diminuição da mortalidade e/ou morbidade após a administração de um anticorpo, de uma proteína de fusão, de uma molécula conjugada ou de uma composição da invenção. Os anticorpos, as proteínas de fusão ou as composições da invenção podem ser objecto de testes para se pesquisar a sua aptidão para reduzirem a formação de um tumor em experiências *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

É possível demonstrar a eficácia no tratamento de patologias inflamatórias, detectando a aptidão de um anticorpo, de uma proteína de fusão, de uma molécula

conjugada ou de uma composição da invenção para reduzir ou inibir a inflamação num animal ou para melhorar ou mitigar um ou vários dos sintomas associados a uma patologia inflamatória. Considera-se que o tratamento é terapêutico se houver, por exemplo, uma redução da inflamação ou uma melhoria de um ou vários sintomas após a administração de um anticorpo, de uma proteína de fusão, de uma molécula conjugada ou de uma composição da invenção.

Os anticorpos, as proteínas de fusão, as moléculas conjugadas ou as composições da invenção podem ser testados *in vitro* e *in vivo* para se pesquisar a sua aptidão para induzirem a expressão de citocinas (v.g., IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-15) e de marcadores de activação (v.g., CD28, ICOS e SLAM). É possível recorrer a técnicas conhecidas pelos especialistas na matéria para se medir o nível de expressão de citocinas e de marcadores de activação. Por exemplo, é possível medir o nível de expressão de citocinas, analisando o nível de ARN de citocinas, por exemplo, pelo protocolo de RT-PCR e por análise de absorção Northern e também analisando o nível de citocinas, por exemplo, por imunoprecipitação seguindo-se uma análise de transferência de Western ou um protocolo ELISA.

Os anticorpos, as proteínas de fusão, as moléculas conjugadas ou as composições da invenção podem ser testados *in vitro* e *in vivo* para se pesquisar a sua aptidão para modularem a actividade biológica de células imunes, de preferência células humanas imunes (v.g., células T, células B e células aniquiladoras naturais). É possível avaliar a aptidão de um anticorpo, de uma proteína de fusão, de uma molécula conjugada ou de uma composição da

invenção para modular a actividade biológica de células imunes, detectando a expressão de antigénios, detectando a proliferação de células imunes, detectando a activação de moléculas de sinalização, detectando a função efectora de células imunes ou detectando a diferenciação de células imunes. Para a medição destas actividades é possível recorrer a técnicas conhecidas pelos especialistas na matéria. Por exemplo, é possível avaliar a proliferação celular por meio de experiências de incorporação de 3H-timidina e corante azul de tripano e fazendo a contagem das células. É possível avaliar a expressão antigénica, por exemplo, por meio de imunoanálises, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os sistemas de ensaios competitivos e não competitivos, utilizando técnicas tais como as análises de transferência de Western, análises de imuno-histoquímica, radioimunoanálises, protocolo ELISA (análise imunossorvente ligada a enzimas), imunoanálises em "sanduíche", análises de imunoprecipitação, reacções com precipitina, reacções com precipitina por difusão em gel, análises de imunodifusão, análises de aglutinação, análises de fixação do complemento, análises imunorradiométricas, imunoanálises fluorescentes, imunoanálises com proteína A e análises de selecção 'FACS'. A activação de moléculas de sinalização pode ser confirmada, por exemplo, por meio de análises com cinases e análises de deslocamento electroforético (EMSA).

Os anticorpos, as proteínas de fusão, as moléculas conjugadas ou a composições da invenção também podem ser testados para se pesquisar a sua aptidão para aumentarem o período de sobrevivência de animais, de preferência mamíferos e mais preferencialmente seres humanos, que padeçam de uma

doença, patologia ou infecção, pelo menos 25%, de preferência pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 75%, pelo menos 85%, pelo menos 95% ou pelo menos 99%. Mais ainda, os anticorpos, as proteínas de fusão, as moléculas conjugadas ou as composições da invenção podem ser testados para se pesquisar a sua aptidão para reduzirem o tempo de hospitalização de animais, de preferência mamíferos e mais preferencialmente seres humanos, que padeçam de uma doença, patologia ou infecção, pelo menos 60%, preferencialmente pelo menos 75%, pelo menos 85%, pelo menos 95% ou pelo menos 99%. É possível recorrer a técnicas conhecidas pelos especialistas na matéria para se analisar a função dos anticorpos ou das composições da invenção *in vivo*.

5.9. APLICAÇÕES DE DIAGNÓSTICO PARA OS ANTICORPOS E PROTEÍNAS DE FUSÃO

Os anticorpos marcados, as proteínas de fusão marcadas e as moléculas conjugadas da invenção também marcadas, podem ser utilizados para fins de diagnóstico para se detectar, diagnosticar ou monitorizar doenças, patologias ou infecções. A invenção prevê a detecção ou o diagnóstico de uma doença, patologia ou infecção, de acordo com os passos seguintes: (a) determinar a expressão de um antigénio em células ou numa amostra de um tecido de um paciente, utilizando um ou vários anticorpos que se liguem imuno especificamente ao antigénio; e (b) comparar o nível de antigénio com um nível de referência, *v.g.*, os níveis observados em amostras de tecidos normais, pelo que um aumento do nível verificado de antigénio, comparativamente com o nível de referência do antigénio, é um indicador da

existência de uma doença, patologia ou infecção. A invenção também prevê a detecção ou o diagnóstico de uma doença, patologia ou infecção, de acordo com os passos seguintes: (a) determinar a expressão de um antígeno em células ou numa amostra de um tecido de um paciente, utilizando uma ou várias proteínas de fusão ou moléculas da invenção que se liguem ao antígeno; e (b) comparar o nível do antígeno com um nível de referência, *v.g.*, os níveis observados em amostras de tecidos normais, pelo que um aumento do nível de antígeno, comparativamente com o nível de referência do antígeno, é um indicador da existência de uma doença, patologia ou infecção. Assim sendo, a proteína de fusão, ou a molécula conjugada, compreende uma molécula bioactiva, tal como um ligando, uma citocina ou um factor de crescimento e a região de Fc-charneira, ou os seus fragmentos, em que a proteína de fusão, ou a molécula conjugada, é capaz de se ligar a um antígeno que se pretende detectar.

Os anticorpos da invenção podem ser utilizados para a determinação de níveis de antígenos numa amostra biológica, recorrendo a métodos imuno-histológicos, conforme aqui descrito ou conforme é sabido pelos especialistas na matéria (*v.g.*, ver Jalkanen *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 101:976-985, 1985; Jalkanen *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 105:3087-3096, 1987). Outros métodos à base de anticorpos, úteis para a detecção da expressão de genes de proteínas, compreendem as análises imunoquímicas, tais como as análises imunossorventes ligadas a enzimas (ELISA) e as radioimunoanálises (RIA). Os marcadores adequados para análises de anticorpos são conhecidos na especialidade e compreendem os marcadores enzimáticos, tais como a fosfatase alcalina e a glicose-oxidase; os radioisótopos, tais como os de iodo (^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), enxofre (^{35}S), trítio (^3H), índio (^{121}In) e

tecnécio (^{99m}Tc); os marcadores luminescentes, tais como o luminol; e os marcadores fluorescentes, tais como a fluoresceína e a rodamina.

As proteínas de fusão podem ser utilizadas para se analisar os níveis de antígenos numa amostra biológica, utilizando, por exemplo, o protocolo de SDS-PAGE e as análises imunoquímicas, conhecidos pelos especialistas na matéria.

Um dos aspectos da invenção é a detecção e o diagnóstico de uma doença, patologia ou infecção num ser humano. De acordo com uma forma de realização, o diagnóstico compreende os passos seguintes: a) administrar a um paciente (por exemplo, pelas vias parentérica, subcutânea ou intraperitoneal) uma quantidade eficaz de um anticorpo marcado que se ligue imuno especificamente a um antígeno; b) esperar durante um intervalo de tempo, após a administração, para permitir que o anticorpo se concentre preferencialmente nos locais do paciente onde o antígeno é expresso (e para que qualquer molécula marcada e não ligada seja eliminada até se atingir o nível natural espontâneo); c) determinar o nível natural espontâneo; e (d) detectar no paciente o anticorpo marcado, de tal modo que uma detecção de anticorpo marcado acima do nível natural espontâneo indica que o paciente padece da doença, patologia ou infecção. De acordo com esta forma de realização, o anticorpo é marcado com um radical de imagiologia que é detectável utilizando um sistema de imagiologia conhecido pelos especialistas na matéria. O nível natural espontâneo pode ser determinado por meio de diversos métodos, incluindo a comparação da quantidade detectada de moléculas marcadas com um valor normalizado previamente determinado para um sistema particular. De acordo com uma outra forma

de realização, o diagnóstico compreende os passos seguintes: a) administrar a um paciente (por exemplo, pelas vias parentérica, subcutânea ou intraperitoneal) uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão marcada, ou de uma molécula conjugada, que se ligue a um antigénio ou a qualquer outra molécula; b) esperar durante um intervalo de tempo, após a administração, para permitir que a proteína de fusão marcada, ou a molécula conjugada marcada, se concentre preferencialmente nos locais do paciente em que o antigénio, ou qualquer outra molécula, seja expresso (e para que as moléculas marcadas e não ligadas sejam eliminadas até atingirem o nível natural espontâneo); c) determinar o nível natural espontâneo; e (d) detectar no paciente a proteína de fusão marcada, ou a molécula conjugada marcada, de tal modo que a detecção da proteína de fusão marcada, acima do nível natural espontâneo, indica que o paciente padece da doença, patologia ou infecção. De acordo com esta forma de realização, a proteína de fusão, ou a molécula conjugada, compreende uma molécula bioactiva, tal como um ligando, uma citocina ou um factor de crescimento e uma região de Fc-charneira, ou um seu fragmento, em que a referida proteína de fusão, ou a referida molécula conjugada, é marcada com um radical de imagiologia e é capaz de se ligar ao antigénio que se pretende detectar.

Faz-se observar, no domínio da especialidade, que a massa corporal do paciente e o sistema de imagiologia utilizado irão determinar a quantidade de radicais de imagiologia necessários para a produção de imagens de diagnóstico. No caso de um radical radioisótopo, para um ser humano, a quantidade de radioactividade injectada irá estar compreendida, normalmente, entre cerca de 5 e 20

millicuries de ^{99m}Tc . O anticorpo marcado irá então acumular-se, preferencialmente, no local onde estão as células que contenham uma proteína específica. A imagiologia de tumores *in vivo* foi descrita por S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel e B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

Dependendo de diversas variáveis, incluindo o tipo de identificador utilizado e do modo de administração, o intervalo de tempo decorrido após a administração, para permitir que a molécula marcada com o identificador se concentre preferencialmente nos locais pretendidos no paciente e para que as moléculas marcadas com o identificador e não ligadas sejam eliminadas até atingirem o nível natural espontâneo, é de 6 a 48 horas ou de 6 a 24 horas ou de 6 a 12 horas. De acordo com uma outra forma de realização, o intervalo de tempo após a administração é de 5 a 20 dias ou de 5 a 10 dias.

De acordo com uma forma de realização, a monitorização da doença, patologia ou infecção é efectuada repetindo o método para o diagnóstico da doença, da patologia ou da infecção, por exemplo, um mês após o diagnóstico inicial, seis meses após o diagnóstico inicial ou um ano após o diagnóstico inicial, etc..

A presença da molécula marcada pode ser detectada no paciente, utilizando métodos conhecidos na especialidade para a despistagem *in vivo*. Estes métodos dependem do tipo de identificador utilizado. Os especialistas na matéria sabem como determinar o método conveniente para a detecção de um identificador particular. Os processos e dispositivos que é

possível utilizar nos métodos de diagnóstico da invenção compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, a tomografia computadorizada (TC), o esquadrinhamento de todo o corpo, por exemplo, por tomografia por emissão de positrões (PET), a imagiologia por ressonância magnética (MRI) e a sonografia.

De acordo com uma forma de realização concreta, a molécula é marcada com um radioisótopo e é detectada no paciente, utilizando um instrumento cirúrgico sensível à radiação (Thurston et al., patente de invenção norte-americana nº 5 441 050). De acordo com uma outra forma de realização, a molécula é marcada com um composto fluorescente e é detectada no paciente, utilizando um instrumento de detecção sensível à fluorescência. De acordo com uma outra forma de realização, a molécula é marcada com um metal emissor de positrões e é detectada no paciente por tomografia por emissão de positrões. Ainda de acordo com mais uma outra forma de realização, a molécula é marcada com um identificador paramagnético e é detectada num paciente por imagiologia de ressonância magnética (MRI).

5.10. ESTOJOS

A invenção proporciona também uma embalagem ou estojo farmacêutico contendo um ou vários recipientes onde estão acondicionados um ou vários dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Facultativamente, a tais recipientes pode estar associada uma nota informativa, a abrigo de prescrições de uma agência governamental, regulando o fabrico, a utilização ou a comercialização de produtos farmacêuticos ou biológicos, reflectindo o facto

de essa agência ter aprovado o fabrico, a utilização ou a comercialização para administração a seres humanos.

A presente invenção proporciona estojos que podem ser utilizados nos métodos supramencionados. De acordo com uma forma de realização, um estojo contém um anticorpo, uma proteína de fusão ou uma molécula conjugada da invenção, de preferência, numa forma purificada, em um ou em vários recipientes. De acordo com uma forma de realização concreta, os estojos da presente invenção contêm, como contraprova de referência, um antigénio substancialmente isolado. De preferência, os estojos da presente invenção contêm também um anticorpo, uma proteína de fusão ou uma molécula conjugada, enquanto contraprovas de referência, que não reagem com o antigénio contido no estojo. De acordo com uma outra forma de realização concreta, os estojos da presente invenção contêm meios para se detectar a ligação de um anticorpo, ou de uma proteína de fusão ou de uma molécula conjugada, a um antigénio (v.g., o anticorpo, ou a proteína de fusão ou a molécula conjugada, pode ser conjugado com um substrato detectável, tal como um composto fluorescente, com um substrato enzimático, com um composto radioactivo ou com um composto luminescente, ou então é possível conjugar um segundo anticorpo, que reconheça o primeiro anticorpo, com um substrato detectável). Em formas de realização concretas, o estojo pode conter um antigénio sintetizado por via química ou produzido por via recombinante. O antigénio contido no estojo também pode estar fixado a um suporte sólido. De acordo com uma forma de realização mais concreta, os meios para a detecção contidos no estojo supramencionado compreendem um suporte sólido ao qual o antigénio esteja fixado. Um estojo deste tipo pode conter também um anti-

anticorpo humano não fixado e marcado com um identificador repórter. De acordo com esta forma de realização, a ligação do anticorpo ao antígeno pode ser detectada ligando o referido anticorpo marcado com o identificador repórter.

5.11. ANÁLISES IN VITRO E IN VIVO PARA O PERÍODO DE SEMIVIDA PROLONGADO DE FRAGMENTOS DA REGIÃO DE FC-CHARNEIRA DA IgG MODIFICADA

A aptidão das IgG modificadas e de moléculas que compreendam um domínio constante de IgG, ou um seu fragmento, para ligação ao FcRn pode ser caracterizada por meio de diversas experiências *in vitro*. A publicação PCT com o nº WO 97/34631, da autoria de Ward, descreve diversos métodos pormenorizadamente.

Por exemplo, para se comparar a aptidão da IgG modificada, ou dos seus fragmentos, para se ligar ao FcRn com a aptidão correspondente da IgG de tipo selvagem, é possível marcar com radioisótopos a IgG modificada, ou os seus fragmentos, e a IgG de tipo selvagem, fazendo-as reagir *in vitro* com células em que tem lugar a expressão do FcRn. É possível contar depois e comparar a radioactividade das fracções ligadas às células. As células que expressam o FcRn, utilizáveis neste ensaio, são preferencialmente linhagens de células endoteliais, incluindo as células endoteliais capilares dos pulmões de murganho (B10, D2.PCE), obtidas a partir de pulmões de murganhos B10.DBA/2, e células endoteliais transformadas com SV40 (SVEC) (Kim et al., J. Immunol., 40:457-465, 1994), obtidas a partir de murganhos C3H/HeJ. Além disso, também é possível utilizar outros tipos de células, tais como as células de vilosidades

intestinais, isoladas a partir de murganhos ainda amamentados, com idades entre 10 e 14 dias, que expressem um número suficiente de FcRn. Em alternativa, também é possível utilizar células de mamíferos que expressem o FcRn recombinante de uma espécie seleccionada. Após a contagem da radioactividade da fracção ligada de IgG modificada, ou da IgG de tipo selvagem, é possível extrair as moléculas ligadas, utilizando um detergente, sendo calculados e comparados os valores de libertação percentual por número unitário de células.

A afinidade das IgG modificadas para com o FcRn pode ser medida por ressonância do plasmão superficial (SPR) utilizando, por exemplo, a tecnologia 'BIAcore 2000' (BIAcore Inc.), conforme anteriormente descrito (Popov *et al.*, Mol. Immunol., 33:493-502, 1996; Karlsson *et al.*, J. Immunol. Methods, 145:229-240, 1991). De acordo com este método, as moléculas de FcRn são acopladas a uma microplaca detectora 'BIAcore' (v.g., uma microplaca CM5 fornecida por 'Pharmacia'), mede-se a ligação da IgG modificada ao FcRn imobilizado, para um determinado valor do caudal, para se obter sensogramas, utilizando para tal a aplicação informática de avaliação BIA 2.1, e com base nisto é possível calcular os parâmetros de associação e dissociação das IgG modificadas, dos seus domínios constantes, ou dos seus fragmentos, ao FcRn.

Também é possível medir as afinidades relativas das IgG modificadas, ou dos seus fragmentos, e da IgG de tipo selvagem, para com o FcRn, por meio de uma análise simples de ligação competitiva. Adiciona-se IgG modificada, não marcada, ou IgG de tipo selvagem, em quantidades diferentes, às cavidades de uma placa de 96 cavidades em que se encontram imobilizados os FcRn. Acrescenta-se depois

a cada cavidade uma quantidade constante de IgG de tipo selvagem, marcada com radioisótopos. Traça-se um gráfico do valor percentual da radioactividade da fracção ligada, em função da quantidade de IgG modificada e não marcada, ou em função da IgG de tipo selvagem e a partir da inclinação da curva é possível calcular a afinidade relativa da região de Fc-charneira modificada.

Além disso, também é possível medir as afinidades das IgG modificadas, ou dos seus fragmentos, e da IgG de tipo selvagem, para com o FcRn, por meio de um estudo de saturação e por análise de Scatchard.

A transferência da IgG modificada, ou dos seus fragmentos, através da célula, por acção do FcRn, pode ser medida por meio de uma análise de transferência *in vitro*, utilizando a IgG ou os seus fragmentos marcados com radioisótopos e células em que tem lugar a expressão de FcRn e comparando a radioactividade observada num dos lados da monocamada celular com a observada no outro lado. Em alternativa, tal transferência pode ser medida *in vivo*, alimentando murganhos, ainda em fase de amamentação, com idades entre 10 e 14 dias, com IgG modificada e marcada com radioisótopos e fazendo uma contagem periódica da radioactividade observada em amostras de sangue, indicando isso a existência de transferência de IgG do intestino para a circulação (ou para qualquer outro tecido destinatário, v.g., os pulmões). Para se testar a inibição, dependente da dose, da transferência de IgG através do intestino, é possível administrar aos murganhos uma mistura de IgG marcada com radioisótopos e de IgG não marcada, em determinadas proporções, sendo então medida periodicamente

a radioactividade existente no plasma (Kim et al., Eur. J. Immunol., 24:2429-2434, 1994).

É possível medir o período de semivida da IgG modificada, ou dos seus fragmentos, por meio de estudos de farmacocinética, em conformidade com o método descrito por Kim et al. (Eur. J. of Immuno. 24:542, 1994). De acordo com este método, a IgG modificada ou os seus fragmentos marcados com radioisótopos são injectados por via intravenosa em murganhos e depois mede-se periodicamente a concentração no plasma em função do tempo, por exemplo, no período que medeia entre 3 minutos e 72 horas após a injeção. A curva de depuração assim obtida deve ser bifásica, isto é, referente à fase α e à fase β . Para a determinação do período de semivida das IgG modificadas, ou dos seus fragmentos, *in vivo*, calcula-se a velocidade de depuração na fase β e compara-se com a observada para a IgG de tipo característico natural.

6. EXEMPLOS

Os exemplos seguintes ilustram a produção, o isolamento e a caracterização de fragmentos de Fc-charneira modificados que possuem períodos de semivida mais longos *in vivo*.

6.1 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS

6.1.1 REAGENTES

Todos os compostos químicos utilizados tinham qualidade analítica. As enzimas de restrição e as enzimas modificadoras de ADN foram adquiridas a New England

Biolabs, Inc. (Beverly, MA). Os oligonucleótidos foram sintetizados por MWG Biotech, Inc. (High Point, NC). O vector fagomídeo pCANTAB5E, o conjugado de anti-E-identificador-peroxidase de *Armoracia rusticana*, a estirpe TG1 de *E. Coli*, as colunas de 'Fast Flow' contendo Sepharose 6 com IgG e as colunas de proteína A 'HiTrap' foram adquiridos a APBiotech, Inc. (Piscataway, NJ). O bacteriófago auxiliar VCSM13 e o estojo de mutagênese de modificação rápida foram adquiridos a Stratagene (La Jolla, CA). A estirpe CJ236 de *E. coli* foi adquirida a Bio-Rad (Richmond, CA). O estojo com os reagentes de análises e proteínas 'BCA' foi adquirido à Pierce (Rockford, IL). A lipofectamina 2000 foi adquirida a Invitrogen, Inc. (Carlsbad, CA).

6.1.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS FcRn DE MURINOS E DE SERES HUMANOS

As sequências de aminoácidos dos FcRn de seres humanos e de murinos são, respectivamente, as sequências SEQ ID NOs. 84 e 85 (ver também Firan et al., Intern. Immunol., 13:993-1002, 2001 e Popov et al., Mol. Immunol., 33:521-530, 1996). O FcRn humano também foi obtido após isolamento do ADNc placentário humano (Clontech, Palo Alto, CA) dos genes para a microglobulina $\beta 2$ humana (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, DC) e dos codões -23 a 267 da cadeia α humana (Story et al., J. Exp. Med., 180:2377-2381, 1994), recorrendo a protocolos convencionais de PCR. As cadeias leve e pesada, conjuntamente com a sua sequência de sinal natural (Kabat et al., 1991,

supra; Story et al., *supra*) foram clonadas, respectivamente, nos bacmídeos pFastBac DUAL e pFastBac1, tendo as provisões virais sido produzidas em células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9), em conformidade com as instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Foram infectadas células 'High-Five' com um índice de multiplicidade infecciosa igual a 3, com os baculovírus que codificam as cadeias α e $\beta 2$, praticando protocolos existentes nos circuitos comerciais (Invitrogen). O FcRn humano recombinante foi purificado do modo seguinte: retirou-se o sobrenadante de células de insectos infectadas e submeteu-se à acção de MES 50 mM (ácido 2-N-[morfolino]etano-sulfónico) a pH 6,0 e aplicou-se o produto obtido a uma coluna 'Fast Flow' contendo Sepharose 6 e 10 mL de IgG humana (APBiotech, Piscataway, NJ). Lavou-se a resina com 200 mL de MES 50 mM a pH 6,0 e efectuou-se a eluição do FcRn com Tris-Cl 0,1 M a pH 8,0. Efectuou-se a diálise do FcRn purificado em presença de MES 50 mM a pH 6,0, congelou-se instantaneamente e guardou-se a -70°C . Efectuou-se a confirmação da pureza das proteínas pelos protocolos de SDS-PAGE e por HPLC.

6.1.3 PREPARAÇÃO DO MOLDE DE URACILO COM ssDNA CONTENDO TAA

A construção de bibliotecas baseou-se numa estratégia de mutagénese dirigida, derivada do método de Kunkel (Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382, 1987). Utilizou-se um gene humano da região de Fc-charneira abrangendo os resíduos aminoácidos 226-478 (segundo a numeração de Kabat, Kabat et al., 1991, *supra*), derivado da IgG1 humana MEDI-493 (Johnson et al., J. Infect. Disease, 176:1215-1224, 1997), que foi clonado no vector fagomídeo

pCANTAB5E como fragmento da acção de SfiI/NotI. Foram geradas quatro bibliotecas mediante a introdução de mutações aleatórias nas posições 251, 252, 254, 255, 256 (biblioteca 1), 308, 309, 311, 312, 314 (biblioteca 2), 385, 386, 387, 389 (biblioteca 3) e 428, 433, 434, 436 (biblioteca 4). Dito de forma abreviada, foram geradas quatro matrizes distintas de Fc-charneira, recorrendo à PCR por extensão de sobreposição (Ho et al., Gene, 15:51-59, 1989), contendo cada uma delas um codão de paragem TAA na posição 252 (biblioteca 1), 310 (biblioteca 2), 384 (biblioteca 3) ou 429 (biblioteca 4), pelo que apenas os fagomídeos mutagenizados irão dar origem a bacteriófagos que exibem Fc.

Depois preparou-se cada ADN de cadeia singular que contém TAA (TAAssDNA), do modo seguinte: utilizou-se uma colónia singular da estirpe CJ236 de *E. coli* que alberga um dos quatro fagomídeos relevantes que contêm TAA, a qual ficou a desenvolver-se em 10 mL de meio 2 x YT enriquecido com cloranfenicol na concentração de 10 µg/mL e com ampicilina na concentração de 100 µg/mL. Quando se atingiu um valor de $DO_{600} = 1$, acrescentou-se o bacteriófago auxiliar VCSM13 até uma concentração final de 10^{10} ufp/mL. Decorridas 2 horas, transferiu-se a cultura para 500 mL de meio 2 x YT enriquecido com uridina na concentração de 0,25 µg/mL, cloranfenicol na concentração de 10 µg/mL, canamicina na concentração de 30 µg/mL e ampicilina na concentração de 100 µg/mL e deixou-se crescer de um dia para o outro a 37°C. Efectuou-se a precipitação do bacteriófago com PEG6000, praticando protocolos convencionais (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, Vols. 1-3) e efectuou-se a

purificação utilizando o estojo 'Qiaprep Spin M13' (Qiagen, Valencia, CA), em conformidade com as instruções do fabricante. De cada matriz de TAAssDNA contendo uracilo foram utilizados depois entre 10 e 30 µg que foram combinados com 0,6 µg dos oligonucleótidos fosforilados seguintes (estão sublinhadas as regiões de distribuição aleatória) em Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM a pH 7,5 num volume final de 250 µL:

Biblioteca 1:

5'-CATGTGACCTCAGGSNNSNNSNNGATSNNSNNGGTGTCCTTGGGTTTT

GGGGGG-3' (SEQ ID NO:120)

Biblioteca 2:

5'-GCACTTGTACTCCTTGCCATTSNCCASNNSNNGTGSNNSNNGGTGA
GGACGC-3' (SEQ ID NO:121)

Biblioteca 3:

5'-GGTCTTGTAGTTSNNCTCSNNSNNSNATTGCTCTCCC-3' (SEQ ID NO:122)

Biblioteca 4:

5'-GGCTCTTCTGCGTSNNGTGSNNSNNCAGAGCCTCATGSNNCACGGAGC
ATGAG-3' (SEQ ID NO:123)

em que N = A, C, T ou G e S = G ou C.

6.1.4 SÍNTESE DE ADN HETERODUPLEX

Efectuou-se a fosforilação de oligonucleótidos degenerados e adequados, na presença de cinase de polinucleótidos T4, praticando o protocolo convencional. Efectuou-se a combinação de 10 a 30 µg de matriz U de ssDNA e 0,6 µg de oligonucleótidos fosforilados, em Tris-HCl 50 mM contendo MgCl₂ 10 mM a pH 7,5, até um volume final de 250 µL e manteve-se tudo a incubar a 90°C durante 2 minutos, a 50°C durante 3 minutos e a 20°C durante 5 minutos. Efectuou-se a síntese de ADN heteroduplex, acrescentando 30 unidades de ligase de ADN de T4 e de polimerase de ADN de T7, na presença de ATP 0,4 mM, dNTP 1mM e DTT 6 mM e manteve-se a mistura a incubar durante 4 horas a 20°C. O ADN heteroduplex assim produzido foi depois purificado, com remoção de impurezas salinas, utilizando o estojo de purificação de ADN 'Qiagen Qiaquick' (Qiagen, CA).

6.1.5 ELECTROPORAÇÃO

Efectuou-se a electroporação de 300 µL de células TG1 de *E. coli* electrocompetentes, com 1 a 5 µg de ADN heteroduplex num campo eléctrico de 2,5 kV, utilizando uma resistência de 200 Ω e um condensador de 25 µF, até se obter uma biblioteca com 1×10^8 (bibliotecas 1 e 2) ou com 1×10^7 (bibliotecas 3 e 4). Com as células preparou-se nova suspensão em 2 mL de meio SOC e repetiu-se o procedimento 6 a 10 vezes. Avaliou-se a diversidade por titulação das células de *E. coli* recombinantes. As células marcadas ficaram a incubar em 50 mL de meio SOC durante 30 minutos a 37°C, sob agitação, tendo

sido centrifugadas e recolocadas em suspensão em 50 mL de meio 2xYT contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL e 10^{10} ufp/mL de bacteriófago auxiliar VCSM13. Manteve-se a cultura a incubar de um dia para o outro a 37°C, tendo as células sido reunidas por centrifugação. Os bacteriófagos existentes no sobrenadante, que expressam a parte mutacionada de Fc-charneira na sua proteína de revestimento GIII, foram objecto de precipitação com PEG6000, conforme descrito anteriormente (Sambrook et al., 1989, *supra*) e depois recolocou-se tudo em suspensão em 5 mL de MES 20 mM a pH 6,0.

6.2 PANNING DA BIBLIOTECA

Efectuou-se *panning* de bacteriófagos, recorrendo a uma metodologia à base do protocolo ELISA. Utilizou-se uma placa de 96 cavidades para o protocolo ELISA, as quais foram recobertas com FcRn de murino em tampão de carbonato de sódio na concentração de 0,01 mg/mL, à razão de 100 µL/cavidade, a pH 9,0 e a 4°C, de um dia para o outro, tendo sido depois bloqueadas com leite desnatado a 4% e a 37°C durante 2 horas. Em cada cavidade da placa recoberta colocou-se entre 100-150 µL da suspensão de bacteriófagos (cerca de 10^{13} bacteriófagos no total) em MES 20 mM a pH 6,0 contendo leite desnatado a 5% e 0,05% de Tween 20, mantendo-se tudo a incubar a 37°C durante duas a três horas, com agitação.

Após a incubação, efectuou-se a lavagem das placas com MES 20 mM a pH 6,0, contendo 0,2% de Tween 20 e NaCl 0,3 M, cerca de trinta vezes, à temperatura ambiente. Os bacteriófagos ligados foram objecto de eluição com PBS à razão de 100 µL/cavidade, a pH 7,4 e a 37°C durante 30 minutos.

Depois juntou-se os bacteriófagos, obtidos por eluição, à cultura de células de *E. coli* em desenvolvimento exponencial e efectuou-se a sua propagação de um dia para o outro a 37°C em 250 mL de meio 2xYT enriquecido com ampicilina na concentração de 100 µg/mL e com 10¹⁰ ufp/mL de bacteriófago auxiliar VCSM13. Os bacteriófagos propagados foram recolhidos por centrifugação, seguindo-se a precipitação com PEG e depois repetiu-se o processo de *panning* até um total de seis vezes.

Para a biblioteca de bacteriófagos que continha mutações nos resíduos 308-314 (H310 e W313 fixos), os bacteriófagos em que ocorre a expressão da região de Fc-charneira com maiores afinidades para com o FcRn foram enriquecidos por meio de cada um dos processos indicados no quadro IV. Os resultados do processo de *panning* da biblioteca para as mutações dos resíduos 251-256 (I253 fixo) e os obtidos com a biblioteca para as mutações nos resíduos 428-436 (H429, E430, A431, L432 e H435 fixos) estão indicados, respectivamente, nos quadros V e VI. Mais ainda, os resultados de *panning* da biblioteca para as mutações nos resíduos 385-389 (E388 fixo) estão indicados no quadro VII.

Quadro IV

PANNING DA BIBLIOTECA (RESÍDUOS 308-314; H310 E W313 FIXOS) pCANTAB5E-KUNKEL-muFcRn (FcRn DE MURINO)			
SELECÇÃO	RESULTADOS		COEFICIENTE DE ENRIQUECIMENTO
	+FcRn	-FcRn	
1ª Seleção	1,1 x 10 ⁵	0,5 x 10 ⁵	2
2ª Seleção	1 x 10 ⁴	0,2 x 10 ⁴	5
3ª Seleção	9 x 10 ⁴	0,3 x 10 ⁴	30
4ª Seleção	3 x 10 ⁵	2 x 10 ⁴	15

QUADRO V

PANNING DA BIBLIOTECA (RESÍDUOS 251-256; I253 FIXO) pCANTAB5E-KUNKEL-muFcRn			
SELECÇÃO	RESULTADOS		COEFICIENTE DE ENRIQUECIMENTO
	+FcRn	-FcRn	
1ª Seleccção	$2,5 \times 10^5$	1×10^5	2,5
2ª Seleccção	6×10^4	2×10^4	3,0
3ª Seleccção	8×10^5	4×10^4	20
4ª Seleccção	$1,2 \times 10^6$	5×10^4	24
5ª Seleccção	$3,0 \times 10^6$	6×10^4	50

QUADRO VI

PANNING DA BIBLIOTECA (RESÍDUOS 428-436; H429, E430, A431, L432 E H435 FIXOS) pCANTAB5EKUNKEL-muFcRn			
SELECÇÃO	RESULTADOS		COEFICIENTE DE ENRIQUECIMENTO
	+FcRn	-FcRn	
1ª Seleccção	$2,3 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$	2,5
2ª Seleccção	3×10^4	1×10^4	3
3ª Seleccção	2×10^5	2×10^4	10
4ª Seleccção	8×10^5	5×10^4	16

QUADRO VII

PANNING DA BIBLIOTECA (RESÍDUOS 385-389; E388 FIXO) pCANTAB5E-KUNKEL-muFcRn			
SELECÇÃO	RESULTADOS		COEFICIENTE DE ENRIQUECIMENTO
	+FcRn	-FcRn	
1ª Seleccção	$4,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	1,1
2ª Seleccção	5×10^4	$0,3 \times 10^4$	17
3ª Seleccção	$3,5 \times 10^5$	1×10^4	35

PANNING DA BIBLIOTECA (RESÍDUOS 385-389; E388 FIXO) pCANTAB5E-KUNKEL-muFcRn			
SELECÇÃO	RESULTADOS		COEFICIENTE DE ENRIQUECIMENTO
	+FcRn	-FcRn	
4 ^a Selecção	$5,5 \times 10^5$	4×10^4	14
5 ^a Selecção	$7,5 \times 10^5$	5×10^4	15
6 ^a Selecção	2×10^6	1×10^5	20

6.3 IDENTIFICAÇÃO DE CLONES ISOLADOS A PARTIR DE PANNING

A seguir a cada processo de *panning* efectuou-se o isolamento dos bacteriófagos e os ácidos nucleicos que codificam os péptidos expressos que se ligam ao FcRn foram objecto de sequenciação por meio de um método convencional de sequenciação, tal como o processo de sequenciação de didesoxinucleótidos (Sanger et al., Proc. Natl. Acad Sci USA, 74:5463-5467, 1977), utilizando-se para tal um analisador genómico ABI3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Em consequência do processo de *panning* foram isolados dois mutantes a partir da biblioteca de bacteriófagos que continham as mutações nos resíduos 308-314 (H310 e W313 fixos), foram isolados treze mutantes da biblioteca para os resíduos 251-256 (I253 fixo), foram isolados seis mutantes a partir da biblioteca para os resíduos 428-436 (H429, E430, A431, L432 e H435 fixos) e foram isolados nove mutantes a partir da biblioteca para os resíduos 385-389 (E388 fixo). Os mutantes isolados a partir das bibliotecas estão enumerados no quadro VIII.

QUADRO VIII

MUTANTES ISOLADOS POR PANNING	
BIBLIOTECA	MUTANTES*
251-256	Leu Tyr Ile Thr Arg Glu (SEQ ID NO:90)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Thr (SEQ ID NO:91)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Ser (SEQ ID NO:92)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Arg (SEQ ID NO:93)
	Leu Tyr Ile Ser Arg Gln (SEQ ID NO:94)
	Leu Trp Ile Ser Arg Thr (SEQ ID NO:95)
	Leu Tyr Ile Ser Leu Gln (SEQ ID NO:96)
	Leu Phe Ile Ser Arg Asp (SEQ ID NO:97)
	Leu Phe Ile Ser Arg Thr (SEQ ID NO:98)
	Leu Phe Ile Ser Arg Arg (SEQ ID NO:99)
	Leu Phe Ile Thr Gly Ala (SEQ ID NO:100)
	Leu Ser Ile Ser Arg Glu (SEQ ID NO:101)
	Arg Thr Ile Ser Ile Ser (SEQ ID NO:102)
308-314	Thr Pro His Ser Asp Trp Leu (SEQ ID NO:103)
	Ile Pro His Glu Asp Trp Leu (SEQ ID NO:104)
385-389	Arg Thr Arg Glu Pro (SEQ ID NO:105)
	Asp Pro Pro Glu Ser (SEQ ID NO:106)
	Ser Asp Pro Glu Pro (SEQ ID NO:107)
	Thr Ser His Glu Asn (SEQ ID NO:108)
	Ser Lys Ser Glu Asn (SEQ ID NO:109)
	His Arg Ser Glu Asn (SEQ ID NO:110)
	Lys Ile Arg Glu Asn (SEQ ID NO:111)
	Gly Ile Thr Glu Ser (SEQ ID NO:112)
	Ser Met Ala Glu Pro (SEQ ID NO:113)
428-436	Met His Glu Ala Leu Arg Tyr His His (SEQ ID NO:114)
	Met His Glu Ala Leu His Phe His His (SEQ ID NO:115)
	Met His Glu Ala Leu Lys Phe His His (SEQ ID NO:116)
	Met His Glu Ala Leu Ser Tyr His Arg (SEQ ID NO:117)
	Thr His Glu Ala Leu His Tyr His Thr (SEQ ID NO:118)
	Met His Glu Ala Leu His Tyr His Tyr (SEQ ID NO:119)
* Os resíduos substituintes estão indicados a negrito	

As sequências sublinhadas no Quadro VIII correspondem às sequências que ocorreram 10 a 20 vezes no ciclo final de *panning* e as sequências a itálico correspondem às sequências que ocorreram 2 a 5 vezes no ciclo final de *panning*. As sequências que não estão nem sublinhadas nem escritas a itálico ocorreram uma vez no ciclo final de *panning*.

6.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA REGIÃO DE Fc-CHARNEIRA MUTANTE SOLÚVEL

Os genes que codificam os fragmentos mutacionados da região de Fc-charneira foram excisados com enzimas de restrição adequadas e foram reclonados num vector de expressão, por exemplo, o vector V β pelBhis (Ward, J. Mol. Biol., 224:885-890, 1992). É possível utilizar vectores que contenham qualquer outro tipo de sequência identificadora, tais como o identificador *c-myc*, o identificador decapeptídico (Huse et al., Science, 246:1275-1281, 1989), e os identificadores Flag™ (Immunex). São criados em cultura clones recombinantes, tais como os de *E. coli*, que são induzidos a expressarem os fragmentos solúveis de Fc-charneira, os quais podem ser isolados a partir dos meios de cultura ou a partir do lisado celular após um choque osmótico, com base no identificador utilizado, ou praticando quaisquer outros métodos de purificação perfeitamente conhecidos pelas especialistas na matéria e caracterizados pelos métodos adiante enumerados.

6.5 CONSTRUÇÃO, PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE VARIANTES DE IgG1

Foram incorporadas mutações de Fc representativas, tais como I253A, M252Y/S254T/T256E, M252W, M252Y, M252Y/T256Q, M252F/T256D, V308T/L309P/Q311S, G385D/Q386P/N389S, G385R/Q386T/P387R/N389P, H433K/N434F/Y436H e N434F/Y436 na IgG1 humana MEDI-493 (SYNAGIS®) (Johnson *et al.*, 1997, *supra*). A cadeia pesada foi submetida a mutagénese dirigida ao local, utilizando um estojo de mutagénese 'Quick Change' (Stratagene, La Jolla, CA), em conformidade com as instruções do fabricante, tendo as sequências sido verificadas pelo método de sequenciação dos didesoxinucleótidos, utilizando um sequenciador ABI3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As diferentes construções foram expressas transitoriamente em células 293 do rim embrionário humano, utilizando um promotor imediato inicial de CMV e o operão dicistrónico em que IgG1/VH é co-segregada com IgG1/VL (Johnson *et al.*, 1997, *supra*). A transfecção foi efectuada utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e praticando protocolos convencionais. As IgG foram purificadas a partir de meios condicionados, directamente em colunas contendo 1 mL de proteína A HiTrap, em conformidade com as instruções do fabricante (APBiotech).

6.6 CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DE Fc-CHARNEIRA MUTACIONADA

6.6.1 HPLC E SDS-PAGE DE CARACTERIZAÇÃO IN VITRO

Após a purificação é possível estudar as características gerais, tais como os pesos moleculares e as características de ligação dos fragmentos modificados de Fc-charneira, recorrendo a diversos métodos perfeitamente

conhecidos pelos especialistas na matéria, incluindo SDS-PAGE e HPLC.

Ensaio de ligação do FcRn

É possível medir a actividade de ligação dos fragmentos modificados de Fc-charneira mantendo a incubar fragmentos de Fc-charneira de tipo selvagem ou fragmentos modificados de Fc-charneira marcados com radioisótopos, conjuntamente com células que expressem o FcRn de murganho ou de um ser humano. Tipicamente, são utilizadas células endoteliais, tais como as células endoteliais SV40 transformadas (SVEC) (Kim et al., J. Immunol., 40:457-465, 1994). Após a incubação com os fragmentos de Fc-charneira a 37°C durante 16-18 horas, efectua-se a lavagem das células com meio de crescimento, sendo depois separadas por incubação com Na₂EDTA 5 mM em tampão fosfato 50 mM a pH 7,5 durante 5 minutos. Mede-se a radioactividade por cada 10⁷ células.

Depois disto, as células são recolocadas em suspensão em 2 mL de CHAPS na concentração de 2,5 mg/mL, Tris-HCl 0,1 M a pH 8,0 contendo PMSF na concentração de 0,3 mg/mL, pepstatina na concentração de 25 mg/mL e aprotinina na concentração de 0,1 mg/mL, ficando tudo a incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente. A suspensão de células é depois centrifugada e procede-se à separação do sobrenadante. Mede-se a radioactividade do sobrenadante e tal valor é utilizado para se calcular a quantidade de fragmentos de Fc-charneira extraídos por cada 10⁷ células.

As constantes K_d de interacção da IgG1 humana, de tipo selvagem, com o FcRn de murinos e de seres humanos (respectivamente 269 e 2527 nM) estão em concordância com os

valores determinados por outros autores (respectivamente 265 e 2350 nM, Firan *et al.*, 2001, *supra*). A mutação no resíduo I253A suprime, virtualmente, a ligação ao FcRn humano e de murinos, conforme explicitado por outros autores (Kim *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 29:2819-2825, 1991; Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:6591-6604, 2001). Isto não é o resultado de um erro de constituição do anticorpo, uma vez que o mutante conserva a mesma actividade específica da molécula de tipo selvagem (SYNAGIS®), numa experiência de microneutralização (Johnson *et al.*, 1997, *supra*; dados não apresentados).

Foram geradas IgG1 humanas mutantes com maior afinidade de ligação para os FcRn, quer de murinos quer de seres humanos (Quadro VIII). As melhorias observadas na estabilidade do complexo foram globalmente menos acentuadas no caso do par IgG1 humana-FcRn humano do que no caso do par IgG1 humana-FcRn de murinos; comparativamente com a IgG1 de tipo selvagem foram respectivamente de 30 ($\Delta\Delta G = 2,0$ kcal/mol para N434F/Y436H) e 11 ($\Delta\Delta G = 1,4$ kcal/mol para M252Y/S254Y/S254T/T256E) vezes. No entanto, o ordenamento das posições mais críticas continua inalterado quando a comparação é feita entre os FcRn de seres humanos e de murinos: os maiores aumentos na estabilidade do complexo IgG1-FcRn de murino ($\Delta\Delta G > 1,3$ kcal/mol) ocorreram nas mutações nas posições 252, 254, 256 (M252Y/S254T/T256E e M252W) e 433, 434, 436 (H433K/N434F/Y436H e N434F/Y436H). De igual modo, concluiu-se que as mesmas mutações tinham o impacto maior na interacção entre IgG1-FcRn humano e que delas também resultavam os maiores aumentos da estabilidade do complexo ($\Delta\Delta G > 1,0$ kcal/mol). As substituições nas posições 308, 309, 311, 385, 386, 387 e 389 tiveram pouco ou nenhum efeito sobre a estabilidade dos complexos envolvendo

os FcRn de seres humanos ou de murinos ($\Delta\Delta G < 0,5$ kcal/mol). Os resíduos existentes no centro do local de combinação de Fc-FcRn contribuem significativamente mais para a melhoria da estabilidade do complexo do que os resíduos existentes na periferia (figura 9).

A ligação eficiente do Fc humano ao FcRn dos murinos exige, aparentemente, a presença de diversos resíduos Fc de tipo selvagem. Por exemplo, a leucina é bastante conservada na posição 251, a arginina na posição 255, o ácido aspártico na posição 310, a leucina na posição 314 e a metionina na posição 428 (figura 6). Observa-se uma outra propensão específica quando se toma em consideração as posições 308, 309 e 311 em que a treonina, a prolina e a serina, respectivamente, são muitíssimo favorecidas, comparativamente com os correspondentes resíduos de tipo selvagem (figura 6). No entanto, a geração destas fortes sequências de consenso não está correlacionada com a magnitude do aumento da afinidade, uma vez que o V308T/L309P/Q311S se liga menos do que 2 vezes melhor do que a IgG1 de tipo selvagem aos FcRn, quer de seres humanos quer de murinos (quadro IX).

Os aumentos de afinidade podem depender fortemente das substituições de resíduos numa posição 'hot spot'. Por exemplo, uma única mutação M252Y determina um aumento da ligação ao FcRn dos murinos igual a 9 vezes, ao passo que mutações suplementares acrescentam pouco (M252Y/S254T/T256E) ou nenhum (M252Y/T256Q) benefício. Observa-se a mesma tendência no caso do receptor humano, embora com menor intensidade. Com efeito, o M252Y/S254T/T256E determina uma nítida melhoria de afinidade igual a 2,5 vezes, comparativamente com o M252Y. Isto reflecte, provavelmente,

as diferenças entre o local de ligação nos FcRn de seres humanos e de murinos (West e Bjorkman, Biochemistry, 39:9698-9708, 2000).

Os mutantes de IgG1 derivados de bacteriófagos, que manifestam um aumento significativo de afinidade para com os FcRn dos murinos ($\Delta\Delta G > 1,3$ kcal/mol), também revelam uma significativa actividade de ligação ao receptor a pH 7,2 quando comparados com a IgG1 de tipo selvagem (Figuras 8A-H). Os mutantes de IgG1 com um aumento moderado de afinidade ($\Delta\Delta G < 0,3$ kcal/mol) ligam-se muito fracamente a pH 7,2 (dados não apresentados). Pelo contrário, os mutantes de IgG1 com um aumento grande ($\Delta\Delta G > 1,0$ kcal/mol) de afinidade para com os FcRn humanos manifestam apenas uma ligação mínima a pH 7,4, quando comparados com a IgG1 de tipo selvagem (Figuras 8A-H).

QUADRO IX

CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO E MUDANÇAS RELATIVAS DE ENERGIA LIVRE PARA A LIGAÇÃO DOS MUTANTES DE IgG1/Fc AOS FcRn DE MURINOS E DE SERES HUMANOS*				
MUTANTE	Constantes de dissociação Fc/FcRn de murinos (nM)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Constantes de dissociação Fc/FcRn humanos (mM)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
Selvagem	269 $\pm$ 1		2527 $\pm$ 117	
I253A	NB	NA	NB	NA
M252Y/S254T/T256E	27 $\pm$ 6	1,4	225 $\pm$ 10	1,4
M252W	30 $\pm$ 1	1,3	408 $\pm$ 24	1,1
M252Y	41 $\pm$ 7	1,1	532 $\pm$ 37	0,9
M252Y/T256Q	39 $\pm$ 8	1,1	560 $\pm$ 102	0,9
CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO E MUDANÇAS RELATIVAS DE ENERGIA LIVRE				

PARA A LIGAÇÃO DOS MUTANTES DE IgG1/Fc AOS FcRn DE MURINOS E DE SERES HUMANOS*				
MUTANTE	Constantes de dissociação Fc/FcRn de murinos (nM)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Constantes de dissociação Fc/FcRn humanos (mM)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
M252F/T256D	52 $\pm$ 9	1,0	933 $\pm$ 170	0,6
V308T/L309P/Q311S	153 $\pm$ 23	0,3	1964 $\pm$ 84	0,1
G385D/Q386P/N389S	187 $\pm$ 10	0,2	2164 $\pm$ 331	0,1
G385R/Q386T/P387R/N389P	147 $\pm$ 24	0,4	1620 $\pm$ 61	0,3
H433K/N434F/Y436H	14 $\pm$ 2	1,8	399 $\pm$ 47	1,1
N434F/Y436H	9 $\pm$ 1	2,0	493 $\pm$ 7	1,0
* As medições de afinidade foram efectuadas pelo protocolo BIAcore, conforme descrito <i>supra</i>. A numeração dos resíduos é feita de acordo com a nomenclatura EU (Kabat et al., 1991, <i>supra</i>). As diferenças nas mudanças de energia livre são calculadas como sendo as diferenças entre os valores ΔG nas reacções com os tipos característicos espontâneos e com os mutantes ($\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{selvagem}} - \Delta G_{\text{mutante}}$). NB, sem ligação. NA, não aplicável.				

Ensaio de transferência mediado pelos FcRn

Este ensaio é feito segundo o protocolo descrito na publicação PCT com o nº WO 97/34631. São utilizados fragmentos de Fc-charneira modificados, marcados com radioisótopos, em diversas concentrações (1 $\mu\text{g/mL}$ –1 mg/mL), que são acrescentados a um lado da transcavidade, podendo a transferência dos fragmentos, mediada pela monocamada das células que expressam os FcRn, ser quantificada medindo a radioactividade no outro lado da transcavidade

6.6.2 ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA IN VIVO

Com a finalidade de se determinar o período de semivida da região de Fc-charneira de IgG modificada, os fragmentos de Fc-charneira modificados são marcados com radioisótopos ^{125}I (com uma actividade específica aproximada igual a 10^7 cpm/ μg) e são dissolvidos em soluto salino (pH 7,2). A solução é injectada por via intravenosa em murganhos da estirpe BALB/c (Harlan, Indianapolis, IN), aos quais havia sido previamente dada água contendo NaI para bloquear a tiróide, num volume não superior a 150 μL e com uma radioactividade entre 10×10^6 - 50×10^6 cpm. Retira-se sangue aos murganhos a partir do seio retro-orbital em diversos momentos ao longo do tempo, por exemplo, entre os 3 minutos e as 72 horas após a injeção, para dentro de tubos capilares heparinizados e efectua-se a contagem da radioactividade no plasma recolhido a partir de cada amostra.

Para se gerar os dados apresentados na figura 10, foram utilizados 10 animais para cada molécula experimentada com 2,5 μg de anticorpo injectado em cada animal. Efectuou-se a determinação dos níveis séricos de anticorpos recorrendo a um protocolo ELISA anti-IgG humana (Figura. 10). Parece haver uma correlação inversa entre a afinidade para com o FcRn do murganho e a persistência no soro. Isto pode ser eventualmente devido à quantidade significativa de ligação dos mutantes observada a pH 7,2, que conduz à sequestração (isto é, inexistência de libertação no soro) das moléculas. Dados preliminares (não apresentados) sugerem um maior transporte dos mutantes para os pulmões. Além disso, uma vez que os mutantes manifestam

níveis de ligação ao FcRn humano inferiores aos da ligação ao FcRn dos murinos (ver as figuras 8A-H), admite-se que os níveis séricos de anticorpos sejam maiores nos primatas e nos seres humanos.

6.6.3 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA DO PLASMÃO SUPERFICIAL

A interacção dos FcRn solúveis de murinos e de seres humanos com variantes de IgG1 humana e imobilizada foi monitorizada por detecção da ressonância do plasmão superficial, utilizando um instrumento BIAcore 3000 (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Suécia). Não foi detectado nenhum material agregado, que pudesse interferir com as medições de afinidade (van der Merwe *et al.*, EMBO J., 12:4945-4954, 1993; van der Merwe *et al.*, Biochemistry, 33:10149-10160, 1994), quando se fez a filtração em gel. As concentrações de proteínas foram calculadas pelo método do ácido bicinconínico (BCA) para os FcRn, quer humanos quer de murinos ou utilizando o coeficiente de extinção a 1%, a 280 nm, igual a 1,5 no caso da IgG1 de tipo selvagem e das variantes. Estas últimas foram acopladas à matriz de dextrano de uma microplaca sensora CM5 (Pharmacia Biosensor), utilizando um estojo de acoplamento "Amine Coupling Kit" conforme descrito (Johnson *et al.*, *supra*). As concentrações das proteínas estavam compreendidas entre 3-5 µg/mL em acetato de sódio 10 mM a pH 5,0. O período de activação foi regulado para 7 minutos para um caudal de 10 µL/minuto e o período de imobilização foi regulado para 10 e 20 minutos para um caudal de 10 µL/minuto. Os ésteres reactivos em excesso foram extintos por injeção de 70 µL de cloridrato de metanolamina 1,0 a pH 8,5. Este procedimento teve como

resultado, tipicamente, uma imobilização calculada entre 500 e 4000 unidades de ressonância (UR). Efectuou-se a substituição das soluções tampão para os FcRn de seres humanos e de murinos por tampão PBS 50 mM a pH 6,0 contendo 0,05% de Tween 20. As diluições foram feitas no mesmo tampão. Todas as experiências de ligação foram feitas a 25°C com concentrações variando entre 120 e 1 µg/mL, para um caudal entre 5 e 10 µL/minuto; os dados foram colhidos decorridos 25 a 50 minutos e foram praticadas três aplicações, de 1 minuto, de tampão PBS a pH 7,2, para regenerar as superfícies. Deixou-se também os FcRn fluírem sobre uma célula não recoberta e os valores dos sensogramas obtidos a partir destas experiências de contraprova foram subtraídos aos valores obtidos com as microplacas com IgG1 acoplada. Foram efectuadas análises destas experiências, utilizando a aplicação lógica 'BIAevaluation 3.1' (Pharmacia). As constantes de associação (KA) foram determinadas por análise de Scatchard, medindo a concentração dos reagentes livres e de complexo no equilíbrio, após a correcção para a ligação não específica. Em experiências de ligação em equilíbrio 'BIAcore' (Karlsson et al., 1991, *supra*; van der Merwe et al., 1993, *supra*; van der Merwe et al., 1994, *supra*; Raghavan et al., *Immunity*, 1:303-315, 1994; Malchiodi et al., *J. Exp. Med.*, 182:1833-1845, 1995), é possível determinar directamente a concentração do complexo, como resposta em estado estacionário. A concentração do analito livre (FcRn de seres humanos ou de murinos) é igual à concentração do analito do lote, uma vez que o analito é repostado constantemente durante a injeção da amostra. A concentração do ligando livre sobre a superfície da microplaca sensora pode ser calculada a partir da concentração do complexo e a

partir da capacidade de ligação total da superfície, pela expressão $K_A = R_{eq}/C(R_{max} - R_{eq})$, em que C indica a concentração do analito livre, R_{eq} indica o valor da resposta em estado estacionário e R_{max} é o valor da capacidade total de ligação superficial. Fazendo um rearranjo, é possível obter a equação: " $R_{eq}/C = K_A R_{max} - K_A R_{eq}$."

Deste modo, um gráfico da grandeza R_{eq}/C em função de R_{eq} , para diferentes valores das concentrações do analito, corresponde a uma linha recta a partir da qual é possível calcular a constante K_A (ver o quadro IX). Os erros foram estimados em termos de desvio padrão para duas ou três determinações independentes e foram <20%.

As mutações representativas, identificadas após *panning* das bibliotecas 1 a 4 (Figura 6, quadro VIII) foram introduzidas na parte Fc de uma IgG1 humana. A injeção de concentrações diferentes de FcRn de seres humanos ou de murinos nas variantes de IgG1 imobilizadas determinaram uma ligação dependente da concentração. Os perfis de ressonância típicos para a ligação, em equilíbrio, do mutante M252Y/S254T/T256E aos FcRn de murinos e de seres humanos estão ilustrados nas figuras 7A e B. Para se estimar os valores aparentes de K_A , foram utilizadas concentrações de FcRn compreendidas entre 120 e 1 µg/mL. Em todos os casos, os níveis de ligação em equilíbrio (ou quase equilíbrio) foram alcançados em menos de 50 minutos. Para se avaliar o aumento do número de UR, resultante do efeito não específico da proteína sobre o índice de refração do lote, mediu-se a ligação dos FcRn a uma célula não recoberta e os valores resultantes dos sensogramas destas experiências de contraprova foram subtraídos aos valores obtidos com as microplacas com IgG1 acoplada. Os gráficos das análises de

Scatchard, para a ligação do mutante M252Y/S254T/T256E aos FcRn de murinos e de seres humanos, estão ilustrados nas figuras 7C e D. Todos os gráficos são lineares, tendo os valores K_A aparentes sido calculados a partir das inclinações relevantes. As medições foram efectuadas em duplicado e em triplicado e confirmaram que as IgG imobilizadas conservavam a sua actividade de ligação original.

Uma vez que há dois locais de ligação não equivalentes na IgG1 de murganho para o FcRn de murino com afinidades < 130 nM e 6 μ M (Sanchez *et al.*, Biochemistry, 38:9471-9476, 1999; Schuck *et al.*, Mol. Immunol., 36:1117-1125, 1999; Ghetie e Ward, Ann. Rev. Immunol., 18:739-766, 2000), utilizou-se o receptor em solução para evitar os efeitos de avidéz que aparecem quando a IgG1 se liga ao FcRn imobilizado. Consistentemente com isto, foram observadas sistematicamente afinidades mais elevadas quando o FcRn foi imobilizado na microplaca biosensora, em vez da IgG (Popov *et al.*, 1996, *supra*; Vaughn e Bjorkman, Biochemistry, 36:9374-9380, 1997; Martin e Bjorkman, Biochemistry, 38:12639-12647; West e Bjorkman, Biochemistry, 39:9698-9708, 2000). Nas condições experimentais BIAcore que praticámos, são medidas, sobretudo, interacções correspondentes à associação de afinidade mais elevada (isto é, receptor com um só ligando), de acordo com a linearidade dos gráficos Scatchard (Figuras 7C e D).

Também se utilizou uma análise BIAcore para comparar a afinidade da IgG1 de tipo selvagem e dos mutantes de IgG1. Os mutantes de IgG1 derivados de bacteriófagos, que manifestaram com aumento significativo de afinidade para com os FcRn dos murinos a pH 6,0 ($\Delta\Delta G \geq 1,0$ kcal/mol), também revelaram uma relação significativa ao receptor do

murganho a pH 7,2 com uma ligação SPR $\text{sinal}_{\text{pH}7,4}/\text{SPR}_{\text{sinal}_{\text{pH}6,0}} > 0,6$ na saturação. Os mutantes de IgG1 com um aumento moderado de afinidade para com os FcRn dos murinos a pH 6,0 ($\Delta\Delta G < 0,4$ kcal/mol) ligaram-se de forma bastante fraca ao receptor do murganho a pH 7,2. Pelo contrário, os mutantes de IgG1, que manifestaram um grande aumento de afinidade para com os FcRn dos seres humanos a pH 6,0 ($\Delta\Delta G \geq 1,0$ kcal/mol), apenas manifestaram uma ligação mínima ao receptor humano a pH 7,4, com uma relação SPR $\text{sinal}_{\text{pH}7,4}/\text{SPR}_{\text{sinal}_{\text{pH}6,0}} < 0,15$ na saturação.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> MEDIMMUNE, INC.

<120> MOLÉCULAS COM SEMIVIDA LONGA, COMPOSIÇÕES E SUAS
UTILIZAÇÕES

<130> 10271-027-228

<140>

<141>

<150> 60/254,884

<151> 2000-12-12

<150> 60/238,760

<151> 2001-05-09

<160> 118

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Thr	Ser	Gly	Met	Ser	Val	Gly
1				5		

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Lys	Lys	Asp	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ser	Met	Ile	Thr	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Lys	Cys	Gln	Leu	Ser	Val	Gly	Tyr	Met	His
1				5					10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

```

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1                               5

```

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1                               5

```

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	20	25	30	
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	35	40	45	
Trp	Leu	Ala	Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Lys	Lys	Asp	Tyr	Asn	Pro	Ser	50	55	60	
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	65	70	75	80
Val	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	85	90	95	
Cys	Ala	Arg	Ser	Met	Ile	Thr	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	100	105	110	
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	115	120										

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> Domínio VL

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

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

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> Domínio VH

<400> 9

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Thr Ala Gly Met Ser Val Gly
 1 5

<210> 11

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

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

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Ser Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

```

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

```

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

```

Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met His
1           5           10

```

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Asp Thr Phe Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Phe Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Thr Pro Gly Met Ser Val Gly
 1 5

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

```

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
1           5           10           15

```

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

```

Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val
1           5           10

```

<210> 21

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> Domínio VL

<400> 21

```

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

```

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

```

Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
1           5           10

```

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Asp Thr Phe Tyr Leu Ser Ser
 1 5

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> Domínio VH

<400> 24

Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Pro	20	25	30	
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	35	40	45	
Trp	Leu	Ala	Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Gly	Lys	Lys	His	Tyr	Asn	Pro	Ser	50	55	60	
Leu	Lys	Asp	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	65	70	75	80
Val	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	85	90	95	
Cys	Ala	Arg	Asp	Met	Ile	Phe	Asn	Phe	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	100	105	110	
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	115	120										

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Gly	Lys	Lys	His	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Asp
1				5					10					15	

<210> 26

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

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

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Asp Thr Arg Gly Leu Pro Ser
1 5

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Pro
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Ala	Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Gly	Lys	Lys	His	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				
Leu	Lys	Asp	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65					70					75					80
Val	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Asp	Met	Ile	Phe	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
	115						120								

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Asp	Met	Ile	Phe	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10

<210> 30

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

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

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

Ser	Pro	Ser	Ser	Arg	Val	Gly	Tyr	Met	His
1				5					10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

Asp	Thr	Met	Arg	Leu	Ala	Ser
1				5		

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Gln
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 34

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

```

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

```

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

```

Asp Thr Phe Lys Leu Ser Ser
1           5

```

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 38

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

```

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

```

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

```

Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
1           5           10

```

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 40

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 41

Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 42

```

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

```

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

```

Asp Thr Met Tyr Gln Ser Ser
1           5

```

<210> 44

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ala
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Ala	Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Gly	Lys	Lys	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				
Leu	Lys	Asp	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65					70					75				80	
Val	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Asp	Met	Ile	Phe	Asn	Phe	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Lys	Lys	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Asp
1				5					10					15	

<210> 46

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
          20           25           30

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

Asp Thr Met Tyr Gln Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
          85           90           95

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

```

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

```

Leu Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
1           5           10

```

<210> 48

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln
1			5					10					15		
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ala
			20				25					30			
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
	35					40					45				
Trp	Leu	Ala	Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Lys	Lys	His	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50				55						60				
Leu	Lys	Asp	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65				70						75				80	
Val	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
			85					90						95	
Cys	Ala	Arg	Asp	Met	Ile	Phe	Asn	Phe	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln
		100					105						110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
	115					120									

<210> 49

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

```

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

```

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

```

Asp Thr Phe Phe Leu Asp Ser
1           5

```

<210> 51

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ala
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Ala	Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Lys	Lys	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				
Leu	Lys	Asp	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65					70					75					80
Val	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Asp	Met	Ile	Phe	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115				120									

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 52

```

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

```

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

```

Asp Thr Arg Tyr Gln Ser Ser
1           5

```

<210> 54

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> Domínio VL

<400> 54

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

<210> 55

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 55

```

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
          20           25           30

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

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
          50           55           60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65           70           75           80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
          85           90           95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
          100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 56

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> Domínio VL

<400> 56

```

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

```

<210> 57

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> Domínio VL

<400> 57

```

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

```

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 58

```

Asp Thr Tyr Lys Gln Thr Ser
1           5

```

<210> 59

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> Domínio VL

<400> 59

```

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

```

<210> 60

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

```

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

```

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 61

```

Phe Gln Gly Ser Phe Tyr Pro Phe Thr
1           5

```

<210> 62

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> Domínio VL

<400> 62

```

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

```

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 63

```

Asp Thr Phe Lys Leu Thr Ser
1           5

```

<210> 64

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> Domínio VL

<400> 64

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
          20           25           30

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

Asp Thr Phe Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
          85           90           95

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

```

<210> 65

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

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

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 66

Asp	Thr	Phe	Arg	Leu	Ala	Ser
1				5		

<210> 67

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln
1				5				10						15	
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ala
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Ala	Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Lys	Lys	His	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				
Leu	Lys	Asp	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65					70					75					80
Val	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
			85						90					95	
Cys	Ala	Arg	Asp	Met	Ile	Phe	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115				120									

<210> 68

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 68

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

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 69

Asp	Thr	Tyr	Arg	His	Ser	Ser
1				5		

<210> 70

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 70

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

<210> 71

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 71

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

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 72

Ser	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Gly	Tyr	Met	His
1				5					10

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 73

Asp Thr Phe Phe His Arg Ser
 1 5

<210> 74

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 74

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

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 75

Asp Thr Leu Leu Leu Asp Ser
 1 5

<210> 76

<211> 106

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 76

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

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 77

Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser
1 5

<210> 78

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 78

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
20 25 30

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

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 79

Asp Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 80

<211> 109

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 80

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

<210> 81

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 81

```

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

```

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 82

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1           5           10           15

```

<210> 83

<211> 232

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 83

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 84

<211> 365

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 84

```

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
 1              5              10              15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
      20              25              30

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

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
      50              55              60

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
65              70              75              80

Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
      85              90              95

Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
      100             105             110

Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val
      115             120             125

Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp
      130             135             140

Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile
145             150             155             160

Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr
      165             170             175

Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
      180             185             190

```

Gly Arg	Gly Asn	Leu Glu	Trp Lys	Glu Pro	Pro Ser	Met Arg	Leu Lys	
195			200			205		
Ala Arg	Pro Ser	Ser Pro	Gly Phe	Ser Val	Leu Thr	Cys Ser	Ala Phe	
210			215			220		
Ser Phe	Tyr Pro	Pro Glu	Leu Gln	Leu Arg	Phe Leu	Arg Asn	Gly Leu	
225		230			235		240	
Ala Ala	Gly Thr	Gly Gln	Gly Asp	Phe Gly	Pro Asn	Ser Asp	Gly Ser	
		245		250			255	
Phe His	Ala Ser	Ser Ser	Leu Thr	Val Lys	Ser Gly	Asp Glu	His His	
	260			265			270	
Tyr Cys	Cys Ile	Val Gln	His Ala	Gly Leu	Ala Gln	Pro Leu	Arg Val	
	275		280			285		
Glu Leu	Glu Ser	Pro Ala	Lys Ser	Ser Val	Leu Val	Val Gly	Ile Val	
	290		295			300		
Ile Gly	Val Leu	Leu Leu	Thr Ala	Ala Ala	Ala Val	Gly Gly	Ala Leu	Leu
305		310			315			320
Trp Arg	Arg Met	Arg Ser	Gly Leu	Pro Ala	Pro Trp	Ile Ser	Leu Arg	
	325			330			335	
Gly Asp	Asp Thr	Gly Val	Leu Leu	Pro Thr	Pro Gly	Glu Ala	Gln Asp	
	340			345			350	
Ala Asp	Leu Lys	Asp Val	Asn Val	Ile Pro	Ala Thr	Ala		
	355		360			365		

<210> 85

<211> 365

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 85

Met	Gly	Met	Pro	Leu	Pro	Trp	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu		
1				5					10					15			
Pro	Gln	Thr	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Arg	Pro	Pro	Leu	Met	Tyr	His	Leu		
		20						25					30				
Thr	Ala	Val	Ser	Asn	Pro	Ser	Thr	Gly	Leu	Pro	Ser	Phe	Trp	Ala	Thr		
		35					40					45					
Gly	Trp	Leu	Gly	Pro	Gln	Gln	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Asn	Ser	Leu	Arg	Gln		
	50					55					60						
Glu	Ala	Asp	Pro	Cys	Gly	Ala	Trp	Val	Trp	Glu	Asn	Gln	Val	Ser	Trp		
65					70					75					80		
Tyr	Trp	Glu	Lys	Glu	Thr	Thr	Asp	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Gln	Leu	Phe		
			85						90					95			
Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Thr	Leu	Glu	Lys	Ile	Leu	Asn	Gly	Thr	Tyr	Thr		
			100					105					110				
Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Cys	Glu	Leu	Ala	Ser	Asp	Asn	Ser	Ser	Val		
		115					120					125					

Pro Thr Ala Val Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Lys Phe Asn
 130 135 140
 Pro Arg Ile Gly Asn Trp Thr Gly Glu Trp Pro Glu Thr Glu Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Asn Leu Trp Met Lys Gln Pro Asp Ala Ala Arg Lys Glu Ser Glu
 165 170 175
 Phe Leu Leu Asn Ser Cys Pro Glu Arg Leu Leu Gly His Leu Glu Arg
 180 185 190
 Gly Arg Arg Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
 195 200 205
 Ala Arg Pro Gly Asn Ser Gly Ser Ser Val Leu Thr Cys Ala Ala Phe
 210 215 220
 Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Lys Phe Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
 225 230 235 240
 Ala Ser Gly Ser Gly Asn Cys Ser Thr Gly Pro Asn Gly Asp Gly Ser
 245 250 255
 Phe His Ala Trp Ser Leu Leu Glu Val Lys Arg Gly Asp Glu His His
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Gln Val Glu His Glu Gly Leu Ala Gln Pro Leu Thr Val
 275 280 285
 Asp Leu Asp Ser Ser Ala Arg Ser Ser Val Pro Val Val Gly Ile Val
 290 295 300
 Leu Gly Leu Leu Leu Val Val Val Ala Ile Ala Gly Gly Val Leu Leu
 305 310 315 320
 Trp Gly Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Leu Ser Leu Ser
 325 330 335
 Gly Asp Asp Ser Gly Asp Leu Leu Pro Gly Gly Asn Leu Pro Pro Glu
 340 345 350
 Ala Glu Pro Gln Gly Ala Asn Ala Phe Pro Ala Thr Ser
 355 360 365

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 86

Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
1				5		

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 87

Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
1				5	

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 88

Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
1				5				

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 89

Gly Gln Pro Glu Asn
1 5

<210> 90

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 90

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu
1 5

<210> 91

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 91

Leu Tyr Ile Ser Arg Thr
1 5

<210> 92

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 92

Leu	Tyr	Ile	Ser	Arg	Ser
1				5	

<210> 93

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 93

Leu	Tyr	Ile	Ser	Arg	Arg
1				5	

<210> 94

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 94

Leu	Tyr	Ile	Ser	Arg	Gln
1				5	

<210> 95

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 95

Leu Trp Ile Ser Arg Thr
1 5

<210> 96

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 96

Leu Tyr Ile Ser Leu Gln
1 5

<210> 97

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 97

Leu Phe Ile Ser Arg Asp
1 5

<210> 98

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 98

Leu Phe Ile Ser Arg Thr
1 5

<210> 99

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 99

Leu Phe Ile Ser Arg Arg
1 5

<210> 100

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 100

Leu Phe Ile Thr Gly Ala
1 5

<210> 101

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 101

```

Leu Ser Ile Ser Arg Glu
1                      5

```

<210> 102

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 102

```

Arg Thr Ile Ser Ile Ser
1                      5

```

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 103

```

Thr Pro His Ser Asp Trp Leu
1                      5

```

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 104

Ile Pro His Glu Asp Trp Leu
1 5

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 105

Arg Thr Arg Glu Pro
1 5

<210> 106

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 106

Asp Pro Pro Glu Ser
1 5

<210> 107

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 107

Ser	Asp	Pro	Glu	Pro
1				5

<210> 108

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 108

Thr	Ser	His	Glu	Asn
1				5

<210> 109

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 109

Ser	Lys	Ser	Glu	Asn
1				5

<210> 110

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 110

His Arg Ser Glu Asn
1 5

<210> 111

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 111

Lys Ile Arg Glu Asn
1 5

<210> 112

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 112

Gly Ile Thr Glu Ser
1 5

<210> 113

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 113

```

Ser Met Ala Glu Pro
1                      5

```

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 114

```

Met His Glu Ala Leu Arg Tyr His His
1                      5

```

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 115

```

Met His Glu Ala Leu His Phe His His
1                      5

```

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 116

Met His Glu Ala Leu Lys Phe His His
 1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 117

Met His Glu Ala Leu Ser Tyr His Arg
 1 5

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 118

Thr His Glu Ala Leu His Tyr His Thr
 1 5

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- WO 9743316 A [0010]
- US 5869046 A [0010]
- US 5747035 A [0010]
- WO 9632478 A [0010]
- WO 9114438 A [0010]
- WO 9943713 A [0010]
- WO 0009560 A [0010]
- US 4703039 A [0010]
- WO 9322332 A, Ward [0011]
- WO 9823289 A [0012]
- WO 9734631 A [0013] [0110] [0199] [0229]
- US 5824307 A [0025]
- US 09724396 B [0025]
- US 7229619 B [0025]
- US 20020177126 A [0025] [0132]
- US 20030091584 A [0025] [0132]
- US 5939598 A, Kucherlapati [0055] [0065]
- WO 9317715 A [0056]
- WO 9208802 A [0056]
- WO 9100360 A [0056]

- WO 9205793 A **[0056]**
- US 4474893 A **[0056]**
- US 4714681 A **[0056]**
- US 4925648 A **[0056]**
- US 5573920 A **[0056]**
- US 5601819 A **[0056]**
- GB 9101134 W **[0061]**
- WO 9002809 A **[0061]**
- WO 9110737 A **[0061]**
- WO 9201047 A **[0061]** **[0065]**
- WO 9218619 A **[0061]**
- WO 9311236 A **[0061]**
- WO 9515982 A **[0061]**
- WO 9520401 A **[0061]**
- US 5698426 A **[0061]**
- US 5223409 A **[0061]** **[0169]**
- US 5403484 A **[0061]** **[0169]**
- US 5580717 A **[0061]**
- US 5427908 A **[0061]**
- US 5750753 A **[0061]**
- US 5821047 A **[0061]**
- US 5571698 A **[0061]** **[0169]**
- US 5516637 A **[0061]**
- US 5780225 A **[0061]**
- US 5658727 A **[0061]**
- US 5733743 A **[0061]**
- US 5969108 A **[0061]**
- WO 9222324 A **[0062]**
- US 4946778 A **[0062]**
- US 5258498 A **[0062]**
- US 5807715 A **[0063]** **[0094]**

- US 4816567 A [0063]
- US 4816397 A [0063]
- US 5585089 A, Queen [0063]
- EP 239400 A [0063]
- WO 9109967 A [0063]
- US 5225539 A [0063]
- US 5530101 A [0063]
- EP 592106 A [0063]
- EP 519596 A [0063]
- US 5565332 A [0063]
- US 4444887 A [0064]
- US 4716111 A [0064]
- WO 9846645 A [0064]
- WO 9850433 A [0064]
- WO 9824893 A [0064] [0065]
- WO 9816654 A [0064]
- WO 9634096 A [0064] [0065]
- WO 9633735 A [0064] [0065]
- WO 9110741 A [0064]
- EP 0598877 A [0065]
- US 5413923 A [0065]
- US 5625126 A [0065]
- US 5633425 A [0065]
- US 5569825 A [0065]
- US 5661016 A [0065]
- US 5545806 A [0065]
- US 5814318 A [0065]
- US 5885793 A [0065]
- US 5916771 A [0065]
- WO 9833919 A [0069] [0128]
- WO 0078815 A, Huse [0069] [0128]

- WO 9416101 A [0084]
- WO 8605807 A [0088]
- WO 8901036 A [0088]
- US 5122464 A [0088]
- WO 9321232 A [0100]
- EP 439095 A [0100]
- US 5474981 A [0100]
- US 4741900 A [0102]
- WO 9733899 A [0104]
- WO 9734911 A [0104]
- WO 9923105 A [0104]
- US 4676980 A, Segal [0107]
- US 5336603 A [0110]
- US 5622929 A [0110]
- US 5359046 A [0110]
- US 5349053 A [0110]
- US 5447851 A [0110]
- US 5723125 A [0110]
- US 5783181 A [0110]
- US 5908626 A [0110]
- US 5844095 A [0110]
- US 5112946 A [0110]
- EP 307434 A [0110]
- EP 367166 A [0110]
- EP 394827 A [0110]
- WO 9106570 A [0110]
- WO 9604388 A [0110]
- WO 9622024 A [0110]
- WO 9904813 A [0110]
- US 1980 A [0119]
- US 72439600 A [0132]

- US 09724531 A [0132]
- US 6019968 A [0138]
- US 5985320 A [0138]
- US 5985309 A [0138]
- US 5934272 A [0138]
- US 5874064 A [0138]
- US 5855913 A [0138]
- US 5290540 A [0138]
- US 4880078 A [0138]
- WO 9219244 A [0138]
- WO 9732572 A [0138]
- WO 9744013 A [0138]
- WO 9831346 A [0138]
- WO 9966903 A [0138]
- US 4526938 A [0142]
- WO 9105548 A [0142]
- WO 9620698 A [0142]
- US 5679377 A [0142]
- US 5916597 A [0142]
- US 5912015 A [0142]
- US 5989463 A [0142]
- US 5128326 A [0142]
- WO 9915154 A [0142]
- WO 9920253 A [0142]
- US 4980286 A [0144] [0158]
- WO 9206180 A [0158]
- WO 9222635 A [0158]
- WO 9220316 A [0158]
- WO 9314188 A [0158]
- WO 9320221 A [0158]
- WO 9412649 A [0160]

- US 5436146 A [0161]
- WO 9408598 A [0167]
- US 5441050 A, Thurston [0196]
- US 60254884 B [0237]
- US 60238760 B [0237]

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- **Brambell.** *Lancet*, 1966, vol. ii, 1087-1093 [0004] [0007]
- **Rodewald.** *J. Cell Biol.*, 1976, vol. 71, 666-670 [0004]
- **Morris et al.** Antigen Absorption by the Gut. University Park Press, 1978, 3-22 [0004]
- **Jones et al.** *J. Clin. Invert.*, 1972, vol. 51, 2916-2927 [0004]
- **Halliday.** *Proc. R. Soc. B.*, 1955, vol. 143, 408-413 [0005]
- **Halliday.** *Proc. R. Soc. B.*, 1955, vol. 144, 427-430 [0005]
- **Halliday.** *Proc. R. Soc. B.*, 1957, vol. 148, 92-103 [0005]
- **Morris.** *Proc. R. Soc. B.*, 1957, vol. 148, 84-91 [0005]
- **Brambell et al.** *Proc. R. Soc. B.*, 1958, vol. 149, 1-11 [0005]
- **Morris.** *Proc. R. Soc. B.*, 1964, vol. 160, 276-292 [0005]
- **Rodewald et al.** *J. Cell Biol.*, 1984, vol. 99, 154s-164s [0006]
- **Simister et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1985, vol. 15, 733-738 [0006]
- **Simister et al.** *Nature*, 1989, vol. 337, 184 [0006]
- *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1989, vol. LIV, 571-580 [0006]

- **Ahouse et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 6076-6088 [0006]
- **Story et al.** *J. Exp. Med*, 1994, vol. 180, 2377-2381 [0006]
- **Brambell et al.** *Nature*, 1964, vol. 203, 1352-1355 [0007]
- **Spiegelberg et al.** *J. Exp. Med*, 1965, vol. 121, 323-338 [0007]
- **Edelman et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1969, vol. 63, 78-85 [0007]
- **Ghetie et al.** *Immunology Today*, 1997, vol. 18 (12), 592-598 [0007] [0038]
- **Kim et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 2429-2434 [0008] [0009] [0204]
- **Popov et al.** *Mol. Immunol.*, 1996, vol. 33, 493-502 [0008] [0201]
- **Ghetie et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1996, vol. 26, 690-696 [0008]
- **Junghans et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 5512-5516 [0008]
- **Israel et al.** *Immunol.*, 1996, vol. 89, 573-578 [0008]
- **Medesan et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1996, vol. 26, 2533 [0009]
- **Medesan et al.** *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, 2211-2217 [0009]
- **Kabat et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. US Department of Health and Human Services, 1991 [0009]
- **Johnson et al.** *J. Infectious Disease*, 1997, vol. 176, 1215-1224 [0025]
- **Karlin; Altschul.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, vol. 87, 2264-2268 [0036]

- **Karlin; Altschul.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, vol. 90, 5873-5877 [0036]
- **Altschul et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403 [0036]
- **Altschul et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0036]
- **Myers; Miller.** *CABIOS*, 1988, vol. 4, 11-17 [0036]
- **Deisenhofer.** *Biochemistry*, 1981, vol. 20, 2361-2370 [0038]
- **Guex; Peitsch.** *Electrophoresis*, 1997, vol. 18, 2714-2723 [0038]
- **Zoller; Smith.** *Nucl. Acids Res.*, 1982, vol. 10, 6487-6500 [0049]
- **Kunkel.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 488 [0049]
- **Medesan et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1998, vol. 28, 2092-2100 [0054]
- **Tutt et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60-69 [0056]
- **Kostelny et al.** *J. Immunol*, 1992, vol. 148, 1547-1553 [0056]
- **Harlow et al.** *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0058]
- **Hammerling et al.** *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas.* Elsevier, 1981, 563-681 [0058]
- **Brinkman et al.** *J. Immunol. Methods*, 1995, vol. 182, 41-50 [0061]
- **Ames et al.** *J. Immunol. Methods*, 1995, vol. 184, 177-186 [0061]
- **Kettleborough.** *Eur. J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 952-958 [0061]
- **Persic et al.** *Gene*, 1997, vol. 187, 9-18 [0061]

- **Burton et al.** *Advances in Immunology*, 1994, vol. 57, 191-280 [0061]
- **Mullinax et al.** *BioTechniques*, 1992, vol. 12 (6), 864-869 [0062]
- **Sawai et al.** *AJRI*, 1995, vol. 34, 26-34 [0062]
- **Better et al.** *Science*, 1988, vol. 240, 1041-1043 [0062]
- **Huston et al.** *Methods in Enzymology*, 1991, vol. 203, 46-88 [0062]
- **Shu et al.** *PNAS*, 1993, vol. 90, 7995-7999 [0062]
- **Skerra et al.** *Science*, 1988, vol. 240, 1038-1040 [0062]
- **Morrison.** *Science*, 1985, vol. 229, 1202 [0063]
- **Oi et al.** *BioTechniques*, 1986, vol. 4, 214 [0063]
- **Gillies et al.** *J. Immunol. Methods*, 1989, vol. 125, 191-202 [0063]
- **Riechmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323 [0063]
- **Padlan.** *Molecular Immunology*, 1991, vol. 28 (4/5), 489-498 [0063]
- **Studnicka et al.** *Protein Engineering*, 1994, vol. 7 (6), 805-814 [0063]
- **Roguska et al.** *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 969-973 [0063]
- **Lonberg; Huszar.** *Int. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0065]
- **Jespers et al.** *Bio/technology*, 1988, vol. 12, 899-903 [0066]
- **Kunkel et al.** *Methods Enzymo/.*, 1987, vol. 154, 367-82 [0080]
- **Tomic et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1987, vol. 18 (6), 1656 [0081]
- **Upender et al.** *Biotechniques*, 1995, vol. 18 (1), 29-3032 [0081]

- **Michael.** *Biotechniques*, 1994, vol. 16 (3), 410-2 [0081]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc, 1994, vol. 1 [0083] [0170]
- **Maxim; Gilbert.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, 560 [0084]
- **Sanger.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, 5463 [0084]
- **Cohen et al.** *Adv. Chromatogr.*, 1996, vol. 36, 127-162 [0084]
- **Griffin et al.** *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1993, vol. 38, 147-159 [0084]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1990 [0087]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1998 [0087]
- **Foecking et al.** *Gene*, 1986, vol. 45, 101 [0090]
- **Cockett et al.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 2 [0090]
- **Ruther et al.** *EMBO*, 1983, vol. 12, 1791 [0091]
- **Inouye; Inouye.** *Nucleic Acids Res.*, 1985, vol. 13, 3101-3109 [0091]
- **Van Heeke; Schuster.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 24, 5503-5509 [0091]
- **Logan; Shenk.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 355-359 [0093] [0115]
- **Bitter et al.** *Methods in Enzymol*, 1987, vol. 153, 516-544 [0093]
- **Wigler et al.** *Cell*, 1977, vol. 11, 223 [0096]
- **Szybalska; Szybalski.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 48, 202 [0096]
- **Lowy et al.** *Cell*, 1980, vol. 22, 8-17 [0096]

- **Wigler et al.** *Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 357 [0096]
- **O'Hare et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 1527 [0096]
- **Mulligan; Berg.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 2072 [0096] [0119]
- **Wu; Wu.** *Biotherapy*, 1991, vol. 3, 87-95 [0096] [0154]
- **Tolstoshev.** *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1993, vol. 32, 573-596 [0096] [0154]
- **Mulligan.** *Science*, 1993, vol. 260, 926-932 [0096] [0154]
- **Morgan; Anderson.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1993, vol. 62, 191-217 [0096]
- **May.** *TIB TECH*, 1993, vol. 11 (5), 155-2 15 [0096]
- **Santerre et al.** *Gene*, 1984, vol. 30, 147 [0096] [0119]
- *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, 1993 [0096] [0154]
- **Kriegler.** *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual.* Stockton Press, 1990 [0096] [0154]
- *Current Protocols in Human Genetics.* John Wiley & Sons, 1994 [0096]
- **Colberre-Garapin et al.** *J. Mol. Biol.*, 1981, vol. 150, 1 [0096] [0119]
- **Bebbington; Hentschel.** *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning.* Academic Press, 1987, vol. 3 [0097]
- **Crouse et al.** *Mol., Cell. Biol.*, 1983, vol. 3, 257 [0097]
- **Proudfoot.** *Nature*, 1986, vol. 322, 52 [0098]
- **Kohler.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 2 197 [0098]

- **Naramura et al.** *Immunol. Lett.*, 1994, vol. 39, 91-99 [0100]
- **Gillies et al.** *PNAS*, 1992, vol. 89, 1428-1432 [0100]
- **Fell et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 146, 2446-2452 [0100]
- **Gentz et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 821-824 [0101]
- **Wilson et al.** *Cell*, 1984, vol. 37, 767 [0101]
- **Knappik et al.** *Biotechniques*, 1994, vol. 17 (4), 754-761 [0101]
- **Takahashi et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 6, 1567-1574 [0104]
- Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy. **Arnon et al.** *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*. Alan R. Liss, Inc, 1985, 243-56 [0105]
- Antibodies For Drug Delivery. **Hellstrom et al.** *Controlled Drug Delivery*. Marcel Dekker, Inc, 1987, 623-53 [0105]
- Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review. **Thorpe et al.** *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*. 1985, 475-506 [0105]
- Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy. *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*. Academic Press, 1985, 303-16 [0105]
- **Thorpe et al.** *Immunol. Recombinant expression vector.*, 1982, vol. 62, 119-58 [0105]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1992 [0109]
- **Ashkenazi et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 10535-10539 [0110]
- **Traunecker et al.** *Nature*, 1988, vol. 331, 84-86 [0110]

- **Zheng et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 154, 5590-5600 [0110]
- **Vil et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 11337-11341 [0110]
- **Bemoist; Chambon.** *Nature*, 1981, vol. 290, 304-310 [0112]
- **Yamamoto et al.** *Cell*, 1980, vol. 22, 787-797 [0112]
- **Wagner et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1981, vol. 78, 1441-1445 [0112]
- **Brinster et al.** *Nature*, 1982, vol. 296, 39-42 [0112]
- **Gossen et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 89, 5547-5551 [0112]
- **Villa-Kamaroff et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1978, vol. 75, 3727-3731 [0112]
- **DeBoer et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, vol. 80, 21-25 [0112]
- Useful proteins from recombinant bacteria. *Scientific American*, 1980, vol. 242, 74-94 [0112]
- **Herrera-Estrella et al.** *Nature*, 1983, vol. 303, 209-213 [0112]
- **Gardner et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1981, vol. 9, 2871 [0112]
- **Herrera-Estrella et al.** *Nature*, 1984, vol. 310, 115-120 [0112]
- **Swift et al.** *Cell*, 1984, vol. 38, 639-646 [0112]
- **Ornitz et al.** *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1986, vol. 50, 399-409 [0112]
- **MacDonald.** *Hepatology*, 1987, vol. 7, 425-515 [0112]
- **Hanahan.** *Nature*, 1985, vol. 315, 115-122 [0112]
- **Grosschedl et al.** *Cell*, 1984, vol. 38, 647-658 [0112]
- **Adames et al.** *Nature*, 1985, vol. 318, 533-538 [0112]

- **Alexander et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1987, vol. 7, 1436-1444 [0112]
- **Leder et al.** *Cell*, 1986, vol. 45, 485-495 [0112]
- **Pinkert et al.** *Genes and Devel.*, 1987, vol. 1, 268-276 [0112]
- **Krumlauf et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 1639-1648 [0112]
- **Hammer et al.** *Science*, 1987, vol. 235, 53-58 [0112]
- **Kelsey et al.** *Genes and Devel.*, 1987, vol. 1, 161-171 [0112]
- **Mogram et al.** *Nature*, 1985, vol. 315, 338-340 [0112]
- **Kollias et al.** *Cell*, 1986, vol. 46, 89-94 [0112]
- **Readhead et al.** *Cell*, 1987, vol. 48, 703-712 [0112]
- **Sani.** *Nature*, 1985, vol. 314, 283-286 [0112]
- **Morelli et al.** *Gen. Virol.*, 1999, vol. 80, 571-83 [0112]
- **Tabuchi et al.** *Biochem. Biophysic. Res. Comprising.*, 1998, vol. 253, 818-823 [0112]
- **Gomes et al.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999, vol. 32 (5), 619-631 [0112]
- **Mason et al.** *Science*, 1986, vol. 234, 1372-1378 [0112]
- **Bitter et al.** *Methods in Enzymol.*, 1987, vol. 153, 516-544 [0115]
- **Sugimoto et al.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, vol. 73, 51-57 [0117]
- *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, vol. 704, 450-460 [0117]
- **He et al.** *Cancer Res.*, 1992, vol. 52, 1144-1148 [0117]
- **Kruse et al.** *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 1992, vol. 28A, 609-614 [0117]
- *Cancer Res.*, 1970, vol. 30, 2110-2118 [0117]
- *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 74, 4816 [0117]
- *Br. J. Cancer*, 1984, vol. 49, 269 [0117]

- *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1968, vol. 74, 465-486 [0117]
- **Olopade et al.** *Cancer Res.*, 1992, vol. 52, 2523-2529 [0117]
- **Benda et al.** *Science*, 1968, vol. 161, 370-371 [0117]
- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, vol. 65, 129-136 [0117]
- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1962, vol. 48, 1184-1190 [0117]
- **Bolin et al.** *J. Virol. Methods*, 1994, vol. 48, 211-221 [0117]
- **Haapala et al.** *J. Virol.*, 1985, vol. 53, 827-833 [0117]
- **Trowbridge et al.** *In Vitro*, 1982, vol. 18, 952-960 [0117]
- **Radany et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 6467-6471 [0117]
- **Wigler et al.** *Cell*, 1997, vol. 11, 223 [0119]
- **Szybalska; Szybalski.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1962, vol. 48, 2026 [0119]
- **Lowy et al.** *Cell*, 1980, vol. 22, 817 [0119]
- **Wigler et al.** *Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 3567 [0119]
- **O'Hare et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 1527 [0119]
- **Wu; Wu.** *J. Biol. Chem*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0138]
- **Langer.** *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533 [0141] [0143]
- **Treat et al.** *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer.* Liss, 1989, 353-365 [0141]
- **Lopez-Berestein.** *LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER.* 317-327 [0141]
- **Ning et al.** *Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel. Radiotherapy & Oncology*, 1996, vol. 39, 179-189 [0142]

- **Song et al.** Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions. *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 1995, vol. 50, 372-397 [0142]
- **Cleek et al.** Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application. *Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 1997, vol. 24, 853-854 [0142]
- **Lam et al.** Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery. *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 1997, vol. 24, 759-760 [0142]
- **Sefton.** *CRC Crit. Ref. Biomed Eng.*, 1987, vol. 14, 20 [0142]
- **Buchwald et al.** *Surgery*, 1980, vol. 88, 507 [0142]
- **Saudek et al.** *N. Engl. J. Med*, 1989, vol. 321, 574 [0142]
- Medical Applications of Controlled Release. CRC Pres, 1974 [0142]
- Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance. Wiley, 1984 [0142]
- **Ranger; Peppas. J.,** *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 1983, vol. 23, 61 [0142]
- **Levy et al.** *Science*, 1985, vol. 228, 190 [0142]
- **During et al.** *Ann. Neurol.*, 1989, vol. 25, 351 [0142]
- **Howard et al.** *J. Neurosurg.*, 1989, vol. 71, 105 [0142]
- **Goodson.** *Medical Applications of Controlled Release*, 1984, vol. 2, 115-138 [0142]
- **Joliot et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 1864-1868 [0144]
- **Goldspiel et al.** *Clinical Pharmacy*, 1993, vol. 12, 488-505 [0154]
- **Morgan; Anderson.** *Ann. Rev. biochem.*, 1993, vol. 62, 191-217 [0154]
- **TIBTECH**, 1993, vol. 11 (5), 155-215 [0154]

- **Koller; Smithies.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 8932-8935 [0155]
- **Zijlstra et al.** *Nature*, 1989, vol. 342, 435-438 [0155]
[0158]
- **Wu; Wu.** *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0158]
- **Koller; Smithies.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 8932-8935 [0158]
- **Miller et al.** *Meth. Enzymol.*, 1993, vol. 217, 581-599
[0159]
- **Boesen et al.** *Biotherapy*, 1994, vol. 6, 291-302 [0159]
- **Clowes et al.** *J. Clin. Invest.*, 1994, vol. 93, 644-651
[0159]
- **Klein et al.** *Blood*, 1994, vol. 83, 1467-1473 [0159]
- **Salmons; Gunzberg.** *Human Gene Therapy*, 1993, vol. 4, 129-141 [0159]
- **Grossman; Wilson.** *Curr. Opin. in Genetics and Devel.*, 1993, vol. 3, 110-114 [0159]
- **Kozarsky; Wilson.** *Current Opinion in Genetics and Development*, 1993, vol. 3, 499-503 [0160]
- **Bout et al.** *Human Gene Therapy*, 1994, vol. 5, 3-10 [0160]
- **Rosenfeld et al.** *Science*, 1991, vol. 252, 431-434 [0160]
- **Rosenfeld et al.** *Cell*, 1992, vol. 68, 143-155 [0160]
- **Mastrangeli et al.** *J. Clin. Invest.*, 1993, vol. 91, 225-234 [0160]
- **Wang et al.** *Gene Therapy*, 1995, vol. 2, 775-783 [0160]
- **Walsh et al.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1993, vol. 204, 289-300 [0161]
- **Loeffler; Behr.** *Meth. Enzymol.*, 1993, vol. 217, 599-618
[0163]
- **Cohen et al.**, *Meth. Enzymol.*, 1993, vol. 217, 618-644
[0163]

- *Clin. Pharma. Ther.*, 1985, vol. 29, 69-92 [0163]
- **Stemple; Anderson.** *Cell*, 1992, vol. 7 (1), 973-985 [0167]
- **Rheinwald.** *Meth. Cell Bio.*, 1980, vol. 21A, 229 [0167]
- **Pittelkow; Scott.** *Mayo Clinic Proc.*, 1986, vol. 61, 771 [0167]
- **Houghten.** *Bio/Techniques*, 1992, vol. 13, 412-421 [0169]
- **Lam.** *Nature*, 1991, vol. 354, 82-84 [0169]
- **Fodor.** *Nature*, 1993, vol. 364, 555-556 [0169]
- **Cull et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 1865-1869 [0169]
- **Scott; Smith.** *Science*, 1990, vol. 249, 386-390 [0169]
- **Devlin.** *Science*, 1990, vol. 249, 404-406 [0169]
- **Cwirla et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6378-6382 [0169]
- **Felici.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 301-310 [0169]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc, 1994, vol. 1, 10.16.1 [0171]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc, 1994, vol. 1, 10.8.1 [0172]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc, 1994, vol. 1, 11.2.1 [0173]
- **Johnson et al.** *Journal of Infectious Diseases*, 1997, vol. 176, 1215-1224 [0177]
- **Jalkanen et al.** *J. Cell. Biol.*, 1985, vol. 101, 976-985 [0188]
- **Jalkanen et al.** *J. Cell. Biol.*, 1987, vol. 105, 3087-3096 [0188]
- Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments. **S.W. Burchiel et al.** *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer.* Masson Publishing Inc, 1982 [0192]

- **Kim et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 40, 457-465 [0200]
[0222]
- **Karlsson et al.** *J. Immunol. Methods*, 1991, vol. 145, 229-240 [0201]
- **Kim et al.** *Eur. J. of Immuno.*, 1994, vol. 24, 542 [0205]
- **Firan et al.** *Intern. Immunol.*, 2001, vol. 13, 993-1002 [0208]
- **Popov et al.** *Mol. Immunol.*, 1996, vol. 33, 521-530 [0208]
- **Kabat et al.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. National Institutes of Health, 1991 [0208]
- **Story et al.** *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 180, 2377-2381 [0208]
- **Kunkel et al.** *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 154, 367-382 [0209]
- **Johnson et al.** *J. Infect. Disease*, 1997, vol. 176, 1215-1224 [0209]
- **Ho et al.** *Gene*, 1989, vol. 15, 51-59 [0209]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989, vol. 1-3 [0210]
- **Sanger et al.** *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 1977, vol. 74, 5463-5467 [0217]
- **Ward.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 224, 885-890 [0219]
- **Huse et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0219]
- **Kim et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1991, vol. 29, 2819-2825 [0224]
- **Shields et al.** *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 6591-6604 [0224]
- **West; Bjorkman.** *Biochemistry*, 2000, vol. 39, 9698-9708 [0227] [0235]
- **van der Merwe et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 4945-4954 [0232]

- **van der Merwe et al.** *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 10149-10160 [0232]
- **Raghavan et al.** *Immunity*, 1994, vol. 1, 303-315 [0232]
- **Malchiodi et al.** *J. Exp. Med.*, 1995, vol. 182, 1833-1845 [0232]
- **Sanchez et al.** *Biochemistry*, 1999, vol. 38, 9471-9476 [0235]
- **Schuck et al.** *Mol. Immunol.*, 1999, vol. 36, 1117-1125 [0235]
- **Ghetie; Ward.** *Ann. Rev. Immunol.*, 2000, vol. 18, 739-766 [0235]
- **Vaughn; Bjorkman.** *Biochemistry*, 1997, vol. 36, 9374-9380 [0235]
- **Martin; Bjorkman.** *Biochemistry*, vol. 38, 12639-12647 [0235]

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula modificada que compreende uma proteína ou um agente não proteico e um domínio constante de IgG, em que o domínio constante de IgG compreende um domínio CH₂ humano em que há uma substituição de aminoácidos no resíduo de aminoácido 252, numerado de acordo com o índice EU de Kabat, em que a molécula modificada possui um maior período de semivida, comparativamente com o período de semivida de uma molécula que compreende a proteína ou o agente não proteico e um correspondente domínio constante de IgG que compreenda um domínio CH₂ humano de tipo selvagem, e em que a substituição do resíduo de aminoácido 252 é uma substituição com tirosina, fenilalanina, triptofano ou treonina.

2. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 1, em que o domínio constante de IgG é um domínio constante da IgG humana.

3. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 2, em que o domínio constante da IgG humana é IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄.

4. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 3, em que o domínio constante da IgG humana é IgG₁.

5. Molécula modificada de acordo com uma das reivindicações 2, 3 ou 4, em que o domínio constante de IgG da molécula modificada compreende uma ou várias

substituições de aminoácidos em um ou vários dos resíduos de aminoácidos 251, 253-256, 285-290, 308-314, 385-389 e 428-436, relativamente a um domínio constante de IgG humana de tipo selvagem.

6. Molécula modificada de acordo com uma das reivindicações 2, 3 ou 4, em que o domínio constante de IgG da molécula modificada compreende uma ou várias substituições de aminoácidos em um ou vários dos resíduos de aminoácidos 254, 256, 309, 311, 314, 428, 433, 434 ou 436, relativamente a um domínio constante de IgG humana de tipo selvagem.

7. Molécula modificada de acordo com uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, em que o domínio constante da IgG da molécula modificada compreende uma substituição de um aminoácido no resíduo de aminoácido 254 e uma substituição de um aminoácido no resíduo de aminoácido 256, relativamente a um domínio CH₂ humano de tipo selvagem.

8. Molécula modificada de acordo com uma das reivindicações 6 ou 7, em que o domínio constante de IgG da molécula modificada compreende uma ou mais substituições de aminoácidos em um ou mais dos resíduos de aminoácidos 385, 386, 387 ou 389, relativamente a um domínio constante de IgG humana de tipo selvagem.

9. Molécula modificada de acordo com uma das reivindicações 5 ou 6, em que a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 254 é uma substituição por treonina; a substituição do aminoácido no resíduo de

aminoácido 256 é uma substituição por fenilalanina, serina, arginina, glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico, alanina ou asparagina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 309 é uma substituição por prolina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 311 é uma substituição por serina, ácido glutâmico ou leucina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 433 é uma substituição por lisina, arginina, serina, isoleucina, prolina ou glutamina; e a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 434 é uma substituição por histidina, fenilalanina ou tirosina.

10. Molécula modificada de acordo com uma das reivindicações 5 ou 6, em que a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 252 é uma substituição por tirosina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 254 é uma substituição por treonina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 256 é uma substituição por ácido glutâmico; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 433 é uma substituição por lisina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 434 é uma substituição por fenilalanina; e a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 436 é uma substituição por histidina.

11. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 7, em que a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 254 é uma substituição por treonina e a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 256 é uma substituição por fenilalanina, serina, arginina,

glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico, alanina ou asparagina.

12. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 7, em que a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 252 é uma substituição por tirosina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 254 é uma substituição por treonina; e a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 256 é uma substituição por ácido glutâmico.

13. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 7, em que a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 252 é uma substituição por tirosina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 254 é uma substituição por treonina; e a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 256 é uma substituição por fenilalanina, serina, arginina, glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico, alanina ou asparagina.

14. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 7, em que a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 254 é uma substituição por treonina, e a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 256 é uma substituição por ácido glutâmico.

15. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 8, em que a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 385 é uma substituição por arginina, ácido aspártico, serina, treonina, histidina, lisina, alanina ou glicina; a substituição do aminoácido no resíduo de

aminoácido 386 é uma substituição por treonina, prolina, ácido aspártico, serina, lisina, arginina, isoleucina ou metionina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 387 é uma substituição por arginina, histidina, serina, treonina ou alanina; e a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 389 é uma substituição por prolina, serina ou asparagina.

16. Molécula modificada de acordo com uma das reivindicações 5 ou 6, em que a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 428 é uma substituição por metionina, treonina, leucina, fenilalanina ou serina.

17. Molécula modificada de acordo com uma das reivindicações 5 ou 6, em que a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 314 é uma substituição por alanina.

18. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 5, em que a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 251 é uma substituição por arginina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 254 é uma substituição por treonina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 255 é uma substituição por leucina, glicina, isoleucina ou arginina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 256 é uma substituição por serina, arginina, glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico, alanina ou asparagina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 308 é uma substituição por treonina ou isoleucina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 309 é uma substituição por prolina; a

substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 311 é uma substituição por serina, ácido glutâmico ou leucina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 312 é uma substituição por alanina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 314 é uma substituição por alanina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 385 é uma substituição por arginina, ácido aspártico, serina, treonina, histidina, lisina, alanina ou glicina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 386 é uma substituição por treonina, prolina, ácido aspártico, serina, lisina, arginina, isoleucina ou metionina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 387 é uma substituição por arginina, histidina, serina, treonina ou alanina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 389 é uma substituição por prolina, asparagina ou serina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 428 é uma substituição por metionina, treonina, leucina, fenilalanina ou serina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 433 é uma substituição por lisina, arginina, serina, isoleucina, prolina, glutamina ou histidina; a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 434 é uma substituição por fenilalanina, tirosina ou histidina; e a substituição do aminoácido no resíduo de aminoácido 436 é uma substituição por histidina, asparagina, arginina, treonina, lisina ou metionina.

19. Molécula modificada de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 18, em que o domínio constante de IgG da molécula modificada possui uma afinidade maior para o FcRn do que um domínio constante da IgG humana de tipo selvagem.

20. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 19, em que o domínio constante da IgG da molécula modificada possui uma afinidade maior para o FcRn do que um domínio constante da IgG humana de tipo selvagem a pH 6,0 em comparação com pH 7,4.

21. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 20, em que a molécula modificada é uma IgG modificada.

22. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 21, em que a IgG modificada é uma IgG humana ou humanizada modificada.

23. Molécula modificada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, em que a molécula modificada é uma proteína de fusão que compreende uma proteína de tipo não IgG ligada de forma covalente ao domínio constante da IgG.

24. Molécula modificada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, em que o agente não proteico é conjugado com o domínio constante da IgG.

25. Composição farmacêutica que compreende a molécula modificada de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores e um veículo farmaceuticamente aceitável.

26. Kit que compreende a molécula modificada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, num recipiente, e instruções para utilização.

27. Ácido nucleico que compreende uma sequência nucleotídica que codifica o domínio constante da molécula modificada, tal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 24.

28. Célula hospedeira que compreende um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 27.

29. Molécula modificada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, para utilização no tratamento ou na prevenção de uma doença ou patologia num indivíduo.

30. Molécula modificada de acordo com a reivindicação 29, em que o indivíduo é um ser humano.

31. Molécula modificada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, para utilização no diagnóstico de uma doença ou patologia.

32. Conjugado de anticorpos que compreende a molécula modificada de acordo com uma das reivindicações 21 ou 22 e uma substância detectável.

33. Conjugado de anticorpos que compreende a molécula modificada de acordo com uma das reivindicações 21 ou 22 e um fragmento terapêutico.

34. Composição farmacêutica que compreende o conjugado de anticorpos de acordo com uma das reivindicações 32 ou 33 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

35. Kit que compreende o conjugado de anticorpos de acordo com uma das reivindicações 32 ou 33 e instruções para utilização.

36. Conjugado de anticorpos de acordo com a reivindicação 33 para a prevenção ou tratamento de uma doença ou patologia.

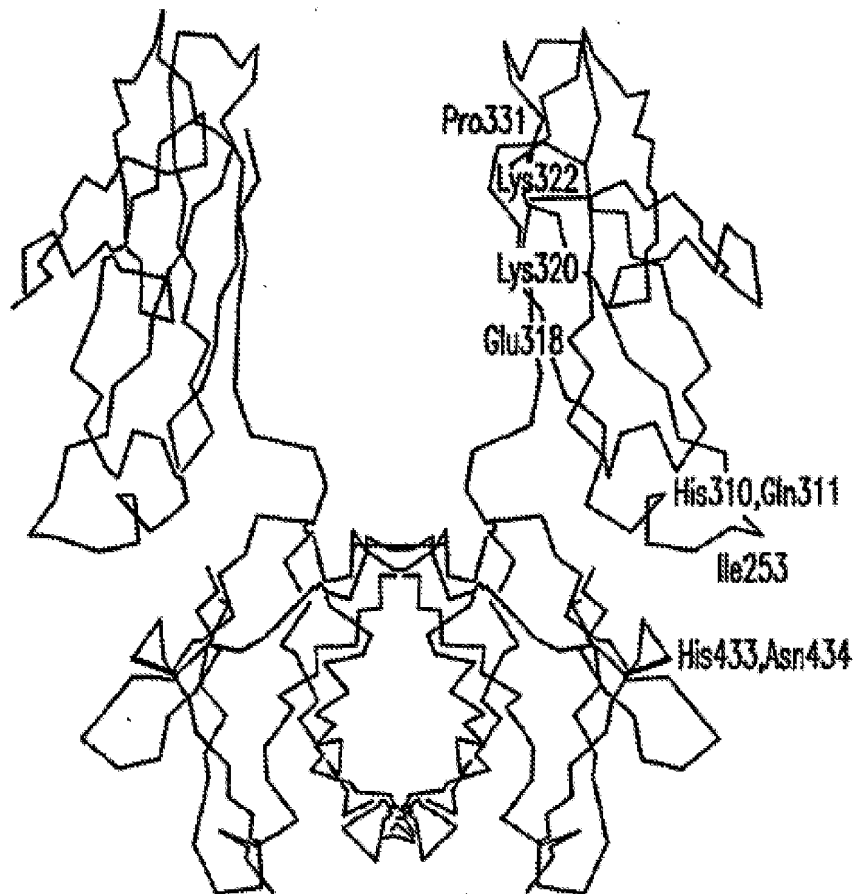


FIG.1

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1      5      10      15
|-----Hinge-----|
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
      20      25      30
-----
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
      35      40      45
-----
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
      50      55      60
-----CH2-----
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65      70      75      80
-----
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
      85      90      95
-----
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
      100      105      110
-----
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
      115      120      125
-----
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
      130      135      140
-----
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145      150      155      160
-----CH3-----
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
      165      170      175
-----
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
      180      185      190
-----
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
      195      200      205
-----
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
      210      215      220
-----
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225      230
|

```

FIG.2

Met	Gly	Val	Pro	Arg	Pro	Gln	Pro	Trp	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Phe
1				5				10						15	
Leu	Leu	Pro	Gly	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ser	His	Leu	Ser	Leu	Leu	Tyr
		20				25						30			
His	Leu	Thr	Ala	Val	Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Phe	Trp
		35				40					45				
Val	Ser	Gly	Trp	Leu	Gly	Pro	Gln	Gln	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Asn	Ser	Leu
	50				55					60					
Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Pro	Cys	Gly	Ala	Trp	Val	Trp	Glu	Asn	Gln	Val
65					70				75					80	
Ser	Trp	Tyr	Trp	Glu	Lys	Glu	Thr	Thr	Asp	Leu	Arg	Ile	Lys	Glu	Lys
			85					90					95		
Leu	Phe	Leu	Glu	Ala	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Gly	Lys	Gly	Pro	Tyr	Thr
		100						105					110		
Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Cys	Glu	Leu	Gly	Pro	Asp	Asn	Thr	Ser	Val
		115				120					125				
Pro	Thr	Ala	Lys	Phe	Ala	Leu	Asn	Gly	Glu	Glu	Phe	Met	Asn	Phe	Asp
	130					135					140				
Leu	Lys	Gln	Gly	Thr	Trp	Gly	Gly	Asp	Trp	Pro	Glu	Ala	Leu	Ala	Ile
145					150				155					160	
Ser	Gln	Arg	Trp	Gln	Gln	Gln	Asp	Lys	Ala	Ala	Asn	Lys	Glu	Leu	Thr
			165					170					175		
Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Cys	Pro	His	Arg	Leu	Arg	Glu	His	Leu	Glu	Arg
		180						185					190		
Gly	Arg	Gly	Asn	Leu	Glu	Trp	Lys	Glu	Pro	Pro	Ser	Met	Atg	Leu	Lys
		195					200					205			
Ala	Arg	Pro	Ser	Ser	Pro	Gly	Phe	Ser	Val	Leu	Thr	Cys	Ser	Ala	Phe
	210					215					220				
Ser	Phe	Tyr	Pro	Pro	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Gly	Leu
225					230					235				240	
Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Gln	Gly	Asp	Phe	Gly	Pro	Asn	Ser	Asp	Gly	Ser
			245					250					255		
Phe	His	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Lys	Ser	Gly	Asp	Glu	His	His
		260						265					270		
Tyr	Cys	Cys	Ile	Val	Gln	His	Ala	Gly	Leu	Ala	Gln	Pro	Leu	Arg	Val
	275					280					285				
Glu	Leu	Glu	Ser	Pro	Ala	Lys	Ser	Ser	Val	Leu	Val	Val	Gly	Ile	Val
	290					295				300					
Ile	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu
305					310					315				320	
Trp	Arg	Arg	Met	Arg	Ser	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Trp	Ile	Ser	Leu	Arg
				325				330					335		
Gly	Asp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Thr	Pro	Gly	Glu	Ala	Gln	Asp
		340						345					350		
Ala	Asp	Leu	Lys	Asp	Val	Asn	Val	Ile	Pro	Ala	Thr	Ala			
	355					360						365			

FIG.3A

Met	Gly	Met	Pro	Leu	Pro	Trp	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu
1				5					10					15	
Pro	Gln	Thr	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Arg	Pro	Pro	Leu	Met	Tyr	His	Leu
			20					25					30		
Thr	Ala	Val	Ser	Asn	Pro	Ser	Thr	Gly	Leu	Pro	Ser	Phe	Trp	Ala	Thr
		35					40					45			
Gly	Trp	Leu	Gly	Pro	Gln	Gln	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Asn	Ser	Leu	Arg	Gln
	50					55					60				
Glu	Ala	Asp	Pro	Cys	Gly	Ala	Trp	Val	Trp	Glu	Asn	Gln	Val	Ser	Trp
65					70					75					80
Tyr	Trp	Glu	Lys	Glu	Thr	Thr	Asp	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Gln	Leu	Phe
			85						90					95	
Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Thr	Leu	Glu	Lys	Ile	Leu	Asn	Gly	Thr	Tyr	Thr
			100					105					110		
Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Cys	Glu	Leu	Ala	Ser	Asp	Asn	Ser	Ser	Val
		115					120					125			
Pro	Thr	Ala	Val	Phe	Ala	Leu	Asn	Gly	Glu	Glu	Phe	Met	Lys	Phe	Asn
						135					140				
Pro	Arg	Ile	Gly	Asn	Trp	Thr	Gly	Glu	Trp	Pro	Glu	Thr	Glu	Ile	Val
145					150					155					160
Ala	Asn	Leu	Trp	Met	Lys	Gln	Pro	Asp	Ala	Ala	Arg	Lys	Glu	Ser	Glu
			165						170					175	
Phe	Leu	Leu	Asn	Ser	Cys	Pro	Glu	Arg	Leu	Leu	Gly	His	Leu	Glu	Arg
			180					185					190		
Gly	Arg	Arg	Asn	Leu	Glu	Trp	Lys	Glu	Pro	Pro	Ser	Met	Arg	Leu	Lys
		195					200					205			
Ala	Arg	Pro	Gly	Asn	Ser	Gly	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Cys	Ala	Ala	Phe
		210				215					220				
Ser	Phe	Tyr	Pro	Pro	Glu	Leu	Lys	Phe	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Gly	Leu
225					230					235					240
Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Cys	Ser	Thr	Gly	Pro	Asn	Gly	Asp	Gly	Ser
			245						250					255	
Phe	His	Ala	Trp	Ser	Leu	Leu	Glu	Val	Lys	Arg	Gly	Asp	Glu	His	His
			260					265					270		
Tyr	Gln	Cys	Gln	Val	Glu	His	Glu	Gly	Leu	Ala	Gln	Pro	Leu	Thr	Val
		275					280					285			
Asp	Leu	Asp	Ser	Ser	Ala	Arg	Ser	Ser	Val	Pro	Val	Val	Gly	Ile	Val
	290					295				300					
Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Leu
305					310					315					320
Trp	Gly	Arg	Met	Arg	Ser	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Trp	Leu	Ser	Leu	Ser
				325					330					335	
Gly	Asp	Asp	Ser	Gly	Asp	Leu	Leu	Pro	Gly	Gly	Asn	Leu	Pro	Pro	Glu
			340					345					350		
Ala	Glu	Pro	Gln	Gly	Ala	Asn	Ala	Phe	Pro	Ala	Thr	Ser			
		355					360					365			

FIG.3B

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 -----Hinge-----
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 40 45 50

 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 -----CH2-----
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140

 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 -----CH3-----
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

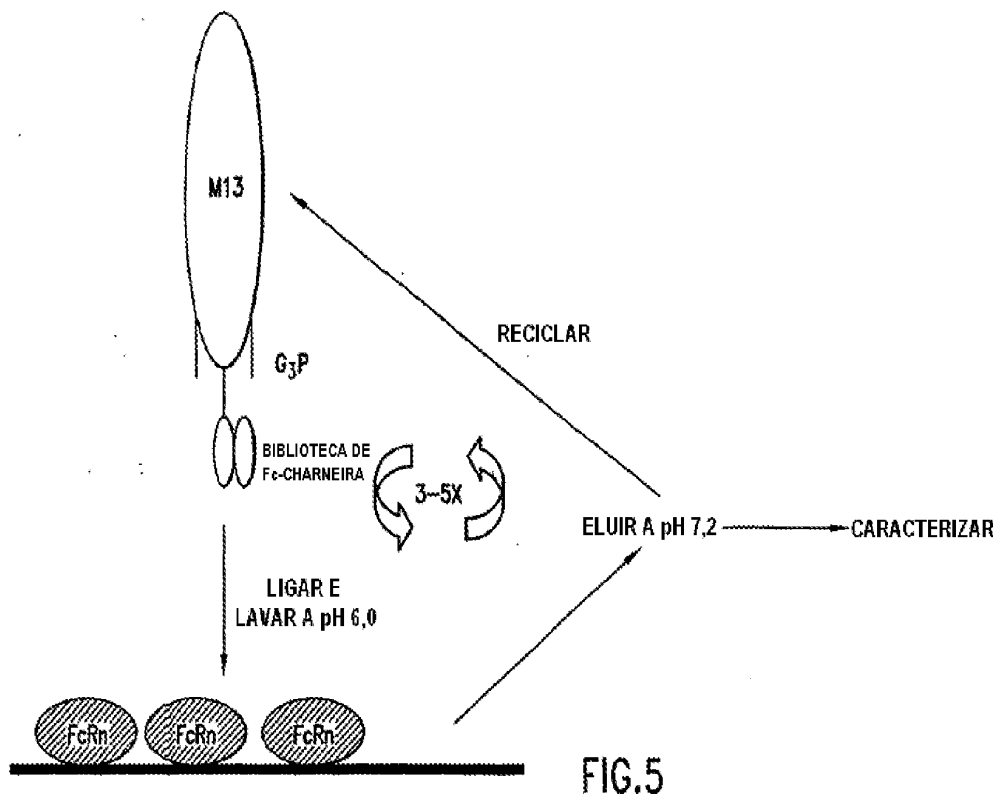
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

FIG.4



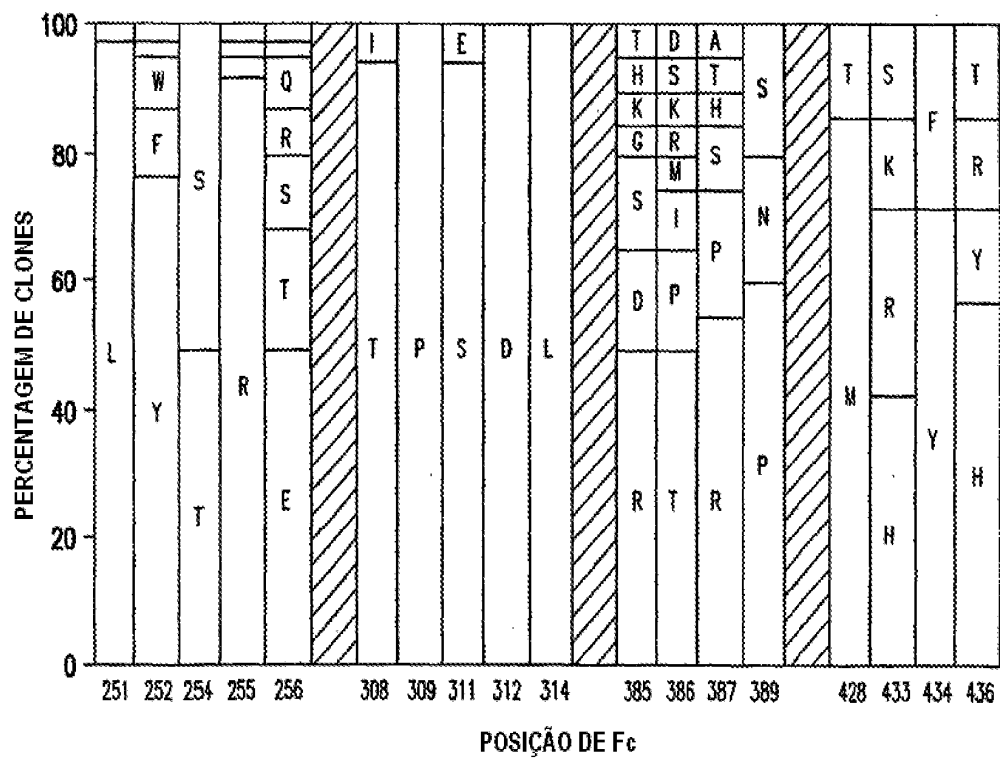


FIG.6

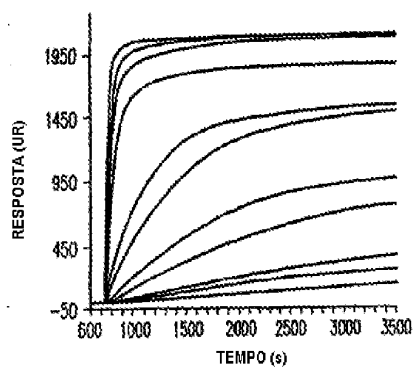


FIG. 7A

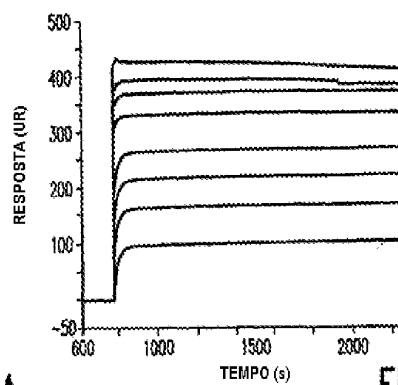


FIG. 7B

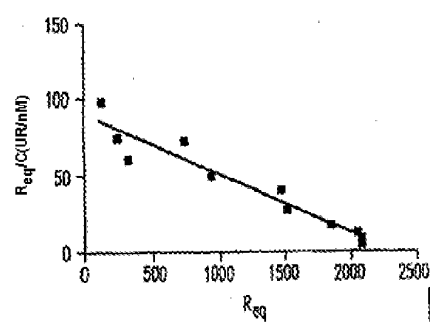


FIG. 7C

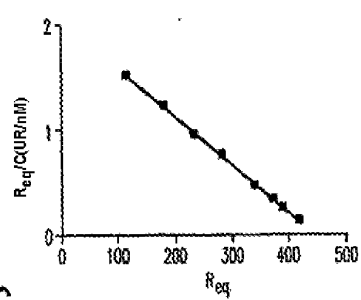


FIG. 7D

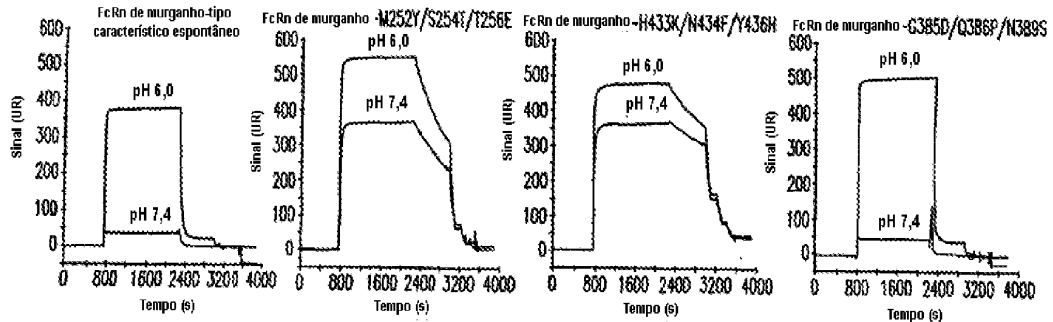


FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 8C

FIG. 8D

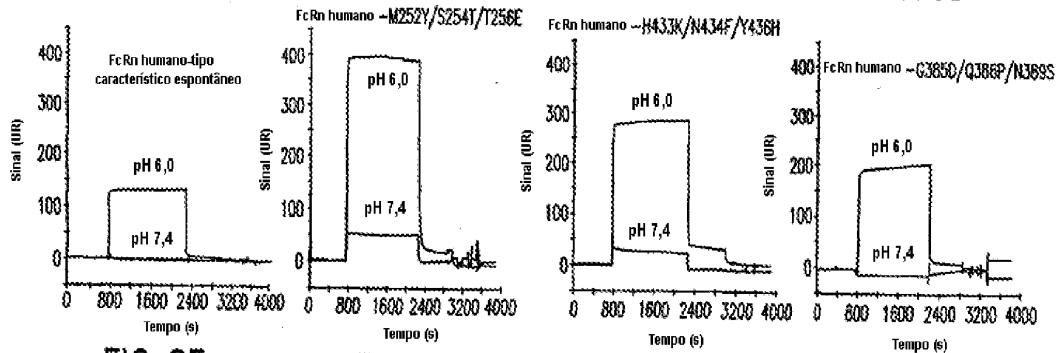


FIG. 8E

FIG. 8F

FIG. 8G

FIG. 8H

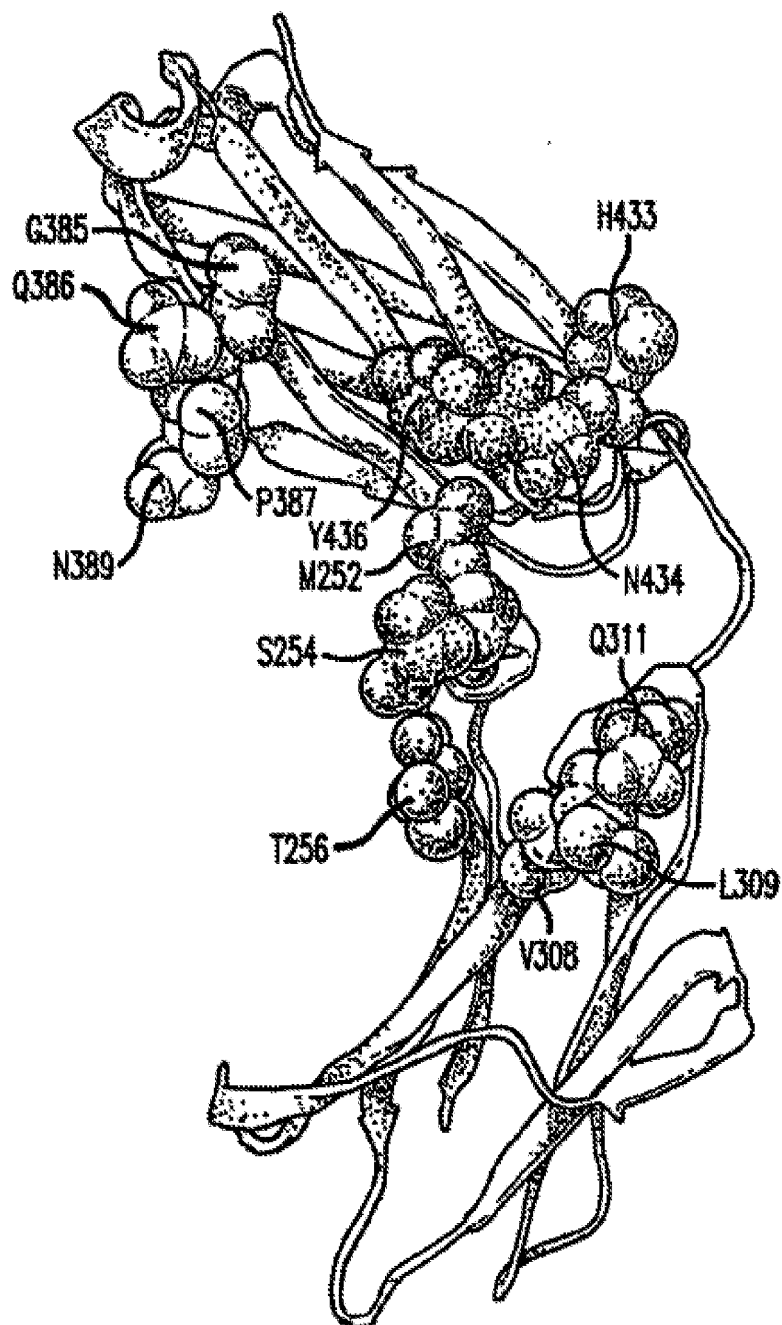


FIG.9

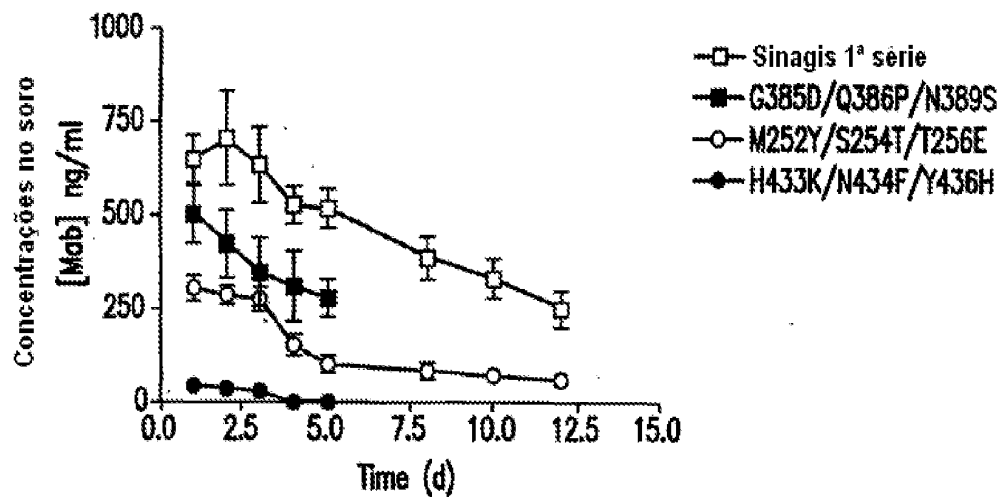


FIG.10