

(22) Data de pedido: 2004.12.10	(73) Titular(es): E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C.	
(30) Prioridade(s): 2003.12.10 US 529180 P	ROUTE 206 & PROVINCE LINE ROAD	
(43) Data de publicação do pedido: 2011.11.02	PRINCETON, NJ 08540	US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.03.11 115/2015	(72) Inventor(es): SHRIKANT DESHPANDE	US
	HAICHUN HUANG	US
	MOHAN SRINIVASAN	US
	JOSEPHINE M. CARDARELLI	US
	CHANGYU WANG	US
	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA	
	RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS IP-10 E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO FORNECE ANTICORPOS MONOCLONAIS ISOLADOS, PARTICULARMENTE ANTICORPOS HUMANOS, QUE SE LIGAM A IP-10 COM AFINIDADE ALTA, INIBEM A LIGAÇÃO DE IP-10 AO SEU RECEPTOR, INIBE O FLUXO DE CÁLCIO INDUZIDO POR IP-10 E INIBE A MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR IP-10. AS MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICAM OS ANTICORPOS DA INVENÇÃO, VECTORES DE EXPRESSÃO, CÉLULAS HOSPEDEIRAS E MÉTODOS PARA EXPRESSAR OS ANTICORPOS DA INVENÇÃO TAMBÉM SÃO FORNECIDOS. IMUNOCONJUGADOS, MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE COMPREENDEM OS ANTICORPOS DA INVENÇÃO TAMBÉM SÃO FORNECIDOS. A INVENÇÃO TAMBÉM FORNECE MÉTODOS PARA INIBIR A ACTIVIDADE DE IP-10 UTILIZANDO OS ANTICORPOS DA INVENÇÃO, INCLUINDO MÉTODOS PARA TRATAR VÁRIAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS E AUTOIMUNES.

RESUMO

ANTICORPOS IP-10 E SUAS UTILIZAÇÕES

A presente invenção fornece anticorpos monoclonais isolados, particularmente anticorpos humanos, que se ligam a IP-10 com afinidade alta, inibem a ligação de IP-10 ao seu receptor, inibe o fluxo de cálcio induzido por IP-10 e inibe a migração celular induzida por IP-10. As moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos da invenção, vectores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressar os anticorpos da invenção também são fornecidos. Imunoconjugados, moléculas biespecíficas e composições farmacêuticas que compreendem os anticorpos da invenção também são fornecidos. A invenção também fornece métodos para inibir a actividade de IP-10 utilizando os anticorpos da invenção, incluindo métodos para tratar várias doenças inflamatórias e autoimunes.

DESCRIÇÃO

ANTICORPOS IP-10 E SUAS UTILIZAÇÕES

Antecedentes da Invenção

A proteína 10 induzível pelo interferão gama (IP-10) (também conhecida como CXCL10) é uma quimiocina de 10 kDa que foi originalmente identificada com base na expressão do gene IP-10 em células tratadas com interferão gama (IFN-gama) (Luster, A. D. et al. (1985) Nature 315:672-676). A IP-10 mostra homologia com as proteínas tendo actividade quimiotática, tal como factor 4 de plaqueta e tromoboglobulina beta e às proteínas tendo actividade mitogénica, tal como péptido III activador de tecido conectivo (Luster, A. D. et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2868- 2871). A IP-10 é segregada por uma variedade de células, incluindo células endoteliais, monócitos, fibroblastos e queratinócitos, em resposta ao IFN- gama (Luster, A. D. e Ravetch, J. V. (1987) J. Exp. Med. 166:1084-1097). A IP-10 também mostrou estar presente em macrófagos dérmicos e células endoteliais em respostas de hipersensibilidade do tipo demorado (DTH) na pele humana (Kaplan, G. et al., (1987) J. Exp. Med. 166:1098-1108). Embora originalmente identificada com base na sua natureza induzida pelo IFN-gama, a IP-10 também pode ser induzida pelo IFN-alfa, por exemplo em células dendríticas (Padovan, E. et al, (2002) J Leukoc. Biol. 71:669-676). A expressão de IP-10 também pode ser induzida em células do sistema nervoso central, tais como astrócitos e microglia, por estímulos tais como IFN-gama, vírus e lipopolissacarídeo (Vanguri, R. e Farber, J. M. (1994) J. Immunol. 152:1411-1418; Ren, L. Q. et al, (1998) Brain Res. Mol. Brain Res. 59:256- 263). A imunobiologia de IP-10 é revisada em Neville, L. F et al, (1997) Cytokine Growth Factor Rev. 8:207-219.

O receptor para IP-10 foi identificado como CXCR3, um receptor de transmembrana sete (Loetscher, M. *et al.*, (1996) *J. Exp. Med.* 184:963-969). CXCR3 mostrou ser expressado em linfócitos T activados mas não em linfócitos T no repouso, nem em linfócitos B, monócitos ou granulócitos (Loetscher, M. *et al.*, *supra*). A expressão de CXCR3 mostrou ser supra regulada em células NK pelo estímulo com TGF-beta 1 (Inngjerdigen, M. *et al.* (2001) *Blood* 97:367-375). Dois outros ligandos para CXCR3 também foram identificados: MIG (Loetscher, M. *et al.*, *supra*) e ITAC (Cole, K. E. *et al.* (1998) *J. Exp. Med.* 187:2009-2021).

A ligação de IP-10 ao CXCR3 mostrou mediar a mobilização e a quimiotaxia de cálcio em células T activadas (Loetscher, M. *et al.*, *supra*). A quimiotaxia e mobilização de cálcio intracelular também são induzidas pela IP-10 que se liga a CXCR3 em células NK activadas (Maghazachi, A. A. *et al.* (1997) *FASEB J.* 11:765-774). Dentro do timo, a IP-10 mostrou ser um quimioatraente para células T $\text{TCR}\alpha\beta^+$ CD8^+ , células T $\text{TCR}\gamma\delta$ e células tipo NK (Romagnani, P. *et al.*, (2001) *Blood* 97:601-607).

A IP-10 ou seu receptor CXCR3 foram identificados numa variedade de condições inflamatórias e autoimunes diferentes, incluindo esclerose múltipla (veja-se, por exemplo, Sorensen, T. L. *et al.* (1999) *R Clin. Invest.* 103:807-815), artrite reumatoide (veja-se, por exemplo, Patel, D. D. *et al.* (2001) *Clin. Immunol.* 98:39-45), colite ulcerativa (veja-se, por exemplo, Uguccioni, M. *et al.* (1999) *Am. J. Pathol.* 155:331-336), hepatite (veja-se, por exemplo, Narumi, S. *et al.* (1997) *J. Immunol.* 158:5536-5544), dano à medula espinhal (veja-se, por exemplo, McTigue, D. M. *et al.* (1998) *J. Neurosci. Res.* 53:368-376; Gonzalez *et al.* 2003. *Exp. Neurol.* 184:456-463), lupo eritematoso sistémico (veja-se, por exemplo, Narumi, S. *et al.* (2000) *Cytokine* 12:1561-1565), rejeição a transplante

(veja-se, por exemplo, Zhang, Z. *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:3205-3212), síndrome de Sjogren (veja-se, por exemplo, Ogawa, N. *et al.* (2002) *Arthritis Rheum.* 46:2730-2741). Conseqüentemente, agentes terapêuticos que inibem a actividade são desejáveis, em particular agentes que são adequados para a utilização em seres humanos.

O documento WO 02/15932 descreve métodos para o tratamento de doenças desmielinizantes.

Liu, M. T. *et al.* (2001) *J. Immunol.* 167:4091-4097 divulga que a neutralização da quimiocina CXCL10 reduz a invasão de células inflamatórias e a desmielinização e melhora a função neurológica num modelo viral de esclerose múltipla.

Carr, D. J. *et al.* (2003) *Arvo Annual Meeting Abstract* divulga que anticorpos neutralizantes para a quimiocina CXCL10 reduzem a inflamação ocular e atrasam a propagação viral após a infeção da córnea por HSV-1.

Carr, D. J. *et al.* (2003) *J. Virol.* 77:10037-10046 divulga o efeito do anticorpo monoclonal anti-CXCL10 na queratite e infeção retiniana por herpes vírus tipo 1.

O documento WO 01/09187 divulga anticorpos monoclonais humanos para Her2/Neu.

McKay Brown *et al.* (1996) *J. Immunol.* 156:3285-3291 divulga a tolerância a uma única, mas não múltiplas, substituições de aminoácidos no anticorpo V-H CDR2.

Klein, R. S. *et al.* (2004) *J. Immunol.* 172:550-559 divulga a indução experimental de encefalomielite autoimune independente de proteína 10 induzível por IFN/ligando 10 de quimiocina CXC.

Sumário da Invenção

A presente invenção fornece anticorpos monoclonais isolados ou porções de ligação ao antigénio dos mesmos, que se ligam especificamente à IP-10 humana e não reagem de forma cruzada com MIG humano ou ITAC humano. Além disso, os anticorpos inibem a ligação de IP-10 ao seu receptor,

CXCR3, inibem o fluxo de cálcio induzido pela IP-10 em células que expressam receptor e inibem a migração celular induzida pela IP-10 (quimiotaxia). Além disso ainda, os anticorpos da invenção mostraram ligar-se à IP-10 em secções do cérebro de um paciente humano diagnosticado com esclerose múltipla.

Em formas de realização preferidas da invenção, a IP-10 humana compreende um polipéptido que tem uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 121 [N° de Ac. do Genbank NP_001556]; o CXCR3 compreende um polipéptido que tem uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 122 [N° de Ac. do Genbank NP_001495]; a IP-10 do macaco rhesus compreende um polipéptido que tem uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 123 [N° de Ac. do Genbank AAK95955]; a IP-10 de ratinho compreende um polipéptido que tem uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 124 [N° de Ac. do Genbank NP_067249]; o MIG humano compreende um polipéptido que tem uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 125 [N° de Ac. do Genbank NP_002407]; e/ou o ITAC humano compreende um polipéptido que tem uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 126 [N° de Ac. do Genbank NP 005400].

Numa forma de realização, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo se liga especificamente à IP-10 e compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou derivada a partir de um gene da linha germinativa humana V_H selecionado a partir do grupo que consiste num gene V_H 3-33 humano, um gene V_H 3-30.3 humano, um gene V_H 5-51 humano e um gene V_H 4-61 humano. Numa outra forma de realização, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo se liga

especificamente à IP-10 e compreende uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um gene da linha germinativa humana V_k selecionado a partir do grupo que consiste num gene V_k A27 humano, um gene V_k L15 humano, um gene V_k L6 humano e um gene V_k L18 humano. Ainda noutra forma de realização, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo, em que o anticorpo se liga especificamente à IP-10 e compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_h da linha germinativa humana selecionado a partir do grupo que consiste em num gene V_h 3-33 humano, um gene V_h 3-30.3 humano, um gene V_h 5-51 humano e um gene V_h 4-61 humano; e

(b) uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_k da linha germinativa humana selecionado a partir do grupo que consiste num gene V_k A27 humano, um gene V_k L15 humano, um gene V_k L6 humano e um gene V_k L18 humano.

Numa forma de realização, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo, em que o anticorpo compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_h 3-33 humano; e

(b) uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_k humano selecionado a partir do grupo que consiste de um V_k A27 humano, um gene V_k L15 humano e um gene V_k L6 humano,

em que o anticorpo se liga especificamente à IP-10.

Noutra forma de realização, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a

antigénio do mesmo, em que o anticorpo compreende:

- (a) uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_H 3-30.3 humano; e
- (b) uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_k L6 humano;

em que o anticorpo se liga especificamente à IP-10.

Noutra forma de realização, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo, em que o anticorpo compreende:

- (a) uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_H 5-51 humano; e
- (b) uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_k L18 humano;

em que o anticorpo se liga especificamente à IP-10.

Ainda noutra forma de realização, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação ao antigénio do mesmo, em que o anticorpo compreende:

- (a) uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_H 4-61 humano; e
- (b) uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_k A27 humano;

em que o anticorpo se liga especificamente à IP-10.

Noutro aspeto, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação a antigénio do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende sequências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve que compreende sequências CDR1, CDR2 e CDR3, em que:

(a) a sequência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, e

a sequência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 81;

(b) a sequência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e a sequência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; ou

(c) a sequência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a sequência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 77.

Numa forma de realização preferida, o anticorpo humano monoclonal isolado ou um fragmento de ligação a antigénio do mesmo compreende:

(a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 9, uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 21, uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 32, uma CDR1 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 59, uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 70 e uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 81;

(b) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 1, uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 13, uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 24, uma CDR1 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:

51, uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 62 e uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 73; ou

(c) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 5, uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17, uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 28, uma CDR1 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 55, uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 66 e uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 77.

O anticorpo pode ser, por exemplo, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico.

Noutro aspeto da invenção, os anticorpos, ou porções de ligação a antigénio dos mesmos, prevê-se que os anticorpos competem pela ligação à IP-10 com qualquer um dos anticorpos acima mencionados.

Os anticorpos da invenção podem ser, por exemplo, anticorpos de comprimento completo, por exemplo, de um isótipo IgG1 ou IgG4. Como alternativa, os anticorpos pode ser fragmentos de anticorpo, tal como fragmentos Fab ou Fab'2, ou anticorpos de cadeia simples.

A invenção também fornece um imunoconjugado que compreende um anticorpo da invenção, ou porção de ligação a antigénio do mesmo, ligado a um agente terapêutico, tal como uma citotoxina ou um isótopo radioactivo. A invenção também fornece uma molécula biespecífica que compreende um anticorpo, ou porção de ligação a antigénio do mesmo, da invenção, ligado a uma segunda fracção funcional que tem uma diferente especificidade de ligação do dito anticorpo, ou porção de ligação a antigénio do mesmo.

Composições que compreendem um anticorpo, ou porção de

ligação a antígeno do mesmo, ou imunoconjugado ou molécula biespecífica da invenção e um portador farmacologicamente aceitável são também fornecidas.

Moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos, ou porções de ligação a antígeno do mesmo, da invenção são também abrangidas pela invenção, bem como vectores de expressão que compreende tais ácidos nucleicos e células hospedeiras que compreendem tais vectores de expressão. Além disso, a invenção fornece um ratinho transgénico que compreende transgenes de cadeia leve e pesada de imunoglobulina humana, em que o ratinho expressa um anticorpo da invenção, bem como hibridomas preparado a partir de tal um ratinho, em que o hibridoma produz o anticorpo da invenção.

Noutro aspeto, a invenção proporciona anticorpos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos para utilização num método de inibição de uma resposta inflamatória ou autoimune mediada por células T ativadas ou células NK compreendendo o contacto das células T ou células NK com o anticorpo, ou porção de ligação a antígeno do mesmo, da invenção, de tal modo que a resposta inflamatória ou autoimune é inibida.

Ainda noutro aspeto, a invenção proporciona anticorpos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos para utilização num método de tratamento de uma doença inflamatória ou autoimune num indivíduo em necessidade de tratamento, compreendendo a administração ao indivíduo do anticorpo, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, da invenção, de tal modo que a doença inflamatória ou autoimune no indivíduo é tratada. A doença pode ser, por exemplo, esclerose múltipla, artrite reumatoide, doença inflamatória do intestino (por exemplo, colite ulcerativa, doença de Crohn), lúpus eritematoso sistémico, diabetes do tipo I, transtornos inflamatórios da pele (por exemplo, psoríase, líquen plano), doença da tiróide autoimune (por

exemplo, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto), síndrome de Sjogren, inflamação pulmonar (por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, sarcoidose pulmonar, alveolite linfocítica), rejeição de transplantes, lesão medular, lesão cerebral (por exemplo, acidente vascular cerebral), doenças neurodegenerativas (por exemplo, doença de Alzheimer, doença de Parkinson), gengivite, inflamação induzida por terapêutica génica, doenças da angiogénese, doença inflamatória do rim (por exemplo, nefropatia por IgA, glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite de rápida progressão) e aterosclerose.

Ainda noutro aspeto, a invenção proporciona anticorpos ou porções de ligação a antigénio dos mesmos para utilização num método de tratamento de uma infeção viral ou bacteriana envolvendo a atividade indesejada de IP-10 num indivíduo em necessidade de tratamento, compreendendo a administração ao indivíduo do anticorpo, ou porção de ligação a antigénio do mesmo, da invenção, de tal modo que a infeção viral ou bacteriana no indivíduo é tratada. Por exemplo, os anticorpos podem ser utilizados para tratar a meningite viral, encefalite viral ou meningite bacteriana. A infeção viral a ser tratada pelo método da invenção pode ser mediada, por exemplo, pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), vírus da hepatite C (HCV), vírus herpes simplex tipo I (HSV-1) ou pelo vírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS).

A invenção também proporciona métodos para a produção de anticorpos anti-IP-10 de "segunda geração" baseados nas sequências dos anticorpos anti-IP-10 proporcionadas no presente documento. Por exemplo, a invenção proporciona um método para a preparação de um anticorpo anti-IP-10, que compreende:

- (a) proporcionar: (i) uma sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada compreendendo uma

sequência CDR1 selecionada a partir das SEQ ID NOs: 5, 9 e 1, uma sequência CDR2 selecionada a partir das SEQ ID NOs: 17, 21 e 13 e uma sequência CDR3 selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28, 32 e 24; ou (ii) uma sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência CDR1 selecionada a partir das SEQ ID NOs: 55, 59 e 51, uma sequência CDR2 selecionada a partir das SEQ ID NOs: 66, 70 e 62 e uma sequência CDR3 selecionada a partir das SEQ ID NOs : 77, 81 e 73;

(b) alterar pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada e/ou da sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve para criar, pelo menos, uma sequência de anticorpo alterada; e

(c) expressar a sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1A mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 99) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 35) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 1D4. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 13) e CDR3 (SEQ ID NO: 24) são delineadas e as derivações de linha germinativa V, D e J são indicados.

A Figura 1B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 110) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 84) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 1D4. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 51), CDR2 (SEQ ID NO: 62) e CDR3 (SEQ ID NO: 73) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 2A mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 100) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 36) da região variável de cadeia pesada do anticorpo

monoclonal humano 1E1. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 2), CDR2 (SEQ ID NO: 14) e CDR3 (SEQ ID NO: 25) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 2B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 111) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 85) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 1E1. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 52), CDR2 (SEQ ID NO: 63) e CDR3 (SEQ ID NO: 74) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 3A mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 101) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 37) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 2G1. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 15) e CDR3 (SEQ ID NO: 26) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 3B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 112) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 86) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 2G1. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 53), CDR2 (SEQ ID NO: 64) e CDR3 (SEQ ID NO: 75) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 4A mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 102) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 38) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 3C4. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 4), CDR2 (SEQ ID NO: 16) e CDR3 (SEQ ID NO: 27) são delineadas e as derivações de linha germinativa V, D e J são indicadas.

A Figura 4B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 113) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 87) da região variável de cadeia leve do anticorpo

monoclonal humano 3C4. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 54), CDR2 (SEQ ID NO: 65) e CDR3 (SEQ ID NO: 76) são delineadas as derivações de linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 5A mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 103) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 39) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 6A5. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 17) e CDR3 (SEQ ID NO: 28) são delineadas e as derivações de linha germinativa V, D e J são indicadas.

A Figura 5B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 114) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 88) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 6A5. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 55), CDR2 (SEQ ID NO: 66) e CDR3 (SEQ ID NO: 77) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 6A mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 104) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 40) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 6A8. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 6), CDR2 (SEQ ID NO: 18) e CDR3 (SEQ ID NO: 29) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 6B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 115) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 89) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 6A8. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 56), CDR2 (SEQ ID NO: 67) e CDR3 (SEQ ID NO: 78) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 7A mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 105) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 41) da região variável de cadeia pesada do anticorpo

monoclonal humano 6B10. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 7), CDR2 (SEQ ID NO: 19) e CDR3 (SEQ ID NO: 30) são delineadas e as derivações de linha germinativa V, D e J são indicadas.

A Figura 7B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 116) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 90) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 6B10. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 57), CDR2 (SEQ ID NO: 68) e CDR3 (SEQ ID NO: 79) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 8A mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 106) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 42) da região variável de cadeia pesada do anticorpo 7C10 monoclonal humano. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 8), CDR2 (SEQ ID NO: 20) e CDR3 (SEQ ID NO: 31) são delineadas e as derivações de linha germinativa V, D e J são indicadas.

A Figura 8B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 117) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 91) da região variável de cadeia leve do anticorpo 7C10 monoclonal humano. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 58), CDR2 (SEQ ID NO: 69) e CDR3 (SEQ ID NO: 80) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 9A mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 107) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 43) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 8F6. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 21) e CDR3 (SEQ ID NO: 32) são delineadas e as derivações de linha germinativa V, D e J são indicadas.

A Figura 9B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 118) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 92) da região variável de cadeia leve do anticorpo

monoclonal humano 8F6. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 59), CDR2 (SEQ ID NO: 70) e CDR3 (SEQ ID NO: 81) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 10A mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 108) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 44) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 10A12. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 10), CDR2 (SEQ ID NO: 22) e CDR3 (SEQ ID NO: 33) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas. Como alternativa, o resíduo de aminoácido 32 dentro de CDR1 pode ser mutado de cisteína para serina (SEQ ID NO: 11), levando à sequência V_H da SEQ ID NO: 45.

A Figura 10B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 119) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 93) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 10A12. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 60), CDR2 (SEQ ID NO: 71) e CDR3 (SEQ ID NO: 82) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 11A mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 109) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 46) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 13C4. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 12), CDR2 (SEQ ID NO: 23) e CDR3 (SEQ ID NO: 34) são delineadas e as derivações de linha germinativa V, D e J são indicadas.

A Figura 11B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 120) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 94) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 13C4. As regiões de CDR1 (SEQ ID NO: 61), CDR2 (SEQ ID NO: 72) e CDR3 (SEQ ID NO: 83) são delineadas e as derivações da linha germinativa V e J são indicadas.

A Figura 12 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 7C10 e 10A12 com a sequência de aminoácidos V_H 3-33 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 47).

A Figura 13 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 6B10 e 8F6 com a sequência de aminoácidos V_H 3-30.3 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 48).

A Figura 14 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 3C4 com a sequência de aminoácidos V_H 5-51 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 49).

A Figura 15 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 13C4 com a sequência de aminoácidos V_H 4-61 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 50).

A Figura 16 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 e 13C4 com a sequência de aminoácidos V_k A27 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 95).

A Figura 17 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 1E1, 6B10 e 8F6 com a sequência de aminoácidos V_k L6 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 96).

A Figura 18 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 3C4 com a sequência de aminoácidos V_k LI8 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 97).

A Figura 19 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 7C10 com a sequência de aminoácidos V_k LI5 da linha germinativa humana (SEQ ID NO: 98).

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção refere-se a anticorpos monoclonais humanos isolados, que se ligam especificamente a IP-10 e que inibem propriedades funcionais de IP-10.

Em determinadas formas de realização, os anticorpos da invenção são derivados a partir de sequência de linha germinativa de cadeia pesada e leve particulares e/ou compreendem características estruturais particulares tais como regiões CDR que compreendem sequências de aminoácidos particulares. A invenção proporciona anticorpos isolados, métodos para fabricar os tais anticorpos, imunoconjugados e moléculas biespecíficas que compreende tal anticorpos e composições farmacêuticas que contêm os anticorpos, imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção. A invenção também se refere à utilização dos anticorpos para inibir respostas inflamatórias ou autoimunes, por exemplo, no tratamento de diversas doenças inflamatórias ou autoimunes, bem como à utilização dos anticorpos em métodos de tratamento de infeções virais que envolvem uma atividade indesejável da IP-10. De modo que a presente invenção possa ser mais facilmente entendida, certos termos são definidos em primeiro lugar. Definições adicionais são apresentadas por toda a descrição detalhada.

Os termos "proteína 10 induzível pelo interferão gama" "IP-10" e "CXCL10" são utilizados de forma intercambiável e incluem variantes, isoformas e espécies homólogas de IP-10 humano. Consequentemente, os anticorpos humanos da invenção, em certos casos, podem reagir cruzado com a IP-10 de espécies outras que não a humana. Em outros casos, os anticorpos podem ser completamente específicos para a IP-10 humana e podem não exibir espécie ou outros tipos de reactividade cruzada. A sequência de aminoácidos completa de IP-10 humano tem número de acesso no Genbank NP001556 (SEQ ID NO: 121). A sequência de aminoácidos completa da IP10 do macaco rhesus tem o número de acesso no Genbank

AAK95955 (SEQ ID NO: 123). A sequência de aminoácidos completa da IP-10 de ratinho tem o número de acesso no Genbank NP_067249 (SEQ ID NO: 124).

O termo "CXCR3" refere-se ao receptor para a IP-10 (CXCL10). A sequência de aminoácidos completa do CXCR3 humano tem o número de acesso no Genbank NP_001495 (SEQ ID NO: 122).

O termo "MIG" refere-se a um ligando para CXCR3, também conhecido como monocina induzida pelo interferão gama, que é distinta da IP-10. A sequência de aminoácidos completa de MIG humano tem o número de acesso no Genbank NP_002407 (SEQ ID NO: 125).

O termo "ITAC" refere-se a um ligando para CXCR3, também conhecido como quimioatraente alfa de célula T induzível pelo interferão, que é distinto da IP-10. A sequência de aminoácidos completa de ITAC humano tem o número de acesso no Genbank NP_005400 (SEQ ID NO: 126).

O termo "resposta imune" refere-se à acção de, por exemplo, linfócitos, células que apresentam antigénio, células fagocíticas, granulócitos e macromoléculas solúveis produzidas pelas células acima ou pelo fígado (incluindo anticorpos, citocinas e complemento) que resulta no dano selectivo aos agentes patogénicos invasores, na sua destruição ou eliminação do corpo humano, às células ou tecidos infectados com agentes patogénicos, células cancerosas, ou, em casos de auto-imunidade ou inflamação patológica, células ou tecidos humanos normais.

Uma "via de transdução de sinal" refere-se à relação bioquímica entre uma variedade de moléculas de transdução de sinal que desempenham um papel na transmissão de um sinal a partir de uma porção de uma célula para uma outra porção de uma célula. Como é utilizado no presente documento, a frase "receptor de superfície celular" inclui, por exemplo, moléculas e complexos de moléculas capazes de receber um sinal e a transmissão de um tal sinal através da

membrana plasmática de uma célula. Um exemplo de um "receptor de superfície celular" da presente invenção é o receptor CXCR3 ao qual a molécula IP-10 se liga.

O termo "anticorpo" como aqui aludido inclui anticorpos integrais e qualquer fragmento de ligação de antígeno (isto é, "porção de ligação de antígeno") ou cadeias únicas dos mesmos. Um "anticorpo" refere-se a uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interligadas pelas ligações de dissulfureto ou uma porção de ligação de antígeno deste. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (aqui abreviada como V_H) e uma região constante de cadeia pesada, a região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida de um domínio, C_L . As regiões V_H e V_L podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas de regiões determinadoras de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, chamadas de regiões de estrutura (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas do término amino para o término carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou factores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico.

O termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo"), como é utilizado no presente documento, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade para

ligar especificamente a um antigénio (por exemplo, IP-10). Isto mostrou que a função de ligação de antigénio de um anticorpo pode ser realizada pelos fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Os exemplos de fragmentos de ligação abrangidos dentro do termo "porção de ligação de antigénio" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste dos domínios V_L , V_H , C_L e C_{H1} ; (u) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente que compreenda dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfureto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste dos domínios V_H e C_{H1} ; (iv) um fragmento Fv que consiste dos domínios V_L e V_H de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento de dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste de um domínio V_H ; e (vi) uma região determinadora de complementaridade (CDR) isolada. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, utilizando métodos recombinantes, por um ligador sintético que permita que eles sejam fabricados como uma cadeia de proteína única na qual as regiões V_L e V_H se unam para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia única (scFv); veja-se, por exemplo, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; e Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia única também são intencionados a serem abrangidos dentro do termo "porção de ligação de antigénio" de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos utilizando técnicas convencionais conhecidas por aqueles com habilidade na técnica e os fragmentos são rastreados quanto a utilidade da mesma maneira como o são os anticorpos inteiros.

Um "anticorpo isolado", como é utilizado no presente documento, é intencionado a referir-se a um anticorpo que seja substancialmente livre de outros anticorpos que tem especificidades antigénicas diferentes (por exemplo, um

anticorpo isolado que se ligue especificamente à IP-10 é substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a antígenos outros que não a IP-10). Um anticorpo isolado que se liga especificamente a IP-10, entretanto, pode ter reactividade cruzada com outros antígenos, tais como as moléculas IP-10 de outra espécie. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material celular e/ou produtos químicos.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal" como são utilizados no presente documento referem-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal demonstra uma especificidade de ligação única e afinidade quanto a um epítipo particular.

O termo "anticorpo humano", como é utilizado no presente documento, é intencionado a incluir anticorpos que tem regiões variáveis em que tanto a região de estrutura quanto de CDR são derivadas das sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Além disso, se o anticorpo contém uma região constante, a região constante também é derivada de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados pelas sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas pela mutagenese aleatória ou específica de local *in vitro* ou pela mutação somática *in vivo*). Entretanto, o termo "anticorpo humano", como é utilizado no presente documento, não é intencionado a incluir anticorpos em que as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de uma outra espécie de mamífero, tal como um ratinho, foram enxertadas nas sequências da estrutura humana.

O termo "anticorpo monoclonal humano" refere-se a anticorpos que demonstram uma especificidade de ligação única que têm regiões variáveis em que tanto a região de

estrutura quanto a de CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Numa forma de realização, os anticorpos humanos monoclonais são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida a partir de um animal não humano transgênico, por exemplo, um ratinho transgênico, que tem um genoma que compreenda um transgene da cadeia pesada e um transgene da cadeia leve humanos fundidos a uma célula imortalizada.

O termo "anticorpo humano recombinante", como é utilizado no presente documento, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressados, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados a partir de um animal (por exemplo, um ratinho) que seja transgênico ou transcromossômico para os genes da imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado a partir deste (descrito mais abaixo), (b) anticorpos isolados a partir de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo humano, por exemplo, a partir de um transfectoma, (c) anticorpos isolados a partir de uma biblioteca de anticorpo humano recombinante, combinatória e (d) anticorpos preparados, expressados, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva a união das sequências de gene da imunoglobulina humana, a outras sequências de ADN. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis em que a estrutura e as regiões de CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Em certas formas de realização, entretanto, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos à mutagénese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para as sequências da Ig humana é utilizado, a mutagénese somática *in vivo*) e assim as sequências de aminoácido das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas das sequências V_H e V_L da linha germinativa humana e com elas relacionadas, podem não existir naturalmente dentro do repertório da linha

germinativa de anticorpo humano *in vivo*.

Como é utilizado no presente documento, "isotipo" refere-se à classe de anticorpo (por exemplo, IgM ou IgG1) que é codificado pelos genes constantes da região de cadeia pesada.

As frases "um anticorpo que reconhece um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" são utilizadas no presente documento de forma intercambiável com o termo "um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno."

Como é utilizado no presente documento, um anticorpo que "especificamente se liga à IP-10 humana" é intencionado a referir-se a um anticorpo que se liga à IP-10 humana com um K_D de 5×10^{-9} M ou menos, mais preferivelmente 2×10^{-9} M ou menos e ainda mais preferivelmente 1×10^{-1} M ou menos. Um anticorpo que "reage cruzado com a IP-10 do macaco rhesus" é intencionado a referir-se a um anticorpo que se liga à IP-10 do macaco rhesus com um K_D de $0,5 \times 10^{-8}$ M ou menos, mais preferivelmente 5×10^{-9} M ou menos e ainda mais preferivelmente 2×10^{-9} M ou menos. Um anticorpo que "não reage cruzado com a IP-10 de ratinho" ou "não reage cruzado com MIG humano" ou "não reage cruzado com ITAC humano" é intencionado a referir-se a um anticorpo que se liga à IP-10 de ratinho, MIG humano ou ITAC humano com um K_D de $1,5 \times 10^{-8}$ M ou maior, mais preferivelmente um K_D de 5 a 10×10^{-8} M ou maior e ainda mais preferivelmente 1×10^{-7} M ou maior. Em certas formas de realização, tais anticorpos que não reagem cruzado com a IP-10 de ratinho, MIG humano e/ou ITAC humano exibem ligação essencialmente indetectável contra estas proteínas em ensaios de ligação padrão.

Como é utilizado no presente documento, um anticorpo que "inibe a ligação da IP-10 ao CXCR3" é intencionado a referir-se a um anticorpo que inibe a ligação da IP-10 ao CXCR3 com um K_i de 1 nM ou menos, mais preferivelmente 0,75 nM ou menos, ainda mais preferivelmente 0,5 nM ou menos e

ainda mais preferivelmente 0,25 nM ou menos.

Como é utilizado no presente documento, um anticorpo que "inibe o fluxo de cálcio induzido pela IP-10" é intencionado a referir-se a um anticorpo que inibe o fluxo de cálcio induzido pela IP-10 com uma IC_{50} de 10 nM ou menos, mais preferivelmente 7,5 nM ou menos, ainda mais preferivelmente 5 nM ou menos e ainda mais preferivelmente 2,5 nM ou menos.

Como é utilizado no presente documento, um anticorpo que "inibe a migração celular induzida pela IP-10" é intencionado a referir-se a um anticorpo que inibe a migração celular humana induzida pela IP-10 com um IC_{50} de 2 $\mu\text{g/ml}$ ou menos, mais preferivelmente 1 $\mu\text{g/ml}$ ou menos, ainda mais preferivelmente 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ou menos e ainda mais preferivelmente 0,25 $\mu\text{g/ml}$ ou menos.

Os termos " K_{assoc} " ou " K_a ", como são utilizados no presente documento, são intencionados a referir-se à taxa de associação de uma interação de anticorpo-antigénio particular, ao passo que os termos " K_{dis} " ou " K_d ", como é utilizado no presente documento, são intencionados a referir-se à taxa de dissociação de uma interação de anticorpo-antigénio particular. O termo " K_D ", como é utilizado no presente documento, é intencionado a referir-se à constante de dissociação, que é obtida a partir da relação de IQ para K_a (isto é K_d/K_a) e é expressada como uma concentração molar (M). Os valores K_D para os anticorpos podem ser determinados utilizando métodos bem estabelecidos na técnica. Um método preferido para determinar a K_d de um anticorpo é utilizando-se a ressonância de plasma de superfície, preferivelmente utilizando um sistema biossensor tal como um sistema Biacore®.

Como é utilizado no presente documento, o termo "afinidade alta" para um anticorpo IgG refere-se a um anticorpo que tem um K_D de 10^{-8} M ou menos, mais preferivelmente 10^{-9} M ou menos e ainda mais

preferivelmente 10^{-10} M ou menos para um antigénio alvo. Entretanto, ligação de "afinidade alta" pode variar para outros isotipos de anticorpo. Por exemplo, ligação de "afinidade alta" para um isotipo IgM refere-se a um anticorpo que tem um K_D de 10^{-7} M ou menos, mais preferivelmente 10^{-8} M ou menos.

Como é utilizado no presente documento, o termo "indivíduo" inclui qualquer animal humano ou não humano. O termo "animal não humano" inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tal como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, cavalos, vacas, galinhas, anfíbios, répteis, etc.

Vários aspectos da invenção são descritos em mais detalhes nas seguintes subsecções.

Anticorpos Anti-IP-10

Os anticorpos da invenção são caracterizados por características ou propriedades funcionais particulares dos anticorpos. Por exemplo, os anticorpos se ligam especificamente à IP-10 humana. Adicionalmente, os anticorpos podem reagir cruzado com a IP-10 a partir de um ou mais primatas não humanos, tais como o macaco rhesus. Preferivelmente, os anticorpos não reagem cruzado com a IP-10 de ratinho. Além disso, embora MIG e ITAC também sejam ligandos para o receptor CXCR3, os anticorpos da invenção preferivelmente, não reagem cruzado com MIG humano ou ITAC humano.

Preferivelmente, um anticorpo da invenção se liga à IP-10 com afinidade alta, por exemplo com um K_D de 10^{-8} M ou menos ou 10^{-9} M ou menos ou ainda 10^{-10} M ou menos.

Além disso, os anticorpos da invenção são capazes de inibir uma ou mais actividades funcionais de IP-10. Por exemplo, numa forma de realização, os anticorpos inibem a ligação de IP-10 a CXCR3. Numa outra forma de realização, os anticorpos inibem o fluxo de cálcio induzido pela IP-10. Ainda numa outra forma de realização, os anticorpos

inibem a migração celular induzida pela IP-10 (quimiotaxia).

Os ensaios padrão para avaliar a capacidade de ligação dos anticorpos à IP-10 de várias espécies e/ou MIG ou ITAC são conhecidos na técnica, incluindo por exemplo, ELISAs, Western blots e RIAs. Os ensaios adequados são descritos em detalhes nos Exemplos. As cinéticas de ligação (por exemplo, afinidade de ligação) dos anticorpos também podem ser avaliadas pelos ensaios padrão conhecidos na técnica, tais como pela análise Biacore. Os ensaios para avaliar os efeitos dos anticorpos sobre as propriedades funcionais de IP-10 (por exemplo, ligação de receptor, fluxo de cálcio, quimiotaxia) são descritos em mais detalhes nos Exemplos.

Consequentemente, um anticorpo que "inibe" uma ou mais destas propriedades funcionais de IP-10 (por exemplo, bioquímica, imunoquímica, celular, fisiológica ou outras actividades biológicas ou coisa parecida) como determinado de acordo com metodologias conhecidas na técnica e aqui descritas, será entendido estar relacionado com uma diminuição estatisticamente significativa na actividade particular em relação àquela observada na ausência do anticorpo (por exemplo ou quando um anticorpo de controlo de especificidade irrelevante está presente). Preferivelmente um anticorpo que inibe uma actividade de IP-10 efectua uma tal diminuição estatisticamente significativa em pelo menos 10 % do parâmetro medido, mais preferivelmente em pelo menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % ou 90 % e em certas formas de realização preferidas um anticorpo da invenção pode inibir mais do que 92 %, 94 %, 95 %, 97 %, 98 % ou 99 % de uma actividade funcional de IP-10.

Anticorpos monoclonais 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4

Anticorpos preferidos da invenção são os anticorpos monoclonais humanos 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10,

7C10, 8F6, 10A12 e 13C4, isolados e estruturalmente caracterizados como é descrito nos Exemplos 1 e 2. Outro anticorpo preferido é o 10A12S, no qual o resíduo de aminoácido 32 da cadeia pesada de 10A12 (dentro da CDR1 de V_H) foi mutado a partir de cisteína para uma serina. As sequências V_H de aminoácidos de 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A2S e 13C4 são mostradas em SEQ ID NOs: 35-46, respectivamente. As sequências V_L de aminoácidos de 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4 são mostradas em SEQ ID NOs: 84-94, respectivamente.

Tendo em conta que cada um destes anticorpos se pode ligar à IP-10, as sequências V_H e V_L podem ser "misturadas e combinadas" para criar outras moléculas de ligação anti-IP-10 da invenção. A ligação a IP-10 de tais anticorpos "misturados e combinados" pode ser testada utilizando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (por exemplo, ELISAs). Preferivelmente, quando as cadeias V_H e V_L são misturadas e combinadas, uma sequência V_H a partir de um determinado emparelhamento V_H/V_L é substituída por uma sequência V_H estruturalmente semelhante. Da mesma forma, de preferência uma sequência V_L a partir de um determinado emparelhamento V_H/V_L é substituída por uma sequência V_L estruturalmente semelhante. Por exemplo, as sequências V_H e V_L de 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 ou 10A12S são particularmente favoráveis para misturar e combinar, uma vez que estes anticorpos utilizam sequências V_H e V_L derivadas a partir das mesmas sequências da linha germinativa (V_H 3-33 e V_k A27) e, portanto, elas exibem semelhança estrutural. Do mesmo modo, as sequências V_H e V_L de 8F6 e 6B10 são também particularmente favoráveis para misturar e combinar, uma vez que também elas utilizam sequências V_H e V_L derivadas a partir das mesmas sequências da linha germinativa (V_H 3-30.3 e V_k L6) e, portanto, elas exibem semelhança estrutural. Alternativamente, por

exemplo, a sequência V_H de 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 ou 10A12S pode ser emparelhada com a V_L de 13C4, uma vez que as sequências V_H de 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 e 10A12S originalmente emparelhadas com uma sequência V_L de V_k A27 de linha germinativa e a sequência V_L de 13C4 também é derivada a partir de V_k A27 de linha germinativa. Do mesmo modo, a sequência V_L de 7C10 ou 1E1 pode ser emparelhada com a V_H de 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 ou 10A12S, uma vez que as sequências V_L de 7C10 e 1E1 originalmente emparelhadas com uma sequência V_H de V_H 3-33 de linha germinativa e as sequências V_H de 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 e 10A12S também são derivadas a partir de V_H 3-33 de linha germinativa. Será facilmente aparente para o perito na especialidade que outros emparelhamentos V_H/V_L de sequências estruturalmente semelhantes podem ser criados a partir das sequências V_H e V_L divulgadas no presente documento para os anticorpos monoclonais 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4 divulgados no presente documento.

Consequentemente, num aspecto, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação a antígeno do mesmo que compreende:

- (a) uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 35-46; e
- (b) uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 84-94;

em que o anticorpo se liga especificamente à IP-10.

Combinações de cadeia leve e pesada preferidas incluem:

- (a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; e
- (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:

84; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 85; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 86; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 87; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 88; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 89; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 90; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:

91; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 43; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 92; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 ou 45; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 93; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 94.

Noutro aspeto, a invenção proporciona anticorpos que compreendem as CDR1s, CDR2s e CDRs3 de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S e 13C4, ou combinações dos mesmos. As sequências de aminoácidos da V_H CDR1s de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S e 13C4 são mostrados em SEQ ID NOs: 1-12. As sequências de aminoácidos da V_H CDR2s de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4 são mostrados em SEQ ID NOs: 13-23. As sequências de aminoácidos da V_H CDR3s de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4 são mostrados em SEQ ID NOs: 24-34. As sequências de aminoácidos das V_k CDR1s de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4 são mostrados em SEQ ID NOs: 51-61. As sequências de aminoácidos das V_k CDR2s de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4 são mostrados em SEQ ID NOs: 62-72. As sequências de aminoácidos das V_k CDR1s de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4 são mostrados em SEQ ID NOs: 73-83. As regiões CDR são delineadas

utilizando o sistema Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department de Health and Human Services, NIH Publicação No. 91-3242).

Tendo em conta que cada um destes anticorpos se pode ligar à IP-10 e que a especificidade de ligação a antígeno é fornecida primariamente pelas regiões CDR1, 2, 1 e 3, as sequências de V_H CDR1, 2 1 3 e as sequências V_L CDR1, 2 e 3 podem ser "misturadas e combinadas" (isto é, CDRs a partir de anticorpos diferentes podem ser misturadas e combinadas embora cada anticorpo deva conter uma V_H CDR1, 2 e 3 e uma V_L CDR1, 2 e 3) para criar outras moléculas de ligação anti-IP-10 da invenção. A ligação a IP-10 de tais anticorpos "misturados e combinados" pode ser testada utilizando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (por exemplo, ELISAs). Preferivelmente, quando as cadeias as sequências de V_H CDR são misturadas e combinadas, a sequência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma determinada sequência V_H é substituída por sequência(s) CDR estruturalmente semelhante(s). Do mesmo modo, quando as sequências V_L CDR são misturadas e combinadas, a sequência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma sequência V_L particular, é de preferência, substituída por sequência(s) CDR estruturalmente semelhante(s). Por exemplo, as V_H CDR1s de 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 10A12S compartilham alguma semelhança estrutural e, portanto, são passíveis de mistura e combinação, ao passo que as V_H CDR1s de 3C4 e 13C4 não são estruturalmente semelhantes às V_H CDR1s de 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 10A12S e, portanto, não devem ser misturadas e combinadas com elas. Será prontamente aparente para o perito na especialidade que novas sequências V_H e V_L podem ser criadas por substituição de uma ou mais sequências da região V_H e/ou V_L CDR com sequências estruturalmente semelhantes a partir das sequências CDR divulgadas no

presente documento para os anticorpos monoclonais 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4.

Consequentemente, noutro aspeto, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação ao antigénio do mesmo, que compreende:

- (a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1-12;
- (b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 13-23;
- (c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 24-34;
- (d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 51-61;
- (e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 62-72; e
- (f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 73-83;

em que o anticorpo se liga especificamente à IP-10.

Numa forma de realização preferida, o anticorpo compreende:

- (a) uma CDR1 da região variável da cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 1;
- (b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 13;
- (c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 24;
- (d) uma CDR1 da região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 51;

(e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 62; e

(f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 73.

Noutra forma de realização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 da região variável da cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 2;

(b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 14;

(c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 25;

(d) uma CDR1 da região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 52;

(e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 63; e

(f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 74.

Noutra forma de realização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 da região variável da cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 3;

(b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 15;

(c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 26;

(d) uma CDR1 da região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 53;

(e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 64; e

(f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 75.

Noutra forma de realização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 da região variável da cadeia pesada que

compreende a SEQ ID NO: 4;

(b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 16;

(c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 27;

(d) uma CDR1 da região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 54;

(e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 65; e

(f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 76.

Noutra forma de realização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 da região variável da cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 5;

(b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17;

(c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 28;

(d) uma CDR1 da região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 55;

(e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 66; e

(f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 77.

Noutra forma de realização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 da região variável da cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 6;

(b) uma região variável de cadeia pesada CDR2. que compreende a SEQ ID NO: 18;

(c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 29;

(d) uma CDR1 da região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 56;

(e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 67; e

(f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78.

Noutra forma de realização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 da região variável da cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 7

(b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19;

(c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 30;

(d) uma CDR1 da região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 57;

(e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 68; e

(f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 79.

Noutra forma de realização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 da região variável da cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 8;

(b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 20;

(c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 31;

(d) uma CDR1 da região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 58;

(e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 69; e

(f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80.

Noutra forma de realização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 da região variável da cadeia pesada que

compreende a SEQ ID NO: 9;

(b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 21;

(c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 32;

(d) uma CDR1 da região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 59;

(e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 70; e

(f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 81.

Numa outra forma de realização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 da região variável da cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 10 ou 11;

(b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 22;

(c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 33;

(d) uma CDR1 da região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 60;

(e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 71; e

(f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82.

Noutra forma de realização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 da região variável da cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 12;

(b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 23;

(c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 34;

(d) uma CDR1 da região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 61;

(e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 72; e

(f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 83.

Anticorpos Que têm Sequências da Linha Germinativa Particulares

Em certas formas de realização, um anticorpo da invenção compreende uma região variável de cadeia pesada de um gene da imunoglobulina de cadeia pesada da linha germinativa particular e/ou uma região variável de cadeia leve de um gene da imunoglobulina de cadeia leve da linha germinativa particular.

Como é demonstrado no presente documento, os anticorpos humanos específicos para IP-10 foram preparados de modo que compreendessem uma região variável de cadeia pesada que é o produto de um gene VH 3-33, gene VH 3-30.3, gene VH 5-51 ou gene V_H 4-61 da linha germinativa humana. Consequentemente, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_H da linha germinativa humana selecionado a partir do grupo que consiste em: V_H 3-33, V_H 3-30.3, V_H 5-51 e V_H 4-61. De preferência, o anticorpo é específico para um polipéptido de IP-10 humano (por exemplo, que compreende a sequência de Genbank Acc. No. NP_001556).

Também como é demonstrado no presente documento, anticorpos humanos específicos para IP-10 foram preparados de modo que compreendessem uma região variável de cadeia leve que é o produto derivado de um gene V_k A27, gene V_k LI5, gene V_k L6 ou gene V_k L18 da linha germinativa humana. Consequentemente, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um

gene V_k da linha germinativa humana selecionado a partir do grupo que consiste em: V_k A27, V_k L15, V_k L6 e V_k L18. De preferência, o anticorpo é específico para um polipéptido de IP-10 humano (por exemplo, que compreende a sequência de Genbank Acc. No. NP_ 001556).

Anticorpos preferidos da presente invenção são os que compreendem uma região variável da cadeia pesada que é o produto de, ou derivada a partir de um dos genes V_H da linha germinativa humana acima listados e que compreende também uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um dos genes V_k da linha germinativa humana acima listados. Consequentemente, noutra forma de realização, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_H da linha germinativa humana selecionado a partir do grupo que consiste em: V_H 3-33, V_H 3-30.3, V_H 5-51 e V_H 4-61; e

(b) uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_k da linha germinativa humana selecionado a partir do grupo que consiste em: V_k A27, V_k L15, V_k L6 e V_k L18. De preferência, o anticorpo é específico para um polipéptido de IP-10 humano (por exemplo, que compreende a sequência de Genbank Acc. No. NP_ 001556).

A invenção também proporciona anticorpos que compreendem combinações preferidas de regiões variáveis de cadeia pesada e leve que são o produto de, ou derivadas a partir de genes V_H e V_k da linha germinativa. Por exemplo, numa forma de realização preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo:

(a) compreende uma região variável da cadeia pesada que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_H 3-33 humano (que codifica a sequência de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 47);

(b) compreende uma região variável da cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_k A27, L15 ou L6 humano (que codifica as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NOs: 95, 98 e 97, respetivamente); e

(c) que se liga especificamente à IP-10.

Numa forma de realização, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_k A27 humano. Exemplos de anticorpos que tem V_H e V_k de V_H 3-33 e V_k A27, respectivamente, incluem 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 e 10A12S. Noutra forma de realização, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou derivada a partir de um gene V_k L15 humano. Um exemplo de um anticorpo que tem V_H e V_k de V_H 3-33 e V_k L15, respectivamente, é 7C10. Noutra forma de realização, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve de um gene V_k L6 humano. Um exemplo de um anticorpo que tem V_H e V_k de V_H 3-33 e V_k L6, respectivamente, é 1E1.

Noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo, em que o anticorpo:

(a) compreende uma região variável de cadeia pesada de, ou derivada a partir de um gene V_H 3-30.3 humano (que codifica a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 48);

(b) compreende uma região variável de cadeia leve de, ou derivada a partir de humano gene V_k L6 humano (que codifica a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 96); e

(c) se liga especificamente à IP-10.

Exemplos de anticorpos que têm V_H e V_K de V_H 3-30,3 e V_K L6, respectivamente, incluem 6B10 e 8F6.

Noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo:

- (a) compreende uma região variável de cadeia pesada de, ou derivada a partir de um gene V_H 5-51 humano (que codifica a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 49);
- (b) compreende uma região variável de cadeia leve de, ou derivada a partir de humano gene V_K L18 humano (que codifica a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 97); e
- (c) se liga especificamente à IP-10.

Um exemplo de um anticorpo que tem V_H e V_K de V_H 5-51 e V_K L18, respectivamente, é 3C4.

Noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo:

- (a) compreende uma região variável de cadeia pesada de, ou derivada a partir de um gene V_H 4-61 humano (que codifica a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 50);
- (b) compreende uma região variável de cadeia leve de, ou derivada a partir de humano gene V_K A27 humano (que codifica a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 95); e
- (c) se liga especificamente à IP-10.

Um exemplo de um anticorpo que tem V_H e V_K de V_H 4-61 e V_K A27, respectivamente, é 13C4.

Como é utilizado no presente documento, um anticorpo humano compreende as regiões variáveis de cadeia pesada ou leve que é "o produto de" ou "derivado de" uma sequência da linha germinativa particular se as regiões variáveis do anticorpo são obtidas de um sistema que use genes da

imunoglobulina da linha germinativa humana. Tais sistemas incluem imunizar um ratinho transgênico que carrega genes da imunoglobulina humana com o antígeno de interesse ou rastrear uma biblioteca de gene da imunoglobulina humana demonstrada no fago com o antígeno de interesse. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma sequência de imunoglobulina da linha germinativa humana pode ser identificada como tal comparando-se a sequência de aminoácidos do anticorpo humano com as sequências de aminoácido das imunoglobulinas da linha germinativa humana e seleccionando a sequência de imunoglobulina da linha germinativa humana que for mais próxima na sequência (isto é, a maior % de identidade) com a sequência do anticorpo humano. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma sequência de imunoglobulina da linha germinativa humana particular pode conter diferenças de aminoácido quando comparado com a sequência da linha germinativa, devido, por exemplo, às mutações somáticas que ocorrem naturalmente ou à introdução intencional da mutação direccionada ao local. Entretanto, um anticorpo humano seleccionado tipicamente é pelo menos 90 % idêntico em sequência de aminoácidos a uma sequência de aminoácido codificada por um gene da imunoglobulina da linha germinativa humana e contém resíduos de aminoácido que identificam o anticorpo humano como sendo humano quando comparado com as sequências de aminoácido da imunoglobulina da linha germinativa de outras espécies (por exemplo, as sequências da linha germinativa de murino). Em certos casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 95 % ou ainda pelo menos 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntico na sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos codificada pelo gene da imunoglobulina da linha germinativa. Tipicamente, um anticorpo humano derivado de uma sequência da linha germinativa humana particular não demonstrará mais de 10 diferenças de aminoácido da

sequência de aminoácidos codificada pelo gene da imunoglobulina da linha germinativa humana. Em certos casos, o anticorpo humano não pode demonstrar mais do que 5 ou ainda não mais do que 4, 3, 2 ou 1 diferença de aminoácido da sequência de aminoácidos codificada pelo gene da imunoglobulina da linha germinativa.

Anticorpos Homólogos

Ainda noutra forma de realização, um anticorpo da invenção compreende regiões variáveis de cadeia pesada e leve que compreendem as sequências de aminoácidos que são homólogas às sequências de aminoácidos dos anticorpos preferidos descritos no presente documento, e em que os anticorpos conservem as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos anti-IP-10 da invenção.

Por exemplo, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve, em que:

- (a) a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 35-46;
- (b) a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 84-94;
- (c) o anticorpo liga-se especificamente à IP-10, e
- (d) o anticorpo exibe, pelo menos, uma das seguintes propriedades funcionais:
 - (i) o anticorpo inibe a ligação de IP-10 a CXCR3;
 - (ii) o anticorpo inibe o fluxo de cálcio induzido por IP-10;
 - (iii) o anticorpo inibe a migração celular induzida por IP-10;
 - (iv) o anticorpo reage de forma cruzada com a IP-10

de macaco rhesus;

(v) o anticorpo não reage de forma cruzada com a IP-10 de ratinho;

(vi) o anticorpo não reage de forma cruzada com MIG humano;

(vii) o anticorpo não reage de forma cruzada com ITAC humano.

Em várias formas de realização, o anticorpo pode apresentar uma ou mais, duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais das propriedades funcionais listadas como (d) a (j) acima. O anticorpo pode ser, por exemplo, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico.

Noutras formas de realização, as sequências de aminoácidos V_H e/ou V_L podem ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogas às sequências acima estabelecidas. Um anticorpo que possui regiões V_H e V_L possuindo elevada (isto é, 80% ou mais) homologia com as regiões V_H e V_L de SEQ ID NOs: 35-46 e 84-94, respetivamente, podem ser obtidas através de mutagénese (por exemplo, mutagénese sítio-dirigida ou mediada por PCR) de moléculas de ácidos nucleicos que codificam as SEQ ID NO: 35-46 e/ou 84-94, seguidas pelos testes da função retida do anticorpo alterado codificado (isto é, as funções estabelecidas em (c) a (j) acima) utilizando os ensaios funcionais descritos no presente documento.

Tal como usado no presente documento, a percentagem de homologia entre duas sequências de aminoácidos é equivalente à percentagem de identidade entre as duas sequências. A percentagem de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas partilhadas pelas sequências (isto é, % de homologia = # de posições idênticas/# total de posições x 100), tendo em conta o número de intervalos, e o comprimento de cada intervalo, que precisam de ser introduzidos para

alinhamento ótimo das duas sequências. A comparação de sequências e determinação da percentagem de identidade entre duas sequências pode ser realizada usando um algoritmo matemático, conforme descrito nos exemplos não limitativos a seguir.

A percentagem de identidade entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada utilizando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (Comput. Appl Biosci., 4:11-17 (1988)) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de peso de resíduos PAM120, uma penalidade de comprimento de intervalo de 12 e uma penalidade de intervalo de 4. Além disso, a percentagem de identidade entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada utilizando o algoritmo de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), utilizando uma matriz de Blossum 62 ou uma matriz PAM250, e um peso de intervalo de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso do comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

Adicionalmente, ou em alternativa, as sequências de proteína da presente invenção pode ainda ser utilizadas como uma "sequência de consulta" para realizar uma pesquisa em bases de dados públicas para, por exemplo, identificar sequências relacionadas. Tais pesquisas podem ser realizadas com o programa XBLAST (versão 2.0) de Altschul, et al (1990) J. Mol. Biol. 215:403- 10. As pesquisas BLAST de proteínas podem ser realizadas com o programa XBLAST, pontuação = 50, comprimento de palavra = 3 para se obter sequências de aminoácidos homólogas às moléculas de anticorpo da invenção. Para obter alinhamentos com intervalos para fins de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizados como descrito em Altschul et al, (1997) Nucleic. Acids Res. 25(17):3389-3402_. Quando se utilizam os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros predefinidos

dos programas respectivos (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser utilizados. Veja-se <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Anticorpos com modificações conservativas

Em certas formas de realização, um anticorpo da invenção compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo sequências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências CDR1, CDR2 e CDR3, em que uma ou mais destas sequências CDR compreendem sequências de aminoácidos especificadas com base nos anticorpos preferidos descritos no presente documento (por exemplo, 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S ou 13C4), ou modificações conservativas dos mesmos, e em que os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos anti-IP-10 da invenção. Por conseguinte, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação ao antigénio do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo sequências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve compreendendo sequências CDR1, CDR2 e CDR3, em que:

- (a) a sequência CDR3 da região variável da cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 24-34, e modificações conservativas das mesmas;
- (b) a sequência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na sequência de aminoácidos ou SEQ ID NOs: 73-83, e modificações conservativas das mesmas;
- (c) o anticorpo se liga especificamente a IP-10, e
- (d) o anticorpo exibe, pelo menos, uma das seguintes propriedades funcionais:
 - (i) o anticorpo inibe a ligação de IP-10 a CXCR3;
 - (ii) o anticorpo inibe o fluxo de cálcio induzido

por IP-10;

(iii) o anticorpo inibe a migração celular induzida por IP-10;

(iv) o anticorpo reage de forma cruzada com a IP-10 de macaco rhesus;

(v) o anticorpo não reage de forma cruzada com a IP-10 de ratinho;

(vi) o anticorpo não reage de forma cruzada com MIG humano;

(vii) o anticorpo não reage de forma cruzada com ITAC humano.

Numa forma de realização preferida, a sequência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 13-23, e modificações conservativas das mesmas; e a sequência CDR2 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 62-72, e modificações conservativas das mesmas. Numa outra forma de realização preferida, a sequência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1-12, e modificações conservativas das mesmas; e a sequência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 51-61, e modificações conservativas das mesmas.

Em várias formas de realização, o anticorpo pode apresentar uma ou mais, duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais das propriedades funcionais listadas como (d) a (j) acima. Tais anticorpos podem ser, por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados ou anticorpos quiméricos.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "modificações de sequência conservativas" pretende referir-se a modificações de aminoácidos que não afetam ou alteram significativamente as características de ligação do anticorpo que contém a sequência de aminoácidos. Tais modificações conservativas incluem substituições de aminoácidos, adições e deleções. As modificações podem ser introduzidas num anticorpo da presente invenção por meio de técnicas convencionais conhecidas na técnica, tais como mutagênese sítio-dirigida e mutagênese mediada por PCR. As substituições conservativas de aminoácidos são aquelas em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral semelhante. As famílias de resíduos de aminoácidos possuindo cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares sem carga (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim, um ou mais resíduos de aminoácidos dentro das regiões CDR de um anticorpo da invenção podem ser substituídos com outros resíduos de aminoácidos a partir da mesma família de cadeias laterais e o anticorpo alterado pode ser testados quanto à função retida (isto é, as funções estabelecidas em (c) a (j) acima), utilizando os ensaios funcionais descritos no presente documento.

Anticorpos que se Ligam ao Mesmo Epítopo que os Anticorpos Anti-IP-10 da Invenção

Noutra forma de realização, a invenção proporciona anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo que dos vários anticorpos anti-IP-10 da invenção fornecidos no presente documento, tal como outros anticorpos humanos que se ligam ao mesmo epítopo como os anticorpos 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S ou 13C4 descritos no presente documento. Tais anticorpos adicionais podem ser identificados com base em sua capacidade de competir cruzado (*por exemplo*, para inibir competitivamente a ligação de, de uma maneira estatisticamente significativa) com outros anticorpos da invenção, tais como 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S ou 13C4 em ensaios de ligação a IP-10 padrão. A capacidade de um anticorpo de teste de inibir a ligação de, *por exemplo*, 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S ou 13C4 a IP-10 humana demonstra que o anticorpo de teste pode competir com esse anticorpo para ligação a IP-10 humana; tal anticorpo pode, de acordo com teoria não limitativa, se ligar ao mesmo ou um epítopo relacionado (*por exemplo*, um estruturalmente similar ou espacialmente proximal) com IP-10 humana como o anticorpo com que compete. Numa forma de realização preferida, o anticorpo que se liga a o mesmo epítopo em IP-10 humana como 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S ou 13C4 é um anticorpo monoclonal humano. Tais anticorpos monoclonais humanos podem ser preparados e isolados como é descrito nos Exemplos.

Anticorpos Manipulados e Modificados

Um anticorpo da invenção também podem ser preparado utilizando um anticorpo com uma ou mais das sequências VH e/ou VL divulgadas no presente documento como material de iniciação para manipular um anticorpo modificado, anticorpo modificado o qual pode ter propriedades alteradas em relação ao anticorpo de iniciação. Um anticorpo pode ser manipulado por modificação de um ou mais resíduos dentro de

uma ou ambas as regiões variáveis (isto é, VH e/ou VL), por exemplo, dentro de uma ou mais regiões CDR e/ou dentro de uma ou mais regiões estruturais. Adicionalmente ou em alternativa, um anticorpo pode ser manipulado por modificação de resíduos dentro da(s) região(ões) constante(s), por exemplo, para alterar a(s) função(ões) efetora(s) do anticorpo.

Um tipo de manipulação da região variável que pode ser realizado é o enxerto de CDR. Os anticorpos interagem com antígenos alvo predominantemente através de resíduos de aminoácidos que estão localizados nas seis regiões determinantes de complementaridade (CDR) de cadeia leve e pesada. Por esta razão, as sequências de aminoácidos dentro das CDRs são mais diversas entre anticorpos individuais do que as sequências fora das CDRs. Como as sequências CDR são responsáveis pela maioria das interações anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que imitem as propriedades de anticorpos específicos que ocorrem naturalmente através da construção de vetores de expressão que incluem sequências CDR do anticorpo específico que ocorre naturalmente enxertado em sequências estruturais de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (veja-se, por exemplo, Riechmann, L. *et al* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al* (1989) *Proc. Natl. Acad.* Veja-se EUA 86:10029-10033; documento de Patente US N.º 5.225.539 para Winter, e documentos de Patente US N.ºs 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 para Queen *et al*).

Por conseguinte, uma outra forma de realização da invenção diz respeito a um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo sequências CDR1, CDR2, e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste

nas SEQ ID NOS: 1-12, SEQ ID NOS: 13-23 e SEQ ID NOS: 24-34, respectivamente, e uma região variável de cadeia leve que compreende sequências CDRs, CDR2, e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 51-61, SEQ ID NOS: 62-72 e SEQ ID NOS: 73-83, respectivamente. Assim, tais anticorpos contêm as sequências VH e VL CDR dos anticorpos monoclonais 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S ou 13C4 embora possam conter diferentes sequências estruturais em relação a estes anticorpos.

Tais sequências estruturais podem ser obtidas a partir de bases de dados de ADN públicas ou referências publicadas que incluem sequências de genes de anticorpo da linha germinativa. Por exemplo, sequências de ADN da linha germinativa para genes de regiões variáveis de cadeia pesada e leve humanas podem ser encontradas na base de dados de sequências da linha germinativa humana "Vbase" (disponível na Internet em www.mrc-cue.cam.ac.uk/ybase), bem como em Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services,, Publicação de NIH N.º 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; e Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836.

Sequências estruturais preferidas para utilização nos anticorpos da invenção são aquelas que são estruturalmente semelhantes às sequências estruturais utilizadas por anticorpos selecionados da invenção, por exemplo, semelhantes às sequências de VH 3-33, 3-30.3, 4-61 ou 5-51 [SEQ ID NOS: 47-50] e/ou sequências estruturais de Vk A27, L6, L18 ou L15 [SEQ ID NOS: 95-98] utilizadas por anticorpos monoclonais preferidos da invenção. As

sequências de V_h CDR1, 2 e 3, e as sequências VL CDR1, 2 e 3, podem ser enxertadas em regiões estruturais que têm a sequência idêntica à encontrada no gene de imunoglobulina da linha germinativa da qual deriva a sequência estrutural, ou as sequências de CDR podem ser enxertadas em regiões estruturais que contêm uma ou mais mutações em comparação com as sequências da linha germinativa. Por exemplo, verificou-se que, em certos casos, é benéfico mutar resíduos dentro das regiões estruturais para manter ou melhorar a capacidade de ligação ao antígeno do anticorpo (veja-se, por exemplo, os documentos de patente US N.ºs 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 para Queen et al.).

Outro tipo de modificação da região variável é mutar resíduos de aminoácidos dentro das regiões V_H e/ou VL CDR1, CDR2 e/ou CDR3 para melhorar assim uma ou mais das propriedades de ligação (por exemplo, afinidade) do anticorpo de interesse. A mutagénese sítio-dirigida ou mutagénese mediada por PCR pode ser realizada para introduzir a(s) mutação(ões) e o efeito na ligação do anticorpo, ou outra propriedade funcional de interesse, pode ser avaliada através de ensaios *in vitro* ou *in vivo*, conforme descrito no presente documento e fornecido nos Exemplos. Preferivelmente, modificações conservativas (conforme discutido acima) são introduzidas. As mutações podem ser substituições, adições ou deleções de aminoácidos, mas são de preferência substituições. Além disso, normalmente não mais do que um, dois, três, quatro ou cinco resíduos de uma região CDR são alterados.

Consequentemente, noutra forma de realização, A invenção proporciona anticorpos anti-IP-10 monoclonais isolados, ou porções de ligação a antígeno dos mesmos, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que compreende: (a) uma região V_h CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo

consistindo nas SEQ ID NOs: 1-12, ou uma sequência de aminoácidos possuindo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos, em comparação com as SEQ ID NOs: 1-12; (b) uma região V_H CDR2 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 13-23, ou uma sequência de aminoácidos possuindo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos, em comparação com as SEQ ID NOs: 13-23; (c) uma região V_H CDR3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 24-34, ou uma sequência de aminoácidos possuindo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos, em comparação com as SEQ ID NOs: 24-34; (d) uma região V_L CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 51-61, ou uma sequência de aminoácidos possuindo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos, em comparação com as SEQ ID NOs: 51-61; (e) uma região V_L CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 62-72, ou uma sequência de aminoácidos possuindo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos, em comparação com as SEQ ID NOs: 62-72; e (f) uma região V_L CDR3 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 73-83, ou uma sequência de aminoácidos possuindo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos, em comparação com as SEQ ID NOs: 73-83.

Uma mutação de substituição preferida da invenção é a substituição de um resíduo de serina pelo resíduo de cisteína na posição 32, dentro da CDR1, da cadeia V_H do mAb 10A12. Esta forma modificada do 10A12 é referida no presente documento como 10A12S. A sequência de aminoácidos

da cadeia VH do 10A12 é mostrada na SEQ ID NO: 44 e a sequência de aminoácidos da cadeia VH de 10A12S é mostrada na SEQ ID NO: 45.

Os anticorpos manipulados da invenção incluem aqueles nos quais as modificações foram feitas para os resíduos estruturais dentro de V_H e/ou V_L , por exemplo, para melhorar as propriedades do anticorpo. Tipicamente, tais modificações estruturais são feitas para diminuir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, uma abordagem consiste em "retromutar" um ou mais resíduos estruturais para a sequência da linha germinativa correspondente. Mais especificamente, um anticorpo que sofreu mutação somática pode conter resíduos estruturais que diferem da sequência da linha germinativa a partir da qual o anticorpo é derivado. Estes resíduos podem ser identificados por comparação das sequências estruturais do anticorpo com as sequências da linha germinativa a partir das quais o anticorpo é derivado. Por exemplo, para 6A5, o resíduo de aminoácido #2 (dentro de FR1) de V_H é uma metionina enquanto este resíduo na sequência da linha germinativa V_H 3-33 correspondente é uma valina (veja-se a Figura 12). Para devolver as sequências da região estrutural para a sua configuração de linha germinativa, as mutações somáticas podem ser "retromutadas" para a sequência da linha germinativa através de, por exemplo, mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR (por exemplo, resíduo 2 da V_H de 6A5 pode ser "retromutado" de metionina para valina). Tais anticorpos "retromutados" também se destinam a ser abrangidos pela invenção.

Outro tipo de modificação estrutural envolve a mutação de um ou mais resíduos dentro da região estrutural, ou mesmo dentro de uma ou mais regiões CDR, para remover os epítomos de células T para deste modo reduzir a imunogenicidade potencial do anticorpo. Esta abordagem também é conhecida como "desimunização" e é descrita em

detalhe adicional na Publicação de Patente US N.º 20030153043 por Carr *et al.*

Adicionalmente ou em alternativa às modificações feitas dentro das regiões estruturais ou CDR, os anticorpos da invenção podem ser manipulados para incluir modificações dentro da região Fc, tipicamente, para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tais como a semi-vida sérica, fixação do complemento, ligação ao receptor Fc, e/ou citotoxicidade celular dependente de antigénio. Além disso, um anticorpo da invenção pode ser quimicamente modificado (por exemplo, uma ou mais frações químicas podem ser ligadas ao anticorpo) ou ser modificado para alterar a sua glicosilação, novamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada uma destas formas de realização é descrita em mais detalhe abaixo. A numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU de Kabat.

Numa forma de realização, a região de dobradiça de CH1 é modificada de tal modo que o número de resíduos de cisteína na região de dobradiça é alterado, por exemplo, aumentado ou diminuído. Esta abordagem é descrita adicionalmente no documento de Patente US N.º 5.677.425 por Bodmer *et al.* O número de resíduos de cisteína na região de dobradiça de CH1 é alterada para, por exemplo, facilitar a montagem das cadeias leves e pesadas ou para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo.

Noutra forma de realização, a região de dobradiça Fc de um anticorpo é mutada para reduzir a semi-vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de aminoácidos são introduzidas na região de interface do domínio CH2-CH3 do fragmento de dobradiça Fc de modo que o anticorpo tem ligação comprometida à proteína A estafilocócica (SpA) em relação à ligação a SpA do domínio de dobradiça-Fc nativo. Esta abordagem está descrita em mais detalhe no documento de Patente US N.º 6.165.745 por

Ward *et al.*

Noutra forma de realização, o anticorpo é modificado para aumentar a sua semi-vida biológica. Várias abordagens são possíveis. Por exemplo, uma ou mais das seguintes mutações podem ser introduzidas: T252L, T254S, T256F, conforme descrito no documento de Patente US N.º 6.277.375 para Ward. Alternativamente, para aumentar a semi-vida biológica, o anticorpo pode ser alterado dentro da região CH1 ou CL para conter um epítipo de ligação de recetor de salvamento tomado de duas ansas de um domínio CH2 de uma região Fc de uma IgG, tal como descrito nos documentos de Patente US N.ºs 5.869.046 e 6.121.022 por Presta *et al.*

Ainda noutras formas de realização, a região Fc é alterada por substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido por um resíduo de aminoácido diferente para alterar a(s) função(ões) efetora(s) do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados de entre os resíduos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322 podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente de modo que o anticorpo tenha uma afinidade alterada para um ligando efetor mas retenha a capacidade de ligação ao antigénio do anticorpo mãe. O ligando efetor para o qual se altera a afinidade pode ser, por exemplo, um recetor Fc ou o componente C1 do complemento. Esta abordagem é descrita em maior detalhe nos documentos de Patente US N.ºs 5.624.821 e 5.648.260, ambas por Winter *et al.*

Num outro exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados de entre os resíduos de aminoácido 329, 331 e 322 podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente de tal forma que o anticorpo tem ligação C1q alterada e/ou citotoxicidade dependente do complemento (CDC) reduzida ou abolida. Esta abordagem é descrita em mais detalhe no documento de Patente US N.º 6.194.551 por Idusogie *et al.*

Num outro exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos

dentro das posições de aminoácidos 231 e 239 são alteradas para alterar assim a capacidade do anticorpo para fixar o complemento. Esta abordagem é descrita adicionalmente na Publicação PCT WO 94/29351 por Bodmer *et al.*

Ainda noutro exemplo, a região Fc é modificada para aumentar a capacidade do anticorpo para mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou para aumentar a afinidade do anticorpo para um receptor Fcγ por modificação de um ou mais aminoácidos nas seguintes posições: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ou 439. Esta abordagem é descrita adicionalmente na Publicação PCT WO 00/42072 por Presta. Além disso, os sítios de ligação na IgG 1 humana para FcγR1, FcγRII, FcγRIII e FcRn foram mapeados e variantes com ligação melhorada foram descritas (veja-se Shields, R.L. *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Mutações específicas nas posições 256, 290, 298, 333, 334 e 339 demonstraram melhorar a ligação a FcγRIII. Além disso, os seguintes mutantes de combinação demonstraram melhorar a ligação a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A e S298A/E333A/K334A.

Ainda noutra forma de realização, a glicosilação de um anticorpo é modificada. Por exemplo, um anticorpo aglicosilado pode ser feito (isto é, o anticorpo carece de glicosilação). A glicosilação pode ser alterada para, por exemplo, aumentar a afinidade do anticorpo para o antigénio. Tais modificações de hidratos de carbono podem ser conseguidas através de, por exemplo, alteração de um ou mais sítios de glicosilação dentro da sequência do anticorpo. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser feitas, que resultam na eliminação de

um ou mais sítios variáveis de glicosilação de região estrutural para eliminar assim a glicosilação nesse sítio. Tal aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo para o antigénio. Tal abordagem está descrita em mais detalhe nos documentos de Patente US N.ºs 5.714.350 e 6.350.861 por Co *et al.*

Adicionalmente, ou em alternativa, pode ser feito um anticorpo, que tem um tipo de glicosilação alterado, tal como um anticorpo hipofucosilado tendo quantidades reduzidas de resíduos fucosilo ou um anticorpo tendo estruturas bissectoras GlcNAc aumentadas. Tais padrões de glicosilação alterados demonstraram aumentar a capacidade de ADCC dos anticorpos. Tais modificações de hidratos de carbono podem ser conseguidas através de, por exemplo, expressão do anticorpo numa célula hospedeira com maquinaria de glicosilação alterada. As células com maquinaria de glicosilação alterada foram descritas na técnica e podem ser utilizadas como células hospedeiras nas quais expressar anticorpos recombinantes da invenção, para desse modo produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Por exemplo, o documento EP 1.176.195 por Hanai *et al.* descreve uma linha celular com um gene FUT8 funcionalmente interrompido, que codifica uma fucosil transferase, de tal modo que os anticorpos expressos numa tal linha celular exibem hipofucosilação. A Publicação PCT WO 03/035835 por Presta descreve uma linha celular CHO variante, células Lec13, com capacidade reduzida para se ligar à fucose para hidratos de carbono ligados a Asn (297), resultando também na hipofucosilação de anticorpos expressos naquela célula hospedeira (veja-se também Shields, R.L. *et al* (2002) 277 J. Biol Chem. 277:26733-26740). A Publicação PCT WO 99/54342 por Umana *et al.* descreve linhas celulares manipuladas para expressar glicosilo transferases modificadoras de glicoproteínas (por exemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII)) de tal modo que

os anticorpos expressos em linhas celulares manipuladas exibem estruturas bissectoras GlcNAc aumentadas, o que resulta em atividade ADCC aumentada dos anticorpos (veja-se também Umana *et al* (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

Uma outra modificação dos anticorpos do presente documento que é contemplada pela invenção é a peguilação. Um anticorpo pode ser peguilado para, por exemplo, aumentar a semi-vida biológica (por exemplo, sérica) do anticorpo. Para peguilar um anticorpo, o anticorpo, ou fragmento do mesmo, tipicamente faz-se reagir com polietilenoglicol (PEG), tal como um éster ou aldeído reativos derivados de PEG, sob condições em que um ou mais grupos de PEG se ligam ao anticorpo ou fragmento do anticorpo. Preferivelmente, a peguilação é realizada através de uma reação de acilação ou uma reação de alquilação com uma molécula de PEG reativa (ou um polímero solúvel em água reativo análogo). Tal como utilizado no presente documento, o termo "polietilenoglicol" destina-se a englobar qualquer das formas de PEG que foram utilizadas para derivatizar outras proteínas, tais como mono (C1-C10) alcoxi ou ariloxi polietilenoglicol ou polietilenoglicol-maleimida. Em determinadas formas de realização, o anticorpo a ser peguilado é um anticorpo aglicosilado. Métodos para a peguilação de proteínas são conhecidos na técnica e podem ser aplicados aos anticorpos da presente invenção. Veja-se, por exemplo, os documentos EP 0 154 316 por Nishimura *et al.* e EP 0 401 384 por Ishikawa *et al.*

Métodos de Manipulação de Anticorpos

Como discutido acima, os anticorpos anti-IP-10 que têm sequências V_H e V_L divulgadas no presente documento podem ser utilizados para criar anticorpos anti-IP-10 novos, modificando as sequências V_H e/ou V_L , ou a(s) região(ões) constante(s) a elas ligadas. Assim, num outro aspeto da invenção, as características estruturais de um anticorpo anti-IP-10 da invenção, por exemplo, 1D4, 1E1, 2G1, 3C4,

6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S ou 13C4, são utilizadas para criar anticorpos anti-IP-10 estruturalmente relacionados que retêm pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, tais como ligação à IP-10 humana e IP-10 de macaco rhesus, mas não à IP-10 de ratinho ou MIG humano ou ITAC humano, e também inibir uma ou mais propriedades funcionais da IP-10 (por exemplo, a ligação a CXCR3, fluxo de cálcio, quimiotaxia). Por exemplo, uma ou mais regiões CDR de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S ou 13C4, ou mutações das mesmas, podem ser combinadas de forma recombinante com regiões estruturais conhecidas e/ou outras CDR para criar, anticorpos anti-IP-10 da invenção, adicionais e manipulados de forma recombinante, como discutido acima. Outros tipos de modificações incluem as descritas na secção anterior. O material de iniciação para o método de manipulação é uma ou mais das sequências V_H e/ou V_L fornecidas no presente documento, ou uma ou mais regiões CDR das mesmas. Para criar o anticorpo manipulado, não é realmente necessário preparar (ou seja, expressar como uma proteína) um anticorpo com uma ou mais das sequências V_H e/ou V_L fornecidas no presente documento, ou uma ou mais regiões CDR das mesmas. Em vez disso, a informação contida na(s) sequência(s) é utilizada como o material de iniciação para criar sequência(s) de "segunda geração" derivada(s) da(s) sequência(s) original(ais) e, em seguida, a(s) sequência(s) de "segunda geração" é(são) preparada(s) e expressa(s) como uma proteína.

Consequentemente, noutra forma de realização, a invenção proporciona um método para a preparação de um anticorpo anti-IP-10 que compreende:

- (a) proporcionar (i) uma sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência CDR1 selecionada a partir das SEQ ID NOs: 5, 9 e 1, uma sequência CDR2 selecionada a partir das

SEQ ID NOs: 7, 21 e 13 e uma sequência CDR3 selecionada a partir das SEQ ID NOs: 28, 32 e 24; ou (ii) uma sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência CDR1 selecionada a partir das SEQ ID NOs: 55, 59 e 51, uma sequência CDR2 selecionada a partir das SEQ ID NOs: 66, 70 e 62 e uma sequência CDR3 selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 77, 81 e 73;

(b) alterar pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada e/ou da sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve para criar, pelo menos, uma sequência de anticorpo alterada; e

(c) expressar a sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

Técnicas de biologia molecular padrão podem ser utilizadas para preparar e expressar a sequência de anticorpo alterada.

De preferência, o anticorpo codificado pela(s) sequência(s) de anticorpo alteradas é um anticorpo que retém uma, algumas ou todas as propriedades funcionais dos anticorpos anti IP-10 descritos no presente documento, cujas propriedades funcionais incluem, mas não estão limitadas a:

- (i) liga-se especificamente à IP-10 humana;
- (ii) inibe a ligação da IP-10 a CXCR3;
- (iii) inibe o fluxo de cálcio induzido por IP-10;
- (iv) inibe a migração celular induzida por IP-10;
- (v) reage de forma cruzada com a IP-10 de macaco rhesus;
- (vi) não reage de forma cruzada com a IP-10 de ratinho;
- (vii) não reage de forma cruzada com MIG humana; e
- (viii) não reage de forma cruzada com ITAC humano.

O anticorpo alterado pode apresentar uma ou mais, duas

ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais ou sete ou mais das propriedades funcionais estabelecidas como (i) a (viii) acima.

As propriedades funcionais dos anticorpos alterados podem ser avaliadas utilizando ensaios padrão disponíveis na técnica e/ou descritos no presente documento, tais como os apresentados nos exemplos (por exemplo, ensaios ELISA, ensaios de fluxo de cálcio; ensaios de quimiotaxia).

Em certas formas de realização dos métodos de manipulação de anticorpos da invenção, podem ser introduzidas mutações ao acaso ou seletivamente ao longo de toda ou parte de uma sequência de codificação de um anticorpo anti-IP-10 e os anticorpos anti-IP-10 resultantes modificados podem ser rastreados para a atividade de ligação e/ou outras propriedades funcionais conforme descrito no presente documento. Métodos de mutação foram descritos na técnica. Por exemplo, a Publicação PCT WO 02/092780 por Short descreve métodos para a criação e rastreio de mutações de anticorpos usando mutagenese de saturação, montagem de ligação sintética, ou uma combinação das mesmas. Alternativamente, a Publicação PCT WO 03/074679 por Lazar *et al.* descreve métodos de utilização de métodos de rastreio computacionais para otimizar as propriedades físico-químicas dos anticorpos.

Moléculas de Ácido Nucleico Que Codificam os Anticorpos da Invenção

Um outro aspecto da invenção diz respeito às moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos da invenção. Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células integrais, num lisado de célula ou numa forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é "isolado" ou "tornado substancialmente puro" quando é purificado longe de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos ou proteínas celulares, pelas técnicas padrão, incluindo o

tratamento alcalino/SDS, formação de faixa de CsCl, cromatografia de coluna, electroforese em gel de agarose e outros bem conhecidos na técnica. Veja-se, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nova Iorque. Um ácido nucleico da invenção pode ser, por exemplo, ADN ou ARN e pode conter ou não sequências intrónicas. Numa forma de realização preferida, o ácido nucleico é uma molécula de ADNc.

Os ácidos nucleicos da invenção podem ser obtidos pela utilização de técnicas de biologia molecular padrão. Para os anticorpos expressados pelos hibridomas (por exemplo, hibridomas preparados a partir de ratinhos transgénicos que carregam genes da imunoglobulina humana como é descrito mais abaixo), os ADNC que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo fabricado pelo hibridoma podem ser obtidos por meio de amplificação de PCR padrão ou técnicas de clonagem de ADNc. Para os anticorpos obtidos a partir de uma biblioteca de gene da imunoglobulina (por exemplo, utilizando técnicas de apresentação de fago), o ácido nucleico que codifica o anticorpo pode ser recuperado da biblioteca.

Moléculas de ácidos nucleicos preferidas da invenção são aquelas que codificam as sequências V_H e V_L dos anticorpos monoclonais 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 ou 13C4. As sequências de ADN que codificam as sequências V_H de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4 são mostradas nas SEQ ID NOs: 99 a 109, respectivamente. As sequências de ADN que codificam as sequências V_L de 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4 são mostradas nas SEQ ID NOs: 110 a 120, respectivamente.

Uma vez que os fragmentos de ADN que codificam os segmentos V_H e V_L são obtidos, estes fragmentos de ADN podem ser ainda manipulados pelas técnicas de ADN

recombinante padrão, por exemplo para converter os genes da região variável nos genes da cadeia de anticorpo de comprimento total, aos genes de fragmento Fab ou a um gene scFv. Nestas manipulações, um fragmento de ADN que codifica V_L ou V_H é operativamente ligado a um outro fragmento de ADN que codifica uma outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligador flexível. O termo "operativamente ligado", como é utilizado neste contexto, é intencionado a significar que os dois fragmentos de ADN são unidos tal que as sequências de aminoácido codificadas pelos dois fragmentos de ADN permaneçam na matriz.

O ADN isolado que codifica a região V_H pode ser convertido a um gene da cadeia pesada de comprimento total ligando-se operativamente o ADN que codifica V_H a uma outra molécula de ADN que codifique as regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As sequências dos genes da região constante de cadeia pesada humanas são conhecidas na técnica (veja-se, por exemplo, Kabat, E. A., et al., (1991) Sequences of Proteins of immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242) e fragmentos de ADN que abrangem estas regiões podem ser obtidos pela amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD, mas mais preferivelmente é uma região constante IgG1 ou IgG4. Para um gene da cadeia pesada de fragmento Fab, o ADN que codifica V_H pode ser operativamente ligado a uma outra molécula de ADN que codifica apenas a região constante da cadeia pesada CH1.

O ADN isolado que codifica a região V_L pode ser convertido a um gene da cadeia leve de comprimento total (assim como um Gene da cadeia leve de Fab) ligando-se operativamente o ADN que codifica V_L a uma outra molécula de ADN que codifica a região constante de cadeia leve, CL. As sequências dos genes da região constante de cadeia leve

humanos são conhecidas na técnica (veja-se, por exemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242) e fragmentos de ADN que abrangem estas regiões podem ser obtidos pela amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante capa ou lambda, mas o mais preferivelmente é uma região constante capa.

Para criar um gene scFv, os fragmentos de ADN que codificam V_H e V_L são operativamente ligados a um outro fragmento que codifica um ligador flexível, por exemplo, que codifica a sequência de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, tal que as sequências V_H e V_L possam ser expressadas como uma proteína de cadeia única contígua, com as regiões V_L e V_H unidas pelo ligador flexível (veja-se, por exemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

Produção de Anticorpos Monoclonais da Invenção

Os anticorpos monoclonais (mAbs) da presente invenção podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo a metodologia de anticorpo monoclonal convencional por exemplo, a técnica de hibridação de célula somática padrão de Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256:495. Embora os procedimentos de hibridação de célula somática padrão sejam preferidos, em princípio, outras técnicas para produzir anticorpo monoclonal podem ser utilizadas por exemplo, a transformação viral ou oncogénica de linfócitos B.

O sistema animal preferido para preparar hibridomas é o sistema de murino. A produção de hibridoma no ratinho é um procedimento muito bem estabelecido. Os protocolos de imunização e as técnicas para o isolamento de esplenócitos imunizados para a fusão são conhecidos na técnica.

Parceiros de fusão (por exemplo, células de mieloma de murino) e procedimentos de fusão também são conhecidos.

Os anticorpos quiméricos ou humanizados da presente invenção podem ser preparados com base na sequência de um anticorpo monoclonal de murino preparado como descrito acima. O ADN que codifica as imunoglobulinas de cadeia pesada e leve pode ser obtido a partir do hibridoma de murino de interesse e engenheirado para conter sequências de imunoglobulina que não de murino (por exemplo, humanas) utilizando técnicas da biologia molecular padrão. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, as regiões variáveis de murino podem ser ligadas às regiões constantes humanas utilizando métodos conhecidos na técnica (veja-se, por exemplo, a Patente U.S. nº 4.816.567 concedida a Cabilly *et al.*). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões de CDR de murino podem ser inseridas numa estrutura humana utilizando métodos conhecidos na técnica (veja-se, por exemplo, a Patente U.S. nº 5.225.539 concedida a Winter e Patentes U.S. 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 e 6.180.370 concedidas a Queen *et al.*).

Numa forma de realização preferida, os anticorpos da invenção são anticorpos humanos monoclonais. Tais anticorpos humanos monoclonais direccionados contra a IP-10 podem ser gerados utilizando ratinhos transgénicos ou transcromossómicos que carregam partes do sistema imune humano ao invés do sistema de ratinho. Estes ratinhos transgénicos e transcromossómicos incluem os ratinhos aqui aludidos como ratinhos HuMAb e ratinhos KM ratinhos, respectivamente e são coletivamente aqui aludidos como "ratinhos Ig humanos."

O ratinho HuMAb® (Medarex, Inc.) contém minilocais de gene da imunoglobulina humano que codificam sequências de imunoglobulina da cadeia pesada (μ e γ) e cadeia leve κ humanas desarranjadas, juntamente com mutações seleccionadas como alvo que inactivam os locais de cadeia μ

e κ endógeno (veja-se, por exemplo, Lonberg, *et al.*, (1994) *Nature* 368 (6474):856-859). Consequentemente, os ratinhos exibem expressão reduzida de IgM ou κ de ratinho e em resposta à imunização, os transgenes de cadeia pesada e leve humanos introduzidos sofrem a comutação de classe e a mutação somática para gerar IgG κ monoclonal humano de alta afinidade (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; revisada em Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). A preparação e utilização de ratinhos HuMab e as modificações genômicas portadas por tais ratinhos, são ainda descritos em Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287- 6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5:647-656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720- 3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.*, (1993) *EMBO J.* 12:821-830; Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.*, (1994) *International Immunology* 6:579-591; e Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851, os conteúdos de todas as quais são aqui especificamente incorporados por referência em sua totalidade. Veja-se ainda, as Patentes U.S. 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.789.650, 5.877.397, 5.661.016, 5.814.318, 5.874.299 e 5.770.429; todas concedidas a Lonberg e Kay; Patente U.S. nº 5.545,807 concedida a Surani *et al.*; Publicações PCT N- WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 e WO 99/45962, todas concedidas a Lonberg e Kay; e Publicação PCT N° WO 01/14424 concedida a Korman *et al.*

Numa outra forma de realização, os anticorpos humanos da invenção podem ser incitados utilizando um ratinho que carregue as sequências da imunoglobulina humana nos transgenes e transcromossomas, tal como um ratinho que carregue um transgene da cadeia pesada humana e um

transcromossoma da cadeia leve humana. Tais ratinhos, aqui aludidos como "ratinhos KM", estão descritos em detalhes na Publicação PCT WO 02/43478 concedida a Ishida *et al.*

Além disso ainda, sistemas de animal transgênico alternativos que expressam genes da imunoglobulina humana são disponíveis na técnica e podem ser utilizados para incitar os anticorpos anti-IP-10 da invenção. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo aludido como o Xenomouse (Abgenix, Inc.) pode ser utilizado; tais ratinhos são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 e 6.162.963 concedidas a Kucherlapati *et al.*

Além disso, sistemas de animal transcromossômicos alternativos que expressam os genes da imunoglobulina humana são disponíveis na técnica e podem ser utilizados para incitar anticorpos anti-IP-10 da invenção. Por exemplo, ratinhos que carregam tanto um transcromossoma da cadeia pesada humana quanto um transcromossoma da cadeia leve humana, aludido como "ratinhos TC" podem ser utilizados; tais ratinhos são descritos em Tomizuka *et al.*, (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Além disso, vacas que carregam transcromossomas das cadeias pesada e leve humanas foram descritos na técnica (Kuroiwa *et al.*, (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) e podem ser utilizados para incitar anticorpos anti-IP-10 da invenção.

Anticorpos monoclonais humanos da invenção também podem ser preparados utilizando métodos de demonstração de fago para rastrear bibliotecas de genes da imunoglobulina humana. Tais métodos que demonstram fago para isolar anticorpos humanos são estabelecidos na técnica. Veja-se, por exemplo: as Patentes U.S. 5.223.409, 5.403.484 e 5.571.698 concedidas a Ladner *et al.*, as Patentes U.S. 5.427.908 e 5.580.717 concedidas a Dower *et al.*, as Patentes U.S. 5.969.108 e 6.172.197 concedidas a McCafferty *et al.*, e Patentes U.S. 5.885.793, 6.521.404, 6.544.731,

6.555.313, 6.582.915 e 6.593.081 concedidas a Griffiths *et al.*

Os anticorpos monoclonais humanos da invenção também podem ser preparados utilizando ratinhos SCID em que células imunes humanas foram reconstituídas tal que uma resposta de anticorpo humano pudesse ser gerada após imunização. Tais ratinhos são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. 5.476.996 e 5.698.767 concedida a Wilson *et al.*

Imunização de Ratinhos Ig Humano

Quando ratinhos Ig humanos são utilizados para incitar anticorpos humanos da invenção, tais ratinhos podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno de IP-10 e/ou IP-10 recombinante ou uma proteína de fusão de IP-10, como é descrito por Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474):856-859; Fishwild, D. *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; e Publicações PCT WO 98/24884 e WO 01/14424. Preferivelmente, os ratinhos terão de 6 a 16 semanas de idade na primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou recombinante (5 a 50 µg) de antígeno de IP-10 pode ser usada para imunizar os ratinhos Ig humanos intraperitonealmente.

Os procedimentos detalhados para gerar anticorpos humanos completamente monoclonais à IP-10 são descritos no Exemplo 1 abaixo. A experiência acumulativa com vários antígenos tem mostrado que os ratinhos transgênicos respondem quando são inicialmente imunizados intraperitonealmente (IP) com antígeno em adjuvante de Freund completo, seguido pelas imunizações IP a cada semana (até um total de 6) com antígeno em adjuvante de Freund incompleto. Entretanto, adjuvantes outros que não de Freund também são verificados serem eficazes. Além disso, células integrais na ausência de adjuvante são verificadas serem altamente imunogênicas. A resposta imune pode ser monitorizada no curso do protocolo de imunização com

amostras de plasma sendo obtidas pelas sangrias retroorbitais. O plasma pode ser rastreado por meio de ELISA (como descrito de seguida) e os ratinhos com titulações suficientes de imunoglobulina anti-IP-10 humana podem ser utilizados para fusões. Os ratinhos podem ser reforçados intravenosamente com antígeno 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço. É esperado que 2 a 3 fusões para cada imunização possam necessitar ser realizadas. Entre 6 e 24 ratinhos são tipicamente imunizados para cada antígeno. Usualmente tanto a estirpe HCo7 quanto a HCol2 são utilizadas. Além disso, tanto o transgene HCo7 quanto o HCol2 podem ser cruzados juntamente num único ratinho que tem dois transgenes da cadeia pesada humana diferentes (HCo7/HCol2).

Geração de Hibridomas Que Produzem Anticorpos Monoclonais Humanos da Invenção

Para gerar hibridomas que produzem anticorpos humanos monoclonais da invenção, esplenócitos e/ou células de linfonodos de ratinhos imunizados podem ser isolados e fundidos a uma linha de célula imortalizada apropriada, tal como um linha de célula de mieloma de ratinho. Os hibridomas resultantes podem ser rastreados quanto a produção de anticorpos específicos de antígeno. Por exemplo, suspensões de célula única de linfócitos esplênicos de ratinhos imunizados podem ser fundidas a um sexto do número de células de mieloma de ratinho não segregoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580), com 50 % de PEG. As células são inoculadas em placas em aproximadamente 2×10^5 em placas microtituladoras de fundo chato, seguido por uma incubação de duas semanas em meio selectivo contendo 20 % de Soro de Clone Fetal, 18 % de meio condicionado "653", 5 % de origen (IGEN), 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina e IX HAT (Sigma; o HAT é adicionado 24

horas depois da fusão). Depois de aproximadamente duas semanas, células podem ser cultivadas em meio em que o HAT é substituído com HT. Os poços individuais podem ser depois rastreados por meio de ELISA para anticorpos IgM e IgG monoclonais humanos. Uma vez o crescimento de hibridoma extensivo ocorre, o meio pode ser observado usualmente depois de 10 a 14 dias. O anticorpo que segrega hibridomas pode ser reinoculado em placa, rastreado mais uma vez e se ainda positivo para IgG humano, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes pela diluição limitante. Os subclones estáveis podem ser depois cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização.

Para purificar anticorpos humanos monoclonais, hibridomas seleccionados podem ser cultivados em frascos giratórios de dois litros para a purificação de anticorpo monoclonal. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N. J.). A IgG diluída pode ser verificada pela electroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para garantir a pureza. A solução tampão pode ser trocada em PBS e a concentração pode ser determinada pela DO_{280} utilizando coeficiente de extinção 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser divididos em alíquotas e armazenados a -80°C .

Geração de Transfectomas Que Produzem Anticorpos Monoclonais da Invenção

Os anticorpos da invenção também podem ser produzidos num transfectoma de célula hospedeira utilizando, por exemplo, uma combinação de técnicas de ADN recombinante e métodos de transfecção de gene como é bem conhecido na técnica (por exemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por exemplo, para expressar os anticorpos ou fragmentos de anticorpo destes, os ADN que codificam

cadeias leves e pesadas parciais ou de comprimento total, podem ser obtidos pelas técnicas da biologia molecular padrão (por exemplo, amplificação por PCR ou clonagem de ADNc utilizando um hibridoma que expresse o anticorpo de interesse) e os ADN podem ser inseridos em vectores de expressão tal que os genes sejam operativamente ligados às sequências de controlo transcricional e traducional. Neste contexto, o termo "operativamente ligado" é intencionado a significar que um gene de anticorpo é ligado num vector tal que as sequências de controlo transcricional e traducional dentro do vector servem à sua função intencionada de regular a transcrição e tradução do gene de anticorpo. O vector de expressão e as sequências de controlo de expressão são escolhidos para serem compatíveis com a expressão da célula hospedeira usada. O gene de cadeia leve de anticorpo e o gene da cadeia pesada de anticorpo podem ser inseridos em vectores separados ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vector de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vector de expressão pelos métodos padrão (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares no fragmento de gene e vector de anticorpo ou ligação de terminação abrupta se nenhum local de restrição estiver presente). A região variável de cadeia leve e pesada dos anticorpos aqui descritos podem ser utilizados para criar genes de anticorpo de comprimento total de qualquer isotipo de anticorpo pela inserção dos mesmos em vectores de expressão que já codificam as regiões constante de cadeia pesada e constante de cadeia leve do isotipo desejado tal que o segmento V_H seja operativamente ligado ao(s) segmento(s) C_H dentro do vector e o segmento V_L é operativamente ligado ao segmento C_L dentro do vector. Adicional ou como alternativa, o vector de expressão recombinante pode codificar um péptido de sinal que facilita a secreção da cadeia de anticorpo a partir de uma célula hospedeira. O gene da cadeia de anticorpo pode ser

clonado no vector tal que o péptido de sinal seja ligado na matriz ao término amino do gene da cadeia de anticorpo. O péptido de sinal pode ser um péptido de sinal de imunoglobulina ou um péptido de sinal heterólogo (isto é, um péptido de sinal de uma proteína que não de imunoglobulina).

Além dos genes da cadeia de anticorpo, os vectores de expressão recombinantes da invenção carregam sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo numa célula hospedeira. O termo "sequência reguladora" é intencionado a incluir promotores, realçadores e outros elementos de controlo de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou tradução dos genes da cadeia de anticorpo. Tais sequências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Será avaliado por aqueles peritos na especialidade que o planeamento do vector de expressão, incluindo a Selecção de sequências reguladoras, pode depender de factores tais como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada, etc. As sequências reguladoras preferidas para a expressão de célula hospedeira de mamífero incluem elementos virais que direccionem altos níveis de expressão de proteína em células de mamífero, tais como promotores e/ou realçadores derivados de citomegalovírus (CMV), Vírus Símio 40 (SV40); adenovírus, (por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP) e políoma. Como alternativa, as sequências reguladoras não virais podem ser utilizadas, tal como o promotor de ubiquitina ou promotor de β -globina. Além disso ainda, elementos reguladores compostos de sequências de fontes diferentes, tais como o sistema promotor SR α , que contém sequências do promotor precoce de SV40 e a repetição de terminal longo do vírus da leucemia

de célula T humana tipo 1 (Takebe, Y. *et al*, (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Além dos genes da cadeia de anticorpo e sequências reguladoras, os vectores de expressão recombinantes da invenção podem carregar sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vector em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores seleccionáveis. O gene marcador seleccionável facilita a Selecção de células hospedeiras em que o vector foi introduzido (veja-se, por exemplo, Patente U.S. nº 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todas concedidas a Axel *et al*). Por exemplo, tipicamente o gene marcador seleccionável confere resistência aos medicamentos, tal como G418, higromicina ou metotrexato, numa célula hospedeira em que o vector foi introduzido. Os genes marcadores seleccionáveis preferidos incluem o gene da diidrofoliato reductase (DHFR) (para a utilização em células hospedeiras dhfr com Selecção/amplificação de metotrexato) e o gene neo (para a Selecção de G418).

Para a expressão das cadeias leves e pesadas, o(s) vector(es) de expressão que codificam as cadeias pesadas e leves é/são transfectado(s) numa célula hospedeira pelas técnicas padrão. As várias formas do termo "transfecção" são intencionadas a abranger uma ampla variedade de técnicas habitualmente utilizadas para a introdução de ADN exógenos numa célula hospedeira procariótica ou eucariótica, por exemplo, electroporação, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção com dextrano DEAE e outros. Embora seja teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, a expressão de anticorpos em células eucarióticas e o mais preferivelmente células hospedeiras de mamífero, é a mais preferida porque tais células eucarióticas e em particular células de mamífero, são mais prováveis do que células procarióticas para montar e

segregar um anticorpo apropriadamente dobrada e imunologicamente activo. Relatou-se que a expressão procariótica de genes de anticorpo é ineficaz para a produção de rendimentos altos de anticorpo activo (Boss, M. A. e Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

As células hospedeiras de mamífero preferidas para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo células dhfr-CHO, descritas em Urlaub e Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:416-4220, utilizado com um marcador seleccionável DHFR, por exemplo, como descrito em R. J. Kaufman e P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS e células SP2. Em particular, para a utilização com células de mieloma NSO, um outro sistema de expressão preferido é o sistema de expressão de gene GS divulgado nos documentos WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338.841. Quando vectores de expressão recombinantes que codificam genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos cultivando-se as células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, a secreção do anticorpo no meio de cultura em que as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura utilizando métodos de purificação de proteína padrão.

Caracterização de Ligação de Anticorpo ao Antigénio

Os anticorpos da invenção podem ser testados quanto a ligação à IP-10, por exemplo, por meio de ELISA padrão. Em resumo, as placas de microtitulação são revestidas com IP-10 purificada a 0,25 µg/ml m PBS e depois bloqueadas com 5 % de albumina sérica bovina em PBS. As diluições de anticorpo (por exemplo, diluições de plasma de ratinhos imunizados com IP-10) são adicionadas a cada poço e incubadas durante 1 a 2 horas a 37° C. As placas são

lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com reagente secundário (por exemplo, para anticorpos humanos, um reagente policlonal específico de Fc de IgG anti-humano de cabra) conjugado à fosfatase alcalina por 1 hora a 37° C. Depois de lavar, as placas são desenvolvidas com substrato de pNPP (1 mg/ml) e analisadas na DO de 405- 650. Preferivelmente, ratinhos que desenvolvem os títulos mais altos serão utilizados para fusões.

Um ensaio de ELISA como descrito acima também pode ser utilizado para rastrear quanto a hibridomas que mostram reactividade positiva com um imunógeno de IP-10. Hibridomas que se ligam com alta avidéz à IP-10 são subclonados e mais caracterizados. Um clone de cada hibridoma, que retém a reactividade das células precursoras (por meio de ELISA), pode ser escolhido para fabricar um banco de célula de 5 a 10 frascos armazenados a - 140° C e para a purificação de anticorpo.

Para purificar anticorpos anti-IP-10, hibridomas seleccionados podem ser cultivados em frascos giratórios de dois litros para a purificação de anticorpo monoclonal. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, NJ). A IgG eluída pode ser verificada pela electroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para garantir a pureza. Da solução tampão pode ser trocada em PBS e a concentração pode ser determinada pela OD₂₈₀ utilizando coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser divididos em alíquotas e armazenado a -80° C.

Para determinar se os anticorpos monoclonais anti-IP-10 seleccionados se ligam a epítomos únicos, cada anticorpo pode ser biotinilado utilizando reagentes comercialmente disponíveis (Pierce, Rockford, IL). Estudos de competição utilizando anticorpos monoclonais rotulados e anticorpos monoclonais biotinilados podem ser realizados utilizando

placas de ELISA revestidos com IP-10 como descrito acima. A ligação de mAb biotinilado pode ser detectada com uma sonda de estreptavidina-fosfatase alcalina.

Para determinar o isotipo de anticorpos purificados, ELISAs de isotipo podem ser realizados utilizando reagentes específicos para anticorpos de um isotipo particular. Por exemplo, para determinar o isotipo de um anticorpo monoclonal humano, os poços de placas de microtitulação podem ser revestidos com 1 pg/ml de imunoglobulina anti-humano durante a noite a 4 °C. Depois de bloquear com 1 % de BSA, as placas são reagidas com 1 jig/ml ou menos de anticorpos monoclonais de teste ou controles de isotipo purificados, na temperatura ambiente por uma a duas horas. Os poços podem ser depois reagidos com sondas conjugadas com fosfatase alcalina específica de IgG1 humano ou IgM humano. As placas são desenvolvidas e analisadas como foi descrito acima.

IgGs anti-IP-10 humanas podem ser ainda testadas quanto a reactividade com o antigénio de IP-10 pela Western blotting. Em resumo, a IP- 10 pode ser preparada e submetida à electroforese em gel de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida. Depois da electroforese, os antigénios separados são transferidos para membranas de nitrocelulose, bloqueados com 10 % de soro de bezerro fetal e sondados com os anticorpos monoclonais a serem testados. A ligação de IgG humana pode ser detectada utilizando a fosfatase alcalina de IgG anti-humana e desenvolvida com tabletes de substrato de BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Imunoconjugados

Num outro aspecto, a presente invenção caracteriza um anticorpo anti-IP-10 ou um fragmento deste, conjugado a uma porção terapêutico, tal como uma citotoxina, um medicamento (por exemplo, um imunossupressor) ou uma radiotoxina. Tais conjugados são aqui aludidos como "imunoconjugados". Os

imunoconjugados que incluem uma ou mais citotoxinas são aludidas como "imunotoxinas". Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que seja nocivo (por exemplo, mata) às células. Os exemplos incluem taxol, citochalasin B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, daunorrubicina, diidróxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina e análogos ou homólogos destes. Os agentes terapêuticos também incluem, por exemplo, antimetabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil descabazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tioepa clorambucila, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por exemplo, daunorrubicina (antigamente daunomicina) e antibióticos (por exemplo, dactinomicina (antigamente, actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes anti-mitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina).

Outros exemplos preferidos de citotoxinas terapêuticas que podem ser conjugados a um anticorpo da invenção incluem caliqueamicinas, maitansinas e auristatinas e derivados destes. Um exemplo de um anticorpo de caliqueamicina conjugado é comercialmente disponível; (Mylotarg®; Wyeth-Ayerst).

As citoxinas podem ser conjugadas aos anticorpos da invenção utilizando a tecnologia de ligador disponível na técnica. Os exemplos de tipos ligantes que foram utilizados para conjugar uma citotoxina a um anticorpo incluem, mas não são limitadas a, ligantes que contêm hidrazonas, tioéteres, ésteres, dissulfureto e péptido. Um ligador pode

ser escolhido que é, por exemplo, suscetível para clivagem pelo pH baixo dentro do compartimento lisossômico ou suscetível à clivagem pelas proteases, tais como proteases preferencialmente expressadas em tecido de tumor tal como catepsinas (por exemplo, catepsinas B, C, D).

Para outro debate de tipos de citotoxinas, ligantes e métodos para conjugar agentes terapêuticos aos anticorpos, veja-se também Saito, G. *et al.*, (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P. A. *et al.*, (2003) *Câncer Immunol Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Câncer Cell* 3:207-212; Allen, T. M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. e Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P. D. e Springer, C. J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Os anticorpos da presente invenção também podem ser conjugados a um isótopo radioativo para gerar produtos radiofarmacêuticos citotóxicos, também aludidos como radioimunoconjugados. Os exemplos de isótopos radioativos que podem ser conjugados aos anticorpos para a utilização em diagnóstico ou de modo terapêutico incluem, mas não são limitados a, iodo¹³¹, índio¹¹¹, ítrio⁹⁰ e lutécio¹⁷⁷. O método para preparar radioimunoconjugados é estabelecido na técnica. Os exemplos de radioimunoconjugados são comercialmente disponíveis, incluindo Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) e Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals) e métodos similares podem ser utilizados para preparar radioimunoconjugados utilizando os anticorpos da invenção.

Os conjugados de anticorpo da invenção podem ser utilizados para modificar uma dada resposta biológica e a porção de medicamento não deve ser interpretada como limitada aos agentes terapêuticos da química clássica. Por exemplo, a porção de medicamento pode ser uma proteína ou polipéptido que possuam uma actividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa ou fragmento activo deste, tal como

abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas ou toxina da difteria; uma proteína tal como factor de necrose de tumor ou interferão- γ ; ou, modificadores de resposta biológica tal como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colônia de macrófago granulocítico ("GM-CSF"), factor estimulador de colônia granulocítica ("G-CSF") ou outros factores de crescimento.

As técnicas para conjugar tal porção terapêutica aos anticorpos são bem conhecidas, veja-se, por exemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonals Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em *Monoclonais Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.*, (eds.), pp. 243- 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", em *Controlled Drug Delivery* (2^a Ed.), Robinson *et al.*, (eds.), pp. 623-53 (Mareei Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Câncer Therapy: A Review", em *Monoclonais Antibodies '84:Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Câncer Therapy", em *Monoclonals Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.*, (eds.), PP- 303-16 (Academic Press 1985) e Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Moléculas Biespecíficas

Num outro aspecto, a presente invenção caracteriza moléculas biespecíficas que compreendem um anticorpo anti-IP-10 ou um fragmento deste, da invenção. Um anticorpo da invenção ou porções de ligação de antigénio destes, podem ser derivatizada ou ligada a uma outra molécula funcional, por exemplo, um outro péptido ou proteína (por exemplo, um outro anticorpo ou ligando para um receptor) para gerar uma molécula biespecífica que se liga a pelo menos dois sítios

de ligação diferentes ou moléculas alvo. O anticorpo da invenção pode de fato ser derivatizado ou ligado a mais do que uma outra molécula funcional para gerar moléculas multiespecíficas que se ligam a mais do que dois sítios de ligação e/ou moléculas alvo diferentes; tais moléculas multiespecíficas também são intencionadas a serem abrangidas pelo termo "molécula biespecífica" como é utilizado no presente documento. Para criar uma molécula biespecífica da invenção, um anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, pela ligação química, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras moléculas de ligação, tais como um outro anticorpo, fragmento de anticorpo, péptido ou ligação mimética, tal que uma molécula biespecífica resulte.

Consequentemente, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas que compreendem pelo menos uma primeira especificidade de ligação para IP-10 e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítopo alvo. Numa forma de realização particular da invenção, o segundo epítopo alvo é um receptor Fc, por exemplo, Fc γ RI humano (CD64) ou um receptor Fc α humano (CD89). Portanto, a invenção inclui moléculas biespecíficas capazes de ligação tanto às células efectoras que expressam Fc γ R, Fc α R ou Fc ϵ R (por exemplo, monócitos, macrófagos ou células polimorfonucleares (PMNs)) quanto às células alvo que expressam IP-10. Estas moléculas biespecíficas têm como alvo as células que expressam IP-10 à célula efectora e deflagram as actividades de célula efectora mediadas pelo receptor de Fc, tal como a fagocitose de uma célula que expressa IP-10, citotoxicidade mediada pela célula dependente de anticorpo (ADCC), libertação de citocina ou geração de anião superóxido.

Numa forma de realização da invenção em que a molécula biespecífica é multiespecífica, a molécula pode incluir ainda uma terceira especificidade de ligação, além de uma

especificidade de ligação anti-Fc e uma especificidade de ligação anti-IP-10. Numa forma de realização, a terceira especificidade de ligação é uma porção do factor anti-realce (EF), por exemplo, uma molécula que se liga a uma proteína de superfície envolvida na actividade citotóxica e deste modo aumenta a resposta imune contra a célula alvo. A "porção do factor anti-realce" pode ser um anticorpo, fragmento de anticorpo funcional ou um ligando que se liga a uma dada molécula, por exemplo, Um antigénio ou um receptor e resulta deste modo num realce do efeito dos determinantes de ligação para o receptor de Fc ou antigénio de célula alvo. A "porção do factor anti-realce" pode ligar-se um receptor de Fp ou um antigénio de célula alvo. Como alternativa, a porção do factor anti-realce pode ligar-se a uma entidade que seja diferente da entidade à qual a primeira e segunda especificidades de ligação se ligam. Por exemplo, a porção do factor anti-realce pode ligar-se a uma célula T citotóxica T (por exemplo, por intermédio de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 ou outra célula imune que resulte numa resposta imune aumentada contra a célula alvo).

Numa forma de realização, as moléculas biespecíficas da invenção compreendem como uma especificidade de ligação pelo menos um anticorpo ou um fragmento de anticorpo deste, incluindo, por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')₂, Fv ou um Fv de cadeia única. O anticorpo também pode ser um dímero de cadeia leve ou cadeia pesada ou qualquer fragmento mínimo deste tal como um Fv ou uma construção de cadeia única como descrito em Ladner *et al.* Patente U.S. nº 4.946.778.

Numa forma de realização, a especificidade de ligação para um receptor Fc γ é fornecida por um anticorpo monoclonal, a ligação do qual não é bloqueada pela imunoglobulina G humana (IgG). Como é utilizado no presente documento, o termo "receptor de IgG" refere-se a qualquer um dos oito genes da cadeia γ localizados no cromossoma 1.

Estes genes codificam um total de doze isoformas de receptor de transmembrana ou solúveis que são agrupadas em três classes de receptor Fc γ :Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD 16). Numa forma de realização preferida, o receptor Fcy, um FcyRI de alta afinidade humano. O Fc γ RI humano é uma molécula de 72 kDa, que mostra afinidade alta para IgG monomérica (10^8 a 10^9 M⁻¹).

A produção e a caracterização de certos anticorpos monoclonais anti-Fc γ preferidos são descritas por Fanger et al., na Publicação PCT WO 88/00052 e na Patente U.S. n° 4.954.617, os ensinamentos das quais são totalmente incorporados como referência no presente documento. Estes anticorpos se ligam a um epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII ou Fc γ RIII num local que é distinto do local de ligação Fc γ do receptor e, assim, a sua ligação não é bloqueada substancialmente pelos níveis fisiológicos de IgG. Os anticorpos anti-Fc γ RI específicos úteis nesta invenção são mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 e mAb 197. O hibridoma que produz mAb 32 é disponível da American Type Culture Collection, Acesso ATCC N° HB9469. Em outras formas de realização, o anticorpo receptor anti-Fcy é uma forma humanizada de anticorpo monoclonal 22 (H22). A produção e a caracterização do anticorpo H22 são descritas em Graziano, R. F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10):4996- 5002 e Publicação PCT WO 94/10332. O anticorpo H22 que produz a linha de célula foi depositado na American Type Culture Collection sob a designação HA022CL1 e tem o acesso n° CRL 11177.

Ainda em outras formas de realização preferidas, a especificidade de ligação para um receptor de Fc é fornecido por um anticorpo que se liga a um receptor IgA humano, por exemplo, um receptor Fc-alfa (Fc α RI (CD89)), a ligação do qual preferivelmente não é bloqueada pela imunoglobulina A humana (IgA). O termo "receptor de IgA" é intencionado a incluir o produto de gene de um gene a

(Fc α RI) localizado no cromossoma 19. Este gene é conhecido codificar diversas isoformas de transmembrana como alternativa unida de 55 a 110 kDa. Fc α RI (CD89) é constitutivamente expressada em monócitos/macrófagos, granulócitos eosinofílicos e neutrofílicos, mas não em populações de célula não efectoras. Fc α RI tem afinidade média ($5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) tanto para IgA1 quanto IgA2, que é aumentada na exposição às citocinas tais como G-CSF ou GM-CSF (Morton, H. C. et al (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Quatro anticorpos monoclonais específicos de Fc α RI, identificados como A3, A59, A62 e Ali, que ligam Fc α RI fora do domínio de ligação do ligando IgA, foram descritos (Monteiro, R. C. et al, (1992) *J. Immunol.* 148:1764).

Fc α RI e Fc γ RI são receptores deflagradores preferidos para a utilização nas moléculas biespecíficas da invenção porque eles são (1) expressados primariamente em células efectoras imunes, por exemplo, monócitos, PMNs, macrófagos e células dendríticas; (2) expressados em altos níveis (por exemplo, 5.000 a 100.000 por célula); (3) mediadores de actividades citotóxicas (por exemplo, ADCC, fagocitose); (4) medeiam apresentação de antígeno realçada de antígenos, incluindo auto-antígenos, alvejados a eles.

Embora anticorpos humanos monoclonais sejam preferidos, outros anticorpos que podem ser utilizados nas moléculas biespecíficas da invenção são anticorpos humanizados de murino, quiméricos e monoclonais.

As moléculas biespecíficas da presente invenção podem ser preparadas pela conjugação das especificidades de ligação constituídas, por exemplo, as especificidades de ligação anti-FcR e anti-IP-10, utilizando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, cada especificidade de ligação da molécula biespecífica pode ser gerada separadamente e depois conjugadas entre si. Quando as especificidades de ligação são proteínas ou péptidos, uma

variedade de agentes de ligação ou reticulação podem ser utilizados para a conjugação covalente. Os exemplos de agentes de reticulação incluem proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), o-fenileno-dimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) e sulfossuccinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (veja-se, por exemplo, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Outros métodos incluem aqueles descritos em Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* N° 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83) e Glennie *et al.*, (1987) *J Immunol.* 139:2367-2375). Os agentes de conjugação preferidos são SATA e sulfo-SMCC, ambos disponíveis da Pierce Chemistry Co. (Rockford, IL).

Quando as especificidades de ligação são anticorpos, eles podem ser conjugados por intermédio da ligação de sulfidrila das regiões de dobradiça de terminal C das duas cadeias pesadas. Numa forma de realização particularmente preferida, a região de dobradiça é modificada para conter um número ímpar de resíduos de sulfidrila, preferivelmente um, antes da conjugação.

Como alternativa, ambas as especificidades de ligação podem ser codificadas no mesmo vector e expressadas e montadas na mesma célula hospedeira. Este método é particularmente útil onde a molécula biespecífica é uma proteína de fusão mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ ou ligando x Fab. Uma molécula biespecífica da invenção pode ser uma molécula de cadeia única que compreende um anticorpo de cadeia única e uma ligação determinante ou uma molécula biespecífica de cadeia única que compreende dois determinantes de ligação. As moléculas biespecíficas podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia única. Os métodos para preparar moléculas biespecíficas são descritos

por exemplo na Patente U.S. nº 5.260.203; Patente U.S. nº 5.455.030; Patente U.S. nº 4.881.175; Patente U.S. nº 5.132.405; Patente U.S. nº 5.091.513; Patente U.S. nº 5.476.786; Patente U.S. nº 5.013.653; Patente U.S. nº 5.258.498; e Patente U.S. nº 5.482.858.

A ligação das moléculas biespecíficas aos seus alvos específicos pode ser confirmada, por exemplo, pelo ensaio de imunossorvente ligado à enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA), análise FACS, bioensaio (por exemplo, inibição de crescimento) ou ensaio de Western Blot. Cada um destes ensaios no geral detecta a presença de complexos de proteína-anticorpo de interesse particular pela utilização de um reagente rotulado (por exemplo, um anticorpo) específico para o complexo de interesse. Por exemplo, os complexos de anticorpo de FcR pode ser detectado utilizando por exemplo, um anticorpo ligado a enzima ou fragmento de anticorpo que reconheça e especificamente se ligue aos complexos de anticorpo-FcR. Como alternativa, os complexos podem ser detectados utilizando qualquer um de uma variedade de outros imunoensaios. Por exemplo, o anticorpo pode ser radioactivamente rotulado e utilizado num radioimunoensaio (RIA) (veja-se, por exemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, Março, 1986, que é aqui incorporada por referência). O isótopo radioativo pode ser detectado por meios tais como a utilização de um contador γ ou um contador de cintilação ou por meio de autorradiografia.

Composições Farmacêuticas

Num outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais ou porção(ões) de ligação de antigénio destes, da presente invenção, formulados juntos com um portador farmaceuticamente aceitável. Tais composições podem incluir

um ou uma combinação de anticorpos (por exemplo, dois ou mais diferentes) ou imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção. Por exemplo, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender uma combinação de anticorpos (ou imunoconjugados ou biespecíficos) que se ligam a diferentes epítomos no antigénio alvo ou que têm actividades complementares.

As composições farmacêuticas da invenção também podem ser administradas na terapêutica de combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapêutica de combinação pode incluir um anticorpo anti-IP-10 da presente invenção combinado com pelo menos um outro agente anti-inflamatório ou imunossupressor. Os exemplos de agentes terapêuticos que podem ser utilizados na terapêutica de combinação são descritos em maiores detalhes abaixo na secção em utilizações dos anticorpos da invenção.

Como é utilizado no presente documento, "portador farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e retardantes de absorção e outros que são fisiologicamente compatíveis. Preferivelmente, o portador é adequado para a administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parentérica, espinhal ou epidérmica (por exemplo, pela injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto activo, isto é, anticorpo, imunoconjugado ou molécula biespecífica, pode ser revestido num material para proteger o composto da acção de ácidos e outras condições naturais que podem inactivar o composto.

Os compostos farmacêuticos da invenção podem incluir um ou mais sais farmaceuticamente aceitáveis. Um "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal que retenha a actividade biológica desejada do composto precursor e não comunica nenhum efeito toxicológico indesejado (veja-se, por exemplo, Berge, S. M., *et al.*, (1977) J. Pharm. Sei.

66:1-19). Os exemplos de tais sais incluem os sais de adição de ácido e sais de adição de base. Os sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e outros, assim como de ácidos orgânicos não tóxicos tais como ácidos mono e dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos substituídos por fenila, ácidos hidróxi alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e outros. Os sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalino terrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e outros, assim como de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglicamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e outros.

Uma composição farmacêutica da invenção também pode incluir um anti-oxidante farmacêuticamente aceitável. Os exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridreto de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e outros; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil gaiato, alfa-tocoferol e outros; e (3) agentes queladores de metal, tal como ácido cítrico, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e outros.

Os exemplos de portadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol e outros) e misturas adequadas destes, óleos vegetais, tais como óleo de oliva e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etilo. Fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pela utilização de materiais de revestimento,

tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões e pela utilização de tensioativos.

Estas composições também podem conter adjuvantes tais como conservantes, agentes de humectação, agentes emulsificantes e agentes de dispersão. A prevenção da presença de microrganismos pode ser garantida tanto pelos procedimentos de esterilização, supra quanto pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico e outros. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio e outros nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser realizada pela inclusão de agentes que retardam a absorção tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

Os portadores farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. A utilização de tais meios e agentes para as substâncias farmacêuticamente ativas é conhecido na técnica. Excepto à medida que qualquer meio ou agente convencionais sejam incompatíveis com o composto activo, a sua utilização nas composições farmacêuticas da invenção é considerado. Os compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições.

As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabrico e armazenagem. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para a alta concentração de medicamento. O portador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e outros) e misturas adequadas destes. A fluidez apropriada

pode ser mantida, por exemplo, pela utilização de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pela utilização de tensioativos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser realizada incluindo-se na composição um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas pela incorporação do composto activo na quantidade requerida num solvente apropriado com uma ou uma combinação de ingredientes enumerada acima, como requerido, seguido pela microfiltração de esterilização. No geral, dispersões são preparadas pela incorporação do composto activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são a secagem a vácuo e a secagem por congelamento (liofilização) que produz um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução previamente filtrada estéril deste.

A quantidade de ingrediente activo que pode ser combinada com um material portador para produzir uma forma de dosagem única variará dependendo do paciente que é tratado e do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente activo que pode ser combinada com um material portador para produzir uma forma de dosagem única será no geral aquela quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. No geral, fora de cem por cento, esta quantidade variará de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento de ingrediente activo, preferivelmente de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por

cento, o mais preferivelmente de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento de ingrediente activo em combinação com um portador farmacêuticamente aceitável.

Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolus único pode ser administrado, diversas doses divididas podem ser administradas com o tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma unitária de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma unitária de dosagem como aqui usada refere-se a unidades fisicamente separadas adaptadas como dosagens unitárias para os pacientes a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade pré determinada de composto activo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o portador farmacêutico requerido. O relatório descritivo para as formas de dosagem unitárias da invenção são impostas e diretamente dependentes (a) pelas características únicas do composto activo e pelo efeito terapêutico particular a ser obtido e (b) pelas limitações inerentes na técnica de combinar um tal composto activo para o tratamento da sensibilidade em indivíduos.

Para a administração do anticorpo, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg e mais usualmente de 0,01 a 5 mg/kg, do peso corporal do hospedeiro. Por exemplo as dosagens podem ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou dentro da faixa de 1 a 10 mg/kg. Um regime de tratamento exemplar acarreta necessariamente a administração uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez ao mês, uma vez a cada 3 meses

ou uma vez a cada três a 6 meses. Os regimes de dosagem preferidos para um anticorpo anti-IP-10 da invenção incluem 1 mg/kg de peso corporal ou 3 mg/kg de peso corporal por intermédio da administração intravenosa, com o anticorpo sendo dado utilizando um dos seguintes programas de dosagem: (i) a cada quatro semanas por seis dosagens, depois a cada três meses; (ii) a cada três semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal uma vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal a cada três semanas.

Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com especificidades de ligação diferentes são administrados simultaneamente, caso este em que a dosagem de cada anticorpo administrado cai dentro das faixas indicadas. O anticorpo é usualmente administrado em ocasiões múltiplas. Os intervalos entre dosagens únicas podem ser, por exemplo, semanal, mensal, a cada três meses ou anualmente. Os intervalos também podem ser irregulares como indicados pela medição dos níveis sanguíneos de anticorpo ao antigénio alvo no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para se obter uma concentração de anticorpo do plasma de cerca de 1 a 1000 µg/ml e em alguns métodos de cerca de 25 a 300 µg/ml.

Como alternativa, o anticorpo pode ser administrado como uma formulação de libertação prolongada, caso em que a administração menos frequente é requerida. A dosagem e a frequência variam dependendo da semivida do anticorpo no paciente. No geral, os anticorpos humanos mostram a semivida mais longa, seguida pelos anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos e anticorpos não humanos. A dosagem e a frequência de administração podem variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Nas aplicações profiláticas, uma dosagem relactivamente baixa é administrada em intervalos relactivamente infrequentes num período longo de tempo. Alguns pacientes continuam para receber tratamento pelo resto de suas vidas. Em aplicações

terapêuticas, uma dosagem reactivamente alta em intervalos reactivamente curtos é algumas vezes requerida até que a progressão da doença seja reduzida ou terminada e preferivelmente até que o paciente mostre melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Depois disso, o paciente pode ser administrado com um regime profilático.

Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a se obter uma quantidade do ingrediente activo que seja eficaz para se obter a resposta terapêutica desejada para um paciente particular, composição e modo de administração, sem que seja tóxica para o paciente. O nível de dosagem seleccionado dependerá de uma variedade de factores farmacocinéticos incluindo a actividade das composições particulares da presente invenção utilizadas ou do éster, sal ou amida destas, da via de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do composto particular que é utilizado, da duração do tratamento, outros medicamentos, compostos e/ou materiais utilizados em combinação com as composições particulares utilizadas, da idade, sexo, peso, condição, saúde geral e história médica anterior do paciente que é tratado e factores semelhantes bem conhecidos nas técnicas médicas.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" de um anticorpo anti- IP-10 da invenção preferivelmente resulta numa diminuição na gravidade de sintomas da doença, um aumento na frequência e duração dos períodos livres do sintoma da doença ou uma prevenção da diminuição da capacidade ou incapacidade devido à aflição da doença. No caso da Artrite Reumatoide (RA), uma dose terapeuticamente eficaz preferivelmente previne deterioração adicional de sintomas físicos associados com a RA, tal como, por exemplo, dor, fadiga, inflexibilidade matinal (que dura mais do que uma hora), dores musculares difusas, perda de apetite, fraqueza, dor nas juntas com aquecimento, inchaço,

sensibilidade e dureza de uma junta depois da inactividade. Uma dose terapeuticamente eficaz preferivelmente também impede ou retarda o início da RA, tal como pode ser desejado quando sinais iniciais ou preliminares da doença estão presentes. Do mesmo modo inclui retardar a progressão crónica associada com a RA. Os testes de laboratório utilizados no diagnóstico de RA incluem os químicos (incluindo a medição dos níveis de IP-10), hematologia, sorologia e radiologia. Consequentemente, qualquer ensaio clínico ou bioquímico que monitore qualquer um dos precedentes pode ser utilizado para determinar se um tratamento particular é uma dose terapeuticamente eficaz para tratar RA. Uma pessoa de habilidade comum na técnica seria capaz de determinar tais quantidades com base em factores tais como o tamanho do paciente, a gravidade dos sintomas do paciente e da composição ou via particulares de administração seleccionadas.

Uma composição da presente invenção pode ser administrada por intermédio de uma ou mais vias de administração utilizando um ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será avaliado pelo perito habilitado, a via e/ou modo de administração variará dependendo dos resultados desejados. As vias preferidas de administração para os anticorpos da invenção incluem as vias intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, espinhal ou outras vias parenterais de administração, por exemplo pela injeção ou infusão. A frase "administração parentérica" como aqui usada significa modos de administração outros que não a administração entérica e tópica, usualmente pela injeção e inclui, sem limitação, as injeções e infusões intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnóide, intraspinal, epidural e

intrasternal.

Como alternativa, um anticorpo da invenção pode ser administrado por intermédio de uma via não parentérica, tal como uma via tópica, epidérmica ou mucósica de administração, por exemplo, intranasal, oral, vaginal, retal, sublingual ou topicamente.

Os compostos ativos podem ser preparados com portadores que protegerão o composto contra a libertação rápida, tal como uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes, pensos transdérmicos e sistemas de libertação microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser utilizados, tais como acetato de etileno vinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou no geral conhecidos por aqueles peritos na especialidade. Veja-se, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Mareei Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, numa forma de realização preferida, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tal como os dispositivos divulgados nas Patentes U.S. nº 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; ou 4.596.556. Os exemplos de implantes e módulos bem conhecidos úteis na presente invenção incluem: a Patente U.S. nº 4.487.603, que divulga uma bomba de micro-infusão implantável para dispensar a medicação numa taxa controlada; a Patente U.S. nº 4.486.194, que divulga um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; a Patente U.S. nº 4.447.233, que divulga uma bomba de infusão de medicação para libertar medicação numa taxa de infusão exacta; a Patente U.S. nº 4.447.224,

que divulga um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para a libertação de medicamento contínua; a Patente U.S. nº 4.439.196, que divulga um sistema de libertação de medicamento osmótico que tem compartimentos de câmara múltipla; e a Patente U.S. nº 4.475.196, que divulga um sistema de libertação de medicamento osmótico. Estas patentes são aqui incorporadas por referência. Muitos outros tais implantes, sistemas de libertação e módulos são conhecidos por aqueles peritos na especialidade.

Em certas formas de realização, os anticorpos humanos monoclonais da invenção podem ser formulados para garantir a distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para garantir que os compostos terapêuticos da invenção cruzam a BBB (se for desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para os métodos de fabrico de lipossomas, veja-se, por exemplo, as Patentes U.S. nº 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais porções que são selectivamente transportadas em células ou órgãos específicos, realçando assim a libertação de medicamento alvejada (veja-se, por exemplo, V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). As porções de alveamento exemplares incluem foliato ou biotina (veja-se, por exemplo, a Patente U.S. nº 5.416.016 concedida a Low *et al.*). Manosídeos (Umezawa *et al.*, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticorpos (P. G. Bloeman *et al.*, (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais *et al.* (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor da proteína A tensoativa (Briscoe *et al.*, (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); veja-se também K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Anticorpos para Utilização nos Métodos da Invenção

Os anticorpos (e imunoconjugados e moléculas biespecíficas) da presente invenção têm utilidades de diagnóstico e terapêuticas *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, estas moléculas podem ser administradas às células em cultura, por exemplo *in vitro* ou *ex vivo* ou num indivíduo, por exemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir ou diagnosticar uma variedade de distúrbios. O termo "indivíduo" como é utilizado no presente documento é intencionado a incluir ser humano e animais não humanos. Os animais não humanos incluem todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelha, cães, gatos, vacas, cavalos, galinhas, anfíbios e répteis. Os métodos são particularmente adequados para tratar pacientes humanos que têm um distúrbio associado com a expressão aberrante de IP-10. Quando anticorpos para IP-10 são administrados juntos com um outro agente, os dois podem ser administrados em ordem ou simultaneamente.

Divulga-se que os anticorpos (e imunoconjugados e moléculas biespecíficas) da invenção podem ser utilizados para detectar níveis de IP-10 ou níveis de células que contenham IP-10. Isto pode ser obtido, por exemplo, colocando-se em contacto uma amostra (tal como uma amostra *in vitro*) e uma amostra de controlo com o anticorpo anti-IP-10 sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo e IP-10. Quaisquer complexos formados entre o anticorpo e IP-10 são detectados e comparados na amostra e no controlo. Por exemplo, métodos de detecção padrão, bem conhecidos na técnica, tais como ELISA e ensaios citométricos de fluxo, podem ser realizados utilizando as composições da invenção.

São descritos métodos para detectar a presença de IP-10 (por exemplo, antigénio de IP-10 humano) numa amostra ou medir a quantidade de IP-10, que compreende contatar a amostra e uma amostra de controlo, com um anticorpo da

invenção ou uma porção de ligação de antigénio deste, que especificamente se liga à IP- 10, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou porção deste e IP-10. A formação de um complexo é depois detectada, em que uma diferença na formação do complexo entre a amostra comparada com a amostra de controlo é indicativa da presença de IP-10 na amostra.

São descritos kits que compreendem as composições (por exemplo, anticorpos humanos, imunoconjugados e moléculas biespecíficas) da invenção e instruções para a utilização. O kit pode ainda conter pelo menos um reagente adicional ou um ou mais anticorpos adicionais da invenção (por exemplo, um anticorpo que tem uma actividade complementar que se liga a um epítopo no antigénio alvo distinto do primeiro anticorpo). Os kits tipicamente incluem um rótulo indicando a utilização pretendido dos conteúdos do kit. O termo rótulo inclui qualquer material escrito ou registrado fornecido ou com o kit ou que de outro modo acompanha o kit.

A IP-10 é conhecida ter um efeito quimioatraente sobre as células T e células NK activadas e para recrutar tais células para os sítios de inflamação e respostas autoimunes. Consequentemente, os anticorpos anti-IP- 10 (e imunoconjugados e moléculas biespecíficas) da invenção podem ser utilizados para inibir a resposta inflamatória ou autoimune mediada pelas células T e/ou células NK activadas numa variedade de indicações clínicas. A invenção, portanto, fornece anticorpos ou porções de ligação a antigénio dos mesmos para utilização num método de inibir uma resposta inflamatória ou autoimune mediada pelas células T activadas e/ou células NK que compreendem contactar as células T ou células NK com um anticorpo ou porção de ligação de antigénio deste, da invenção (ou imunoconjugado ou molécula biespecífica da invenção) tal que a resposta inflamatória ou autoimune seja inibida. Os

exemplos específicos de condições inflamatórias ou autoimunes em que os anticorpos da invenção podem ser utilizados incluem, mas não são limitados aos seguintes:

A. Esclerose Múltipla e outras Doenças Desmielinantes

A expressão de ARNm de IP-10 mostrou ser aumentada na encefalomielite alérgica experimental de murino (EAE), um modelo de ratinho de esclerose múltipla (Godiska, R. et al., (1995) J. Neuroimmunol. 58:167-176). Além disso, níveis aumentados de IP-10 foram encontrados no fluido cerebrospinal de pacientes MS durante eventos desmielinantes agudos (Sorensen, T. L. et al. (1999) J. Clin. Invest. 103:807- 815; Franciotta et al. (2001) J. Neuroimmunol. 115:192-198). A IP-10 também mostrou ser expressada pelos astrócitos em lesões MS, mas não em substância branca não afetada (Balashov, K. E. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:6873-6878) e ser expressado pelos macrófagos dentro das placas MS e pelos astrócitos reativos no parênquima circundante (Simpson, J. E. et al., (2000) Neuropathol. Appl. Neurobiol. 26:133-142). Publicação de Patente PCT WO 02/15932 mostrou que a administração de anticorpos anti-IP-10 num modelo de vírus da hepatite de ratinho (MHV) de MS resultou na invasão de linfócito T e macrófago reduzida, inibiu a progressão da desmielinização, remielinação aumentada e função neurológica melhorada (veja-se também Liu, M. et al. (2001) J. Immunol. 167:4091-4097). A administração de anticorpos anti-IP-10 de murino mostrou diminuir a incidência e a gravidade da doença clínica e histológica em EAE de murino (Fife, B. T. (2001) J. Immunol. 166:7617-7624).

Em vista do precedente, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de MS e outras doenças desmielinantes pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes anti-MS, tais como interferão beta-la (por exemplo, Avonex,

Rebif®), interferão beta-lb (por exemplo, Betaseron), acetato de glatiramer (por exemplo, Copaxone®) e/ou mitoxantrona (por exemplo, Novantrone®).

B. Artrite Reumatoide

Os níveis de IP-10 mostraram ser significativamente elevados em fluido sinovial, tecido sinovial e soro de pacientes com artrite reumatoide (RA) (Patel, D. D. *et al.*, (2001) Clin. Immunol. 98:39-45; Hanaoka, R. *et al.*, (2003) Arthritis Res. and Therapy 5:R74-R81). O receptor de IP-10, CXCR3, mostrou ser preferencialmente expressado em mastóides dentro do tecido sinovial de pacientes RA (Ruschpler, P. *et al.* (2003) Arthritis Res. Ther. 5:R241-R252). Num modelo de rato de artrite induzida por adjuvante (AA), uma resposta de autoanticorpo detectável contra a própria IP-10 foi relatada (Salomon, I. *et al.*, (2002) J. Immunol. 169:2685-2693). Além disso, a administração de uma vacina de ADN que codifica a IP-10 aumentou a produção de anticorpos neutralizantes anti-IP-10 dentro dos ratos e estes autoanticorpos IP-10 puderam adotivamente transferir resistência à AA aos ratos ingênuos (Salomon, I. *et al.*, *supra*).

Em vista do precedente, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de artrite reumatoide pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes anti-RA, tais como medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs), analgésicos, corticosteróides (por exemplo, prednisona, hidrocortisona), inibidores de TNF (incluindo adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) e infliximab (Remicade®)), medicamentos anti-reumáticos modificadores da doença (incluindo metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, auranofina, azatioprina, tiomalato sódico de ouro, sulfato de hidroxyclorequina, leflunomida, minociclina, penicilamina e sulfasalazina), medicações de

fibromialgia, medicações de osteoporose e medicações de gota.

C. Doença Intestinal Inflamatória

A expressão de IP-10 mostrou ser significativamente realçada em células que infiltram a lâmina própria de biópsias colônicas tiradas de pacientes com colite ulcerativa (Uguccioni, M. et (1999) Am. J. Pathol. 155:331-336). Além disso, a neutralização de IP-10 mostrou proteger ratinhos da ulceração epitelial na colite aguda e realçar a sobrevivência da célula do folículo (Sasaki, S. et al. (2002) Eur. J. Immunol. 32:3197-3205). Também, em ratinhos -/- IL-10, que desenvolvem a colite similar à doença de Crohn em seres humanos, o tratamento com anticorpos anti-IP-10 levou à melhora na contagem da inflamação (Singh, U. P. et al., (2003) J Immunol. 171:1401-1406).

Em vista do precedente, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de doença inflamatória intestinal (IBD), incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn, pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes anti-IBD, tais como medicamentos contendo mesalamina (incluindo sulfasalazina e outros agentes contendo o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA), tais como olsalazina e balsalazida), medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs), analgésicos, corticosteróides (por exemplo, prednisona, hidrocortisona), inibidores de TNF (incluindo adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel® e infliximab (Remicade®)), imunossupressores (tais como 6-mercaptopurina, azatioprina e ciclosporina A) e antibióticos.

D. Lupo Eritematoso Sistêmico

Os níveis de IP-10 séricos foram mostrados ser acentuadamente aumentados em pacientes com lupo eritematoso sistêmico (SLE) e os níveis foram mostrados correlacionar-

se com a actividade da doença (veja-se, por exemplo, Narumi, S. et al., (2000) Cytokine 12:1561-1565). Consequentemente, numa outra forma de realização, os anticorpos anti-IP- 10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de SLE pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes anti-SLE, tal como medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs), analgésicos, corticosteróides (por exemplo, predinisona, hidrocortisona), imunossuppressores (tais como ciclofosfamida, azatioprina e metotrexato), antimalariais (tais como hidroxicloroquina) e medicamentos biológicos que inibem a produção de anticorpos de dsDNA (por exemplo, LJP 394).

E. Diabetes Tipo I

Os níveis de IP-10 séricos mostraram ser elevados em pacientes com diabetes do Tipo I, particularmente aqueles com a doença de início recente e os níveis foram mostrados estar correlacionados com o número de células T que produzem gama-interferão reativas em GAD em pacientes positivos em autoanticorpos GAD (Shimada, A. et al., (2001) Diabetes Care 24:510-515). Num estudo separado, os níveis de IP-10 séricos foram verificados serem aumentados em pacientes com a doença recém diagnosticada e em pacientes em alto risco para a doença e concentrações de IP-10 correlacionadas com os níveis de IFN-gama (Nicoletti, F. et al., (2002) Diabetologia 45:1107-1110). Além disso, células beta foram demonstradas segregar IP-10, levando à quimioatração de células T e ratinhos deficientes em CXCR3 mostraram ter início retardado de diabetes do Tipo I (Frigerio, S. et al., (2002) Nature Medicine 8:1414-1420).

Consequentemente, numa outra forma de realização, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento da diabetes do Tipo I pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O

anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes anti-diabéticos, tais como insulina.

F. Distúrbios de Pele Inflamatórios

A expressão de IP-10 mostrou estar associada com uma variedade de distúrbios de pele inflamatórios. Por exemplo, a IP-10 foi detectada em queratinócitos e no infiltrado dérmico de placas psoriáticas ativas (Gottlieb, A. B. et al. (1988) J. Exp. Med. 168:941-948). Além disso, CXCR3 é expressado pelos linfócitos CD3+ dérmicos, sugerindo que CXCR3 esteja envolvido no transporte de linfócito T para a derme psoriática (Rottman, J. B. et al., (2001) Lab. Invest. 81:335-347). Consequentemente, numa outra forma de realização, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de psoríase pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes ou tratamentos, tais como tratamentos tópicos (por exemplo, esteroides, alcatrão de hulha, calcipotrieno, tazaroteno, antralin, ácido salicílico), fototerapia, medicações sistêmicas (por exemplo, metotrexato, retinoides orais, ciclosporina, ésteres de ácido fumárico) e/ou medicamentos biológicos (por exemplo, alefacept, efalizumab).

Líquen plano, uma doença inflamatória crônica da pele e mucosa oral, mostrou estar associada com células T CD4+ e CD8+ infiltrantes que expressam CXCR3 e, além disso, as células T citolíticas infiltrantes CD8+ mostraram ter IP-10 nos seus grânulos citolíticos e os queratinócitos lesionais mostraram superexpressar IP-10 (Iijima, W. et al. (2003) Am. J. Pathol. 163:261-268). Consequentemente, numa outra forma de realização, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de líquen plano pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes ou tratamentos, tais como

agentes anti-inflamatórios, anti-histaminas, corticosteróides e terapêutica leve.

A expressão de IP-10 mostrou ser elevada em outros distúrbios de pele inflamatórios, tais como lupo eritematoso discóide crónico e infiltração linfocítica de Jessner da pele (Flier, J. *et al.*, (2001) *J. Pathol.* 194:398-405). Consequentemente, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento destes distúrbios de pele inflamatórios pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes ou tratamentos, como descrito acima.

G. Doença da Tiróide Autoimune

Tanto IP-10 quanto CXCR3 mostraram ser expressados na glândula da tiróide de pacientes que sofrem da Doença de Graves (GD), mas não são expressados (ou escassamente expressados) em tecido da tiróide normal e a expressão foi mais alta em pacientes com GD de início recente (Romagnani, P. *et al.*, (Am. J. Pathol. 161:195-206). A IP-10 também mostrou ser expressada em tecido da tiróide de pacientes que sofrem de tireoidite de Hashimoto (Kemp, E. H. *et al.*, (2003) *Clin. Endocrinol.* 59:207- 213). Consequentemente, numa outra forma de realização, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de doença da tireóide autoimune, incluindo a Doença de Graves e tireoidite de Hashimoto, pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes ou tratamentos, tais como medicamentos anti-tiróide, iodo radioativo e tireoidectomia subtotal.

H. Síndrome de Sjogren

A expressão de ARNm de IP-10 mostrou ser significativamente suprarregulada nas glândulas salivares de pacientes com síndrome de Sjogren (SS), com a expressão sendo mais proeminente no epitélio ductal adjacente aos

infiltrados linfóides (veja-se, por exemplo, Ogawa, N. et al., (2002) Arthritis Rheum. 46:2730-2741). Consequentemente, numa outra forma de realização, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento da Síndrome de Sjogren pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes anti-SS, tais como lubrificantes artificiais (por exemplo, lágrimas artificiais isentas de conservante, salivas artificiais, loções de pele sem cheiro, pulverizações nasais salinas e lubrificantes vaginais), Lacriserts® para o tratamento de olhos secos, cloridreto de pilocarpina (Salagen®) e ceimelina (Eyoxac®) para o tratamento da boca seca, medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs), esteróides e medicamentos imunossupressivos.

I. Inflamação Pulmonar

A expressão de IP-10 foi examinada num modelo de ratinho de asma alérgica, com os resultados que demonstram que IP-10 é super regulada nos pulmões depois da inoculação de alérgeno e que a super expressão de IP-10 foi associada com a hiperactividade das vias aéreas aumentadas, eosinofilia, níveis IL-4 aumentados e recrutamento de linfócitos CD8+ (Medoff, B. D. et al (2002) J. Immunol. 168:5278-5286). Além disso, fumantes que desenvolvem a doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD) mostraram expressar a IP-10 no seu epitélio bronquiolar (Saetta, M. et al (2002) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 165:1404-1409). Além disso ainda, altos níveis de IP-10 foram demonstrados no fluido da lavagem bronquioalveolar de pacientes com sarcoidose pulmonar e alveolite linfocítica (Agostini, C. et al (1998) J. Immunol. 161:6413-6420).

Consequentemente, numa outra forma de realização, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de doença caracterizados pela inflamação

pulmonar, tal como a asma, COPD, sarcoidose pulmonar ou alveolite linfocítica, pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes para reduzir a inflamação pulmonar, tal como cromolina sódica, nedocromil sódico, corticosteróides inalados, corticosteróides sistêmicos (por exemplo, oral), antagonistas beta de acção curta, broncodilatadores de acção curta, antagonistas ou agonistas de acção longa beta (oral ou inalado), modificadores de leucotrieno, teofilina e terapêutica oxigênio.

J. Rejeição a Transplante

A IP-10 mostrou desempenhar um papel na rejeição de tecido transplantado. Por exemplo, o tratamento de ratinhos com anticorpos anti-IP-10 neutralizantes aumentou a sobrevivência de aloenxertos do intestino delgado e acúmulo reduzido de células T e células NK hospedeiras na lâmina própria (Zhang, Z. *et al.*, (2002) *J. Immunol.* 168:3205-3212). Além disso, em ratinhos que recebem aloenxertos da ilhota pancreática, o tratamento de anticorpo anti-IP-10 também resultou na sobrevivência de aloenxerto aumentado e infiltração de enxerto linfocítico diminuído (Baker, M. S. *et al.*, (2003) *Surgery* 134:126-133). Adicionalmente, aloenxertos cardíacos, mas não corações normais, mostraram expressar IP-10 e CXCR3 e níveis IP-10 elevados foram associados com a vasculopatia de enxerto cardíaco (Zhao, D. X. *et al.*, (2002) *J. Immunol.* 169:1556-1560). CXCR3 e IP-10 também mostraram ser expressados pelas células inflamatórias que infiltram aloenxertos pulmonares (Agostini, C. *et al.*, (2001) *Am. J. Pathol.* 158:1703-1711). A neutralização de CXCR3 ou IP-10 *in vivo* mostrou atenuar a síndrome da bronquiolite obliterante (BOS), a limitação maior à sobrevivência para receptores de transplante pulmonar, num modelo de transplante pulmonar de murino (Belperio, J. A. *et al.* (2002) *J. Immunol.* 169:1037-1049).

Em vista do precedente, a invenção também fornece um método de inibir a rejeição a transplante pela administração de um anticorpo anti-IP-10 da invenção a um receptor de transplante em necessidade de tratamento. Os exemplos de transplantes de tecido que podem ser tratados incluem; mas não são limitadas a, fígado, pulmão (por exemplo, tratamento de BOS), rim, coração; intestino delgado e células da ilhota pancreática. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes para inibir a rejeição a transplante, tais como agentes imunossupressivos (por exemplo, ciclosporina, azatioprina, metil-prednisolona, prednisolona, prednisona, micofenolato mofetilo, sirolimus, rapamicina, tacrolimus), agentes anti-infecciosos (por exemplo, aciclovir, clotrimazol, ganciclovir, nistatina, trimetoprim-sulfamato), diuréticos (por exemplo, bumetanida, furosemida, metolazona) e medicações contra úlcera (por exemplo, cimetidina, famotidina, lansoprazol, omeprazol, ranitidina, sucralfato).

K. Dano à Medula Espinhal

Dano traumático à medula espinhal leva à infiltração de células inflamatórias. A IP-10 mostrou desempenhar um papel central na degeneração secundária a seguir ao dano à medula espinhal (Gonzalez et al. (2003) Exp. Neurol. 184:456-463; veja-se também a publicação de patente PCT WO 03/06045). A IP-10 mostrou ser significativamente elevada nas medulas espinhais de rato contundido 6 e 12 horas após a lesão (McTigue, D. M. et al., (1998) J. Neurosci. Res. 53:368-376) e na medula espinhal de ratinho lesionado 6 horas após a lesão (Gonzalez et al. (2003) supra). Consequentemente, a inibição da actividade de IP-10 depois do dano à medula espinhal mostrou ser útil na redução da infiltração de células inflamatórias e reduzindo assim o dano ao tecido secundário à inflamação. A inibição também pode reduzir a infiltração de células inflamatórias,

diminuir a degeneração secundária e melhorar a recuperação a seguir da lesão cerebral traumática e o acidente vascular cerebral. Assim, a invenção também fornece um método de tratar dano à medula espinal e lesão cerebral (por exemplo, acidente vascular cerebral) num paciente em necessidade de tratamento que compreende administrar ao paciente um anticorpo anti-IP-10 da invenção. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes, tais como outros agentes anti-inflamatórios.

L. Doenças Neurodegenerativas

A expressão de IP-10 e CXCR3 dentro do sistema nervoso central foi verificado ser super regulado em associação com mudanças patológicas associadas com a Doença de Alzheimer (AD) (Xia, M. Q. e Hyman, D. T. (1999) J. Neurovirol. 5:32-41). Dentro de cérebros AD, o CXCR3 mostrou ser expressado constitutivamente em neurônios e processos neuronais em várias regiões corticais e subcorticais e IP-10 mostrou ser expressado em astrócitos e o seu nível foi acentuadamente elevado quando comparado com os cérebros normais (Xia, M. Q. et al., (2000) J. Neuroimmunol. 108:227- 235). Consequentemente, os anticorpos da invenção podem ser utilizados no tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, pela administração a um paciente em necessidade de tratamento o anticorpo anti-IP-10, sozinho ou em combinação com outros agentes terapêuticos. Os exemplos de agentes com que o anticorpo anti-IP-10 pode ser combinado para o tratamento da doença de Alzheimer incluem os inibidores da colinesterase (donepezil, rivastigmina, galantamina, tacrina) e vitamina E. Um exemplo de um agente com que o anticorpo anti-IP-10 pode ser combinado para o tratamento da doença de Parkinson é levodopa.

M. Gengivite

A periodontite marginal está associada com o tecido gengival inflamado. As células que produzem IP-10 foram

verificadas em tecido gengival humano inflamado, assim como células que expressam o receptor CXCR3 (Kabashima, H. et al. (2002) Cytokine 20:70-77). Consequentemente, numa outra forma de realização, os anticorpos anti-IP- 10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de gengivite pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes ou tratamentos, tais como enxágues bucais anti-gengivais (por exemplo, enxágues bucais antibióticos), descamação periodontal e aplainamento de raiz e cirurgia periodontal.

N. Inflamação Associada com a Terapêutica de Gene

Os adenovírus deficientes em replicação, utilizados como vectores adenovirais utilizados na terapêutica de gene, podem causar lesão aguda e inflamação nos tecidos infectados pelos vectores virais. Tais vectores adenovirais mostraram induzir a expressão de IP-10 através da ativação dependente de capsídeo de NFkB (Borgland, S. L. et al. (2000) J. Virol. 74:3941-3947). Consequentemente, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados para inibir a lesão e/ou a inflamação induzida pela IP-10 durante o tratamento da terapêutica de gene que utiliza um vector viral, tal como um vector adenoviral, que estimula a produção não desejada de IP-10.

O. Doenças de Angiogénese

A IP-10 mostrou inibir a angiogénese *in vitro* e *in vivo* (Strieter et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 210:51-57; Angiolillo et al., (1995) J. Exp. Med. 182:155-162; Luster et al. (1995) J. Exp. Med. 182:219-231). A angiogénese desempenha um papel crucial em muitos processos de doença, tal como a resposta de cura ao trauma. Por exemplo, a vasculatura dentro da medula espinhal machucada permanece num estado de remodelagem ativa até pelo menos 28 dias após a lesão (Popovich et al., (1997) J. Coup. Neurol. 377:443-464).

Pensa-se que a IP-10 exerce os seus efeitos angiostáticos através da inibição do crescimento da célula endotelial e quimiotaxia. Ela faz isto através do seu motivo de ligação de heparina assim como através de um mecanismo mediado pelo receptor. Através do seu motivo de ligação de heparina ela impede os factores angiogénicos FGF-2 e VEGF165 de ligação aos seus receptores. Ela também exerce os seus efeitos através de um processo mediado pelo receptor. O receptor para IP-10, o CXCR3, é como alternativa unido para produzir as duas variações conhecidas CXCR3A e CXCR3B. A ligação de IP-10 ao receptor CXCR3A leva à proliferação e quimiotaxia da célula alvo, ao passo que a ligação de IP-10 ao receptor CXCR3B tem o efeito oposto de inibição do crescimento e quimiotaxia. É através do receptor CXCR3B que a IP-10 atua como um factor angiostático (Lasagni *et al.* (2003) *J. Exp. Med.* 197:1537-1549).

Em vista do precedente, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de doenças que requeiram a angiogénese, por exemplo onde o comportamento angiostático de IP-10 retarda ou impede a cura e exacerba o processo da doença. Tais doenças incluem: 1) a neovascularização fisiológica aberrante, que pode impactar a cicatrização de ferimento, o ciclo estro feminino, gravidez, hipertrofia induzida pelo exercício e outros; 2) as indicações que podem requerer o estímulo da neovascularização, incluindo a indução da formação de vaso colateral (incluindo a isquemia miocárdica, isquemia periférica, isquemia cerebral), doença da artéria coronária, doença vascular periférica, acidente vascular cerebral, cicatrização de ferimento, enxerto subsequente ao transplante de órgão tal como o transplante de célula da ilhota, fratura e reparo de tendão, cirurgia reconstrutiva, engendramento de tecido, restenose, perda de cabelo, úlceras de decúbito e estase, úlceras gastrointestinais,

insuficiência placentária, necrose asséptica, hipertensão pulmonar e sistêmica, demência vascular, Doença de Alzheimer, arteriopatia dominante autossômica cerebral com infartos subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL); pseudocisto da tireóide e linfoedema; e 3) indicações que possam requerer a remodelagem vascular, incluindo má formações vasculares, psoríase e pré eclampsia. Os anticorpos da invenção podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com outros agentes indutores da angiogênese.

P. Doença Renal Inflamatória

O receptor CXCR3 foi reportado ser expressado pelas células mesangiais de pacientes com nefropatia de IgA, glomerulonefrite membranoproliferativa ou glomerulonefrite rapidamente progressiva (Romagnani, P. et al. (1999) J. Am. Soc. Nephrol. 10:2518-2526). Além disso, num modelo de ratinho de nefrite nefrotóxica, os níveis de ARNm da IP-10 foram aumentados seis vezes no córtex de rins nefríticos 7 dias depois da indução de nefrite (Schadde, E. et al. (2000) Nephrol. Dial. Transplant. 15:1046-1053). Além disso ainda, altos níveis de expressão de IP- 10 foram observados em espécimes de biópsia renal de pacientes humanos com glomerulonefrite quando comparados com rins normais (Romagnani, P. et al., (2002) J. Am. Soc. Nephrol. 13:53-64). Consequentemente, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de doença renal inflamatória, incluindo a nefropatia de IgA, glomerulonefrite membranoproliferativa e glomerulonefrite rapidamente progressiva. Os anticorpos da invenção podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com outros agentes ou tratamentos utilizados no tratamento de glomerulonefrite, tais como antibióticos, diuréticos, medicações para a pressão sanguínea alta e diálise.

Q. Aterosclerose

A IP-10 mostrou ser um factor mitogénico e quimiotático para o músculo liso vascular, que são

características importantes de células do músculo liso para a sua contribuição para a patogénese de aterosclerose (Wang, X. *et al.*, (1996) J. Biol. Chem. 271:24286-24293). A IP-10 também mostrou ser induzida em células do músculo liso depois do tratamento com LPS ou interferão gama e também foi induzida na artéria carótida de rato depois da angioplastia de balão (Wang, X. *et al.*, (1996) *supra*). Além disso, a IP-10 demonstrou ser expressada em células endoteliais associadas com ateroma, células do músculo liso e macrófagos, sugerindo um papel para a IP-10 no recrutamento e retenção de células T activadas que foram observadas dentro das lesões da parede vascular durante a aterogénese (Mach, F. *et al.*, (1999) J. Clin. Invest. 104:1041-1050). Consequentemente, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento ou prevenção de aterosclerose. Os anticorpos podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com outros agentes ou tratamentos utilizados no tratamento de aterosclerose, tais como medicações para a pressão sanguínea alta e medicamentos que diminuem o colesterol.

R. Infeções Virais

A IP-10 pode ser regulada para cima em várias infecções virais e pode desempenhar um papel benéfico no recrutamento de células T activadas para combater a infecção viral. Em certos casos, entretanto, a produção de IP-10 durante a infecção viral pode levar a efeitos nocivos e assim, a actividade de IP-10 pode ser indesejada e pode ser desejável inibir a actividade de IP-10 em tais infecções virais utilizando um anticorpo anti-IP-10 da invenção.

Por exemplo, a IP-10 mostrou estimular a replicação de vírus da imunodeficiência humana (VIH) em macrófagos derivados de monócito e linfócitos de sangue periférico (Lane, B. R. *et al.* (2003) Virology 307:122-134). Além disso, níveis de IP-10 são elevados no fluido cerebrospinal

e cérebro de pacientes infectados com o VIH e no sistema nervoso central de ratinhos transgénicos VIH gp120 (Asensio, V. C. et al. (2001) J. Virol. 75:7067-7077).

Os níveis de IP-10 também mostraram ser elevados em pacientes com vírus da hepatite C (HCV) persistente crónico e em pacientes com hepatite ativa crónica (Narumi, S. et al., (1997) J. Immunol. 158:5536- 5544). Em fígados infectados com o HCV, a IP-10 mostrou ser expressada pelos hepatócitos mas não pelos outros tipos de célula dentro do fígado e uma proporção significativamente mais alta de células T positivas em CXCR3 foi encontrada no fígado quando comparada com o sangue (Harvey, C. E. et al., (2003) J. Leukoc. Biol. 74:360-369).

A secreção aumentada de IP-10 mostrou estar associada com a resposta inflamatória à infecção pelo vírus do herpes simples tipo I (HSV-1) ocular aguda em ratinhos e tratamento de ratinhos infectados pelo HSV-1 com anticorpos anti-IP-10 mostrou reduzir a infiltração de célula mononuclear no estroma córneo, reduzir a patologia córnea e inibe a progressão do vírus do estroma córneo para a retina durante a infecção aguda (Carr, D. J. et al. (2003) J. Virol 77:10037-10046).

A expressão de IP-10 também mostrou ser expressada na meningite viral. A IP-10 foi demonstrada estar presente no CSF de pacientes com meningite viral e ser responsável pela actividade quimiotática sobre neutrófilos, células mononucleares de sangue periférico e células T activadas (Lahrtz, F. et al., (1997) Eur. J. Immunol. 27:2484-2489; Lahrtz, F. et al. (1998) J. Neuroimmunol. 85:33-43).

Em vista do precedente, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de infecções virais envolvendo a actividade de IP-10 não desejada pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. Os exemplos não limitantes de infecções virais que podem ser tratadas incluem VIH (por exemplo, encefalite

induzida pelo VIH), HCV, HSV-1, meningite viral e Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS). O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes anti-virais, tais como, para a infecção VIH, inibidores da transcriptase reversa de nucleosídeo/nucleótido, inibidores da transcriptase reversa que não de nucleosídeo e/ou inibidores da protease (e combinações destes), para a infecção pelo HCV, interferão alfa 2a, interferão alfa 2a peguillado e/ou ribavirina e para a infecção pelo HSV-1, aciclovir, valaciclovir e/ou fanciclovir.

S. Infecções Bacterianas.

As infecções bacterianas induzem a produção de IP-10 em células afetadas (veja-se Gasper, N. A. *et al.* (2002) *Infect Immun.* 70:4075-82). A meningite bacteriana também é especificamente conhecida invocar a expressão de IP-10 (Lapinet, J. A. *et al.* (2000) *Infect Immun.* 68:6917- 23). A IP-10 também é produzida pelas células somáticas testiculares de túbulos seminíferos, num modelo de infecção bacteriana, indicando fortemente um papel provável destas quimiocinas no acúmulo de neutrófilos e linfócitos T durante a inflamação testicular, que é classicamente observada na patogénese de infecções bacterianas (Aubry, F. *et al.* (2000) *Eur. Cytokine Netw.* 11:690- 8).

Em vista do precedente, os anticorpos anti-IP-10 da invenção podem ser utilizados no tratamento de infecções bacterianas envolvendo a actividade de IP-10 não desejada pela administração do anticorpo a um paciente em necessidade de tratamento. Os exemplos de infecções bacterianas incluem, mas não são limitadas a, meningite bacteriana e pneumonia bacteriana. O anticorpo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes anti-bacterianos, tais como antibióticos.

Exemplo 1: Geração de Anticorpos Humanos Monoclonais Contra a IP- 10

Antigénio

A IP 10 humana recombinante purificada derivada de *E. coli* (PeproTech, Inc., Cat número:300-12) ou IP10 humana recombinante purificada conjugada à hemocianina do Molusco keyhole limpet (KLH), foram utilizadas como o antigénio

Ratinhos HuMab e KM Transgénicos

Anticorpos totalmente humanos monoclonais para IP 10 foram preparados utilizando as estirpes HCo7, HCol2 e HCol7 de ratinhos transgénicos HuMab e a estirpe KM de ratinhos transcromossómicos transgénicos, cada um dos quais expressam genes de anticorpo humano. Em cada uma das estirpes destes ratinhos, o gene da cadeia leve capa de ratinho endógeno foi homozigoticamente rompido como descrito em Chen *et al.*, (1993) EMBO J. 12:811-820 e o gene da cadeia pesada de ratinho endógeno foi homozigoticamente rompido como descrito no Exemplo 1 da Publicação PCT WO 01/09187. Cada uma destas estirpes de ratinho carrega um transgene da cadeia leve capa humano, KCo5, como descrito em Fishwild *et al.*, (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. A estirpe HCo7 carrega o transgene da cadeia pesada humana HCo7 como descrito nas Patentes U.S. 5.545.806, 5.625.825 e 5,545.807. A estirpe HCol2 carrega o transgene da cadeia pesada humana HCol2 como descrito no Exemplo 2 da Publicação PCT WO 01/09187. A estirpe HCol7 carrega o transgene da cadeia pesada humana HCol7 como descrito no Exemplo 8 abaixo. A estirpe KM contém o transcromossoma SC20 como descrito na Publicação PCT WO 02/43478.

Imunizações HuMab e KM:

Para gerar anticorpos monoclonais totalmente humanos para IP 10, ratinhos HuMab e ratinhos KM foram imunizados com IP 10 recombinante purificado derivado de *E. coli* ou conjugado IP10-KLH como antigénio. Os esquemas de imunização geral para ratinhos HuMab são descritos em Lonberg, N. *et al* (1994) Nature 368 (6474):856-859; Fishwild, D. *et al.*, (1996) Nature Biotechnology 14:845-851 e Publicação PCT WO 98/24884. Os ratinhos tiveram 6 a 16

semanas de idade na primeira infusão de antigénio. Uma preparação recombinante purificada (5 a 50 μ g) de antigénio IP 10 (por exemplo, purificado a partir de células *E. coli* transfectadas que expressam IP 10) foi usada para imunizar os ratinhos HuMab e ratinhos KM intraperitonealmente, subcutaneamente (Sc) ou por intermédio de injeção na almofada da pata.

Os ratinhos transgénicos foram imunizados duas vezes com antigénio em adjuvante de Freund completo ou adjuvante de Ribi intraperitonealmente (IP), subcutaneamente (Sc) ou por intermédio da almofada da pata (FP), seguido por 3 a 21 dias de imunização IP, Sc ou FP (até um total de 11 imunizações) com o antigénio em adjuvante de Freund incompleto ou adjuvante de Ribi. A resposta imune foi monitorizada pelas sangrias retroorbitais. O plasma foi rastreado por meio de ELISA (como descrito abaixo) e os ratinhos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti- IP10 foram utilizados para as fusões. Os ratinhos foram reforçados intravenosamente com antigénio 3 e 2 dias antes do sacrifício e da remoção do baço. Tipicamente, 10 a 35 fusões para cada antigénio foram realizadas. Diversas dúzias de ratinhos foram imunizados para cada antigénio. Um total de 82 ratinhos das estirpes de ratinhos HCo7, HCo12, HCo17 e KM foram imunizados com IP 10.

Seleção de Ratinhos HuMab ou KM Que Produzem Anticorpos Anti- IP10:

Para seleccionar ratinhos HuMab ou KM que produzem anticorpos que se ligam a IP 10, soros de ratinhos imunizados foram testados por meio de ELISA como é descrito por Fishwild, D. et al. (1996). Em resumo, as placas de microtitulação foram revestidas com DP 10 recombinante purificada de *E. coli* a 1 a 2 μ g/ml em PBS, 50 μ l/poço incubados a 4 °C durante a noite depois bloqueado com 200 μ l/poço de soro de galinha a 5 % em PBS/Tween (0,05 %). Diluições de plasma de ratinhos imunizados IP 10 foram

adicionados a cada poço e incubados por 1 a 2 horas na temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween e depois incubados com um anticorpo policlonal IgG Fc anti-humano de cabra conjugado com peroxidase de rábano (HRP) por 1 hora na temperatura ambiente. Depois de lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) e analisada pelo espectrofotómetro na OD 415-495. Os ratinhos que desenvolveram os títulos mais altos de anticorpos anti-IP10 foram utilizados para as fusões. As fusões foram realizadas como descrito abaixo e os sobrenadantes de hibridoma foram testados quanto a actividade anti-IP10 por meio de ELISA.

Geração de Hibridomas Que Produzem Anticorpos Humanos Monoclonais para IP 10:

Os esplenócitos de ratinho, isolados a partir de ratinhos HuMab e ratinhos KM, foram fundidos com PEG a uma linha de célula de mieloma de ratinho com base nos protocolos padrão. Os hibridomas resultantes foram depois rastreados quanto a produção de anticorpos específicos de antigénio. Suspensões de célula única de linfócitos esplénicos de ratinhos imunizados foram fundidas a um quarto do número de células de mieloma de ratinho não segregor SP2/0 (ATCC, CRL 1581) com 50 % de PEG (Sigma). As células foram inoculadas em placa em aproximadamente 1×10^5 /poço em placas de microtitulação de fundo chato, seguido por cerca de duas semanas de incubação em meio selectivo contendo 10 % de soro bovino fetal, 10 % de meio condicionado P388D1 (ATCC, CRL TIB-63), 3 a 5 % de origen (IGEN) em DMEM (Mediatech, CRL 10013, com alta glicose, L-glutamina e piruvato de sódio) mais 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml de gentamicina e 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Depois de 1 a 2 semanas, as células foram cultivadas em meio em que o HAT foi substituído com HT. Os poços individuais foram depois rastreados por meio de ELISA (descrito acima) para anticorpos IgG monoclonais

anti-IP10 humanos. Uma vez que o cultivo de hibridoma extensivo ocorreu, o meio foi monitorizado usualmente depois de 10 a 14 dias. Os hibridomas que segregam anticorpo foram recolocados em placa, mais uma vez rastreados e, se ainda positivos quanto à IgG humana, os anticorpos monoclonais anti-IP10 foram subclonados pelo menos duas vezes pela diluição limitante. Os subclones estáveis foram depois cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para outra caracterização.

Os clones de hibridoma 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4 foram seleccionados para análise adicional.

Exemplo 2: Caracterização Estrutural de Anticorpos Humanos Monoclonais Contra IP-10

As sequências de ADNc que codificam as regiões de cadeia pesada e leve dos anticorpos monoclonais 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 e 13C4 foram obtidas a partir dos hibridomas correspondentes utilizando técnicas de PCR padrão e foram sequenciados utilizando as técnicas de sequenciamento de ADN padrão. Nos casos onde o sequenciamento de ADN sozinho não foi suficiente para determinar de modo não ambíguo a estrutura do anticorpo, a análise de proteína (por exemplo, a análise de aminoácido de terminal N e a espectroscopia de massa) também foi realizada e os resultados comparados à análise de sequência de ADN para determinar deste modo a estrutura de anticorpo correta. Os resultados de análise estrutural são como segue:

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 1D4 são mostradas na Figura 1A e em SEQ ID NOs: 99 e 35, respectivamente. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 1D4 são mostradas na Figura 1B e em SEQ ID NOs: 110 e 84,

respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 1E1 são mostradas na Figura 2A e em SEQ ID NOs: 100 e 36, respectivamente. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 1E1 são mostradas na Figura 2B e em SEQ ID NOs: 111 e 85, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 2G1 são mostradas na Figura 3A e em SEQ ID NOs: 101 e 37, respectivamente. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 2G1 são mostradas na Figura 3B e em SEQ ID NOs: 112 e 86, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 3C4 são mostradas na Figura 4A e em SEQ ID NOs: 102 e 38, respectivamente. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 3C4 são mostradas na Figura 4B e em SEQ ID NOs: 113 e 87, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 6A5 são mostradas na Figura 5A e em SEQ ID NOs: 103 e 39, respectivamente. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 6A5 são mostradas na Figura 5B e em SEQ ID NOs: 114 e 88, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 6A8 são mostradas na Figura 6A e em SEQ ID NOs: 104 e 40, respectivamente. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 6A8 são mostradas na Figura 6B e em SEQ ID NOs: 115 e 89, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 6B10 são mostradas na Figura 7A e em SEQ m NOs: 105 e 41, respectivamente. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região

variável de cadeia leve de 6B 10 são mostradas na Figura 7B e em SEQ ID NOs: 116 e 90, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 7C10 são mostradas na Figura 8A e em SEQ ID NOs: 106 e 42, respectivamente. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 7C10 são mostradas na Figura 8B e em SEQ ID NOs: 117 e 91, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 8F6 são mostradas na Figura 9A e em SEQ ID NOs: 107 e 43, respectivamente. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 8F6 são mostradas na Figura 9B e em SEQ ID NOs: 118 e 92, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 10A12 são mostrados em Figura 10A e em SEQ ID NOs: 108 e 44, respectivamente. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 10A12 são mostradas na Figura 10B e em SEQ ID NOs: 119 e 93, respectivamente.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 13C4 são mostradas na Figura 11A e em SEQ ID NOs: 109 e 46, respectivamente. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 13C4 são mostradas na Figura 11B e em SEQ ID NOs: 120 e 94, respectivamente.

A comparação das sequências de imunoglobulina de cadeia pesada de 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 7C10 e 10A12 com as sequências de cadeia pesada da imunoglobulina da linha germinativa humana conhecidas demonstraram que estas cadeias pesadas de anticorpo utilizam um segmento V_H de VH 3-33 da linha germinativa humana. O alinhamento das sequências V_H de 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 7C10 e 10A12 com a sequência de VH 3-33 da linha germinativa (SEQ ID NO: 47) é mostrado na Figura 12. A análise adicional das sequências

V_H de 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 7C10 e 10A12 utilizando o sistema Kabat de determinação da região CDR levou à delimitação das regiões CDR1, CDR2 e CD3 de cadeia pesada como mostrado nas Figuras 1, 2A, 3A, 5A, 6A, 8A e 10A, respectivamente.

A comparação das sequências de imunoglobulina de cadeia pesada de 6B10 e 8F6 com as sequências de cadeia pesada da imunoglobulina da linha germinativa humana conhecidas demonstraram que estas cadeias pesadas de anticorpo utilizam um segmento V_H da linha germinativa humana V_H 3-30.3. O alinhamento das sequências V_H de 6B10 e 8F6 com a sequência V_H 3-33 da linha germinativa (SEQ ID NO: 48) é mostrado na Figura 13. A análise adicional das sequências V_H de 6B10 e 8F6 utilizando o sistema Kabat de determinação da região de CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2, CD3 de cadeia pesada como mostrado nas Figuras 7A e 9A, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada de 3C4 com as sequências de cadeia pesada da imunoglobulina da linha germinativa humana conhecidas demonstrou que esta cadeia pesada de anticorpo utiliza um segmento V_H da linha germinativa humana V_H 5-51. O alinhamento da sequência V_H 3C4 com a sequência V_H 5-51 da linha germinativa (SEQ ID NO: 49) é mostrado na Figura 14. A análise adicional da sequência V_H de 3C4 utilizando o sistema Kabat de determinação da região de CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2, CD3 de cadeia pesada como mostrado na Figura 4A.

A comparação da sequência de imunoglobulina da cadeia pesada de 13C4 com as sequências de cadeia pesada da imunoglobulina da linha germinativa humana conhecidas demonstrou que esta cadeia pesada de anticorpo utiliza um segmento V_H da linha germinativa humana V_H 4-61. O alinhamento da sequência V_H de 13C4 com a sequência V_H 4-61 da linha germinativa (SEQ ID NO: 50) é mostrado na Figura

15. A análise adicional da sequência Vh de 13C4 utilizando o sistema Kabat de determinação da região CDR levou à delimitação das regiões CDR1, CDR2 e CD3 da cadeia pesada como mostrado na Figura 11A.

A comparação das sequências de imunoglobulina da cadeia leve de 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 e 13C4 com as sequências da cadeia leve da imunoglobulina humana da linha germinativa conhecidas demonstraram que estas cadeias leves de anticorpo utilizam um segmento V_L da linha germinativa humana V_K A27. O alinhamento das sequências V_L de 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 e 13C4 com as sequências de V_K A27 da linha germinativa (SEQ ID NO: 95) é mostrado na Figura 16. A análise adicional das sequências V_L de 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 e 13C4 utilizando o sistema Kabat de determinação da região de CDR levou à delimitação das regiões de CDR1, CDR2 e CD3 de cadeia leve como mostrado nas Figuras 1B, 3B, 5B, 6B, 10B e 11B, respectivamente.

A comparação das sequências de imunoglobulina da cadeia leve de 1E1, 6B10 e 8F6 com as sequências da cadeia leve da imunoglobulina humana da linha germinativa conhecidas demonstraram que estas cadeias leves de anticorpo utilizam um segmento V_L da linha germinativa humana V_K L6. O alinhamento das sequências V_L 1E1, 6B10 e 8F6 com a sequência V_K L6 da linha germinativa (SEQ ID NO: 96) é mostrado na Figura 17. A análise adicional das sequências V_L 1E1, 6B10 e 8F6 utilizando o sistema Kabat de determinação da região de CDR levou à delimitação das regiões CDR1, CDR2 e CD3 de cadeia leve como mostrado nas Figuras 2B, 7B e 9B, respectivamente.

A comparação das sequências de imunoglobulina da cadeia leve de 3C4 com as sequências da cadeia leve da imunoglobulina humana da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 3C4 utiliza um segmento V_L da linha germinativa humana V_K LI8. O alinhamento da sequência V_L 3C4 com a sequência V_K LI 8 da linha

germinativa (SEQ ID NO: 97) é mostrado na Figura 18. A análise adicional da sequência V_L de 3C4 utilizando o sistema Kabat de determinação da região de CDR levou à delimitação das regiões de CDR1, CDR2 e CD3 da cadeia leve como mostrado na Figura 4B.

A comparação das sequências de imunoglobulina da cadeia leve de 7C10 com as sequências da cadeia leve da imunoglobulina humana da linha germinativa conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 7C10 utiliza um segmento V_L da linha germinativa humana V_k LI5. O alinhamento da sequência V_L de 7C10 com a sequência V_k LI5 da linha germinativa (SEQ ID NO: 98) é mostrado na Figura 19. A análise adicional da sequência V_L de 7C10 utilizando o sistema Kabat de determinação da região de CDR levou à delimitação das regiões CDR1, CDR2 e CD3 de cadeia leve como mostrado na Figura 8B.

Exemplo 3: Caracterização de Especificidade de Ligação e Cinéticas de Ligação de Anticorpos Anti-IP-10 Humanos Monoclonais

Neste exemplo, a afinidade de ligação, as cinéticas de ligação e a especificidade de ligação de anticorpos anti-IP-10 foram examinadas pela análise Biacore. Também, a especificidade de ligação e a competição cruzada foram examinadas por meio de ELISA.

Análise Biacore

Anticorpos anti-IP-10 foram caracterizados quanto as afinidades e cinéticas de ligação pela análise Biacore (Biacore AB, Uppsala, Suécia). A IP-10 recombinante humana expressada na *E. coli*, purificada (R & D Systems) foi ligada ao CM5 sensor chip @ 97 RU utilizando o protocolo de acoplamento EDC/NHS fornecido pela Biacore AB. A ligação foi medida fluindo-se o anticorpo em tampão HBS EP (fornecido pela Biacore AB) nas concentrações de 33 a 267 nM a uma taxa de fluxo de 40 μ l/min. As cinéticas de associação antígeno-anticorpo foram seguidas durante 5

minutos e as cinéticas de dissociação foram seguidas durante 8 minutos. As curvas de associação e dissociação foram ajustadas a um modelo de ligação de Langmuir 1:1 utilizando o software BIAevaluation (Biacore AB). Os dados correspondentes aos poucos doze segundos iniciais para as fases de associação e dissociação sozinhas foram considerados para o ajuste da curva para minimizar o efeito de avidéz. Os experimentos foram realizados tanto a 25° C quanto a 37° C. Os valores K_D , k_{on} e k_{off} que foram determinados são mostrados no Quadro 1 para a ligação a 25° C e no Quadro 2 para a ligação a 37° C:

Quadro 1: Caracterização de Ligação a 25° C com IP-10 Humana

ID do Clone	Afinidade $K_d \times 10^{-9}$ (M)	índice de associação $K_{on} \times 10^4$ (1/Ms)	índice de dissociação $K_{off} \times 10^{-5}$ (1/s)
7C10	0,02	1,70	0,04
10A12	0,53	3,83	2,02
8F6	0,81	23,3	19,0
10A12S	0,88	3,68	3,24
6A5	1,20	3,11	3,64
6A5 Lote 2*	0,96	3,20	3,10
1D4	1,20	8,40	10,20
6B10	1,78	9,50	17,2
2G1	1,90	3,78	0,75
* 6A5 Lote 2 é uma amostra independente de anticorpo purificado a partir do sobrenadante de hibridoma 6A5 quando comparado com a amostra 6A5.			

Quadro 2: Caracterização de Ligação a 37 °C com IP-10 Humana

ID de Clone	Afinidade $K_d \times 10^{-9}$ (M)	índice de associação $K_{on} \times 10^4$ (1/Ms)	índice de dissociação $K_{off} \times 10^{-5}$ (1/s)
7C10	0,016	5,27	0,08
10A12	0,34	11,1	3,81
8F6	0,78	34,7	27,0
10A12S	0,49	9,10	4,43

6A5	0,70	10,2	7,15
6A5 Lote 2	0,74	8,41	6,26
1D4	1,15	16,6	19,2
6B10	2,54	19,9	50,4
2G1	0,34	14,8	4,97

A semivida dos anticorpos (em horas), como definida pelo tempo tomado para a dissociação de metade do complexo anticorpo-antigénio durante a fase de dissociação, foi medida a 25° C e 37° C. Os valores foram determinados pela extensão das curvas de dissociação para se obter o tempo requerido para a redução de 50 % do eixo Y do sensograma de dissociação. Os resultados são mostrados abaixo no Quadro 3:

Quadro 3: Semivida de Anticorpos a 25° C e 37° C

ID de Clone	Semivida (em horas) a 25° C	Semivida (em horas) a 37° C
2G1	25,67	3,87
10A12	9,53	5,05
10A12S	5,94	4,34
6A5	5,29	2,69
6A5 Lote 2	6,21	3,87
1D4	1,88	1,00
6B10	1,12	0,38
8F6	1,01	0,71

A reactividade cruzada dos anticorpos, a 25° C, com a IP-10 do macaco rhesus, MIG humano, ITAC humano e IP-10 de ratinho foi determinada pela análise Biacore utilizando os mesmos métodos como descritos acima para IP-10 humana. MIG humano, IP-10 humana e IP-10 de ratinho foram obtidos comercialmente (PeproTech, Rocky Hill, NJ), ao passo que a IP-10 do macaco rhesus foi fabricada pela expressão recombinante e purificada pelos métodos padrão. Os antigénios foram conjugados ao CM5 sensor chip @ 140 RUs

(IP-10 do macaco rhesus), 457 RUs (MIG humano), 206 RUs (ITAC humano) e 150 RUs (IP-10 de ratinho). Os sensogramas de associação foram obtidos fluindo-se os anticorpos em tampão HBS EP a uma concentração de 133 nM durante 5 minutos. O fluxo foi depois interrompido e a dissociação foi monitorizada durante 5 minutos. As curvas de associação e dissociação foram ajustadas a um modelo de ligação Langmuir utilizando o software BIAevaluation (Biacore AB). Os resultados dos experimentos de reactividade cruzada são resumidos abaixo no Quadro 4:

Quadro 4: Reactividade Cruzada Anti-IP-10 com Vários Ligandos CXCR3

ID de Clone	IP-10 de Rhesus $K_D \times 10^{-9}$ (M)	MIG Humano $K_D \times 10^{-9}$ (M)	ITAC Humano $K_D \times 10^{-9}$ (M)	IP-10 de Ratinho $K_D \times 10^{-9}$ (M)
7C10	4,4	105,0	Nenhuma ligação	464,0
10A12	0,71	161,0	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação
8F6	0,81	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação
10A12S	1,21	722,0	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação
6A5	1,06	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação
6A5 Lote 2	1,23	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação
1D4	0,94	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação
6B10	2,01	15,4	51,5	105,0
2G1	0,26	70,1	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação

Análise de ELISA

Experimentos adicionais foram realizados utilizando um ensaio de ELISA para examinar a reactividade cruzada antigénica dos anticorpos anti- IP-10 para MIG humano, IP-10 do macaco rhesus ou IP-10 de ratinho. Os procedimentos utilizados para o ELISA foi como descrito acima no Exemplo

1 excepto que as placas de microtitulação foram revestidas com 1 µg/ml de IP-10 humana recombinante, MIG humano (PeproTech, cat. # 300-26), IP-10 de ratinho (PeproTech, cat. # 250-16) ou IP-10 recombinante do macaco rhesus. Os resultados, expressados como valores EC_{50} (em ng/ml) estão resumidos abaixo no Quadro 5:

Quadro 5: Reactividade Cruzada Anti-IP-10 por meio de ELISA com Vários Ligandos CXCR3

ID de Clone	IP-10 Humano (EC_{50} ng/ml)	IP-10 de Macaco (EC_{50} ng/ml)	MIG Humano (EC_{50} ng/ml)	IP-10 de Ratinho
10A12	40	80	180	Nenhuma ligação
10A12S	4,9	15,6	380	Nenhuma ligação
2G1	30	30	45	Nenhuma ligação
6A5	35	90	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação
6A5 Lote 2	62	125	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação
6B10	30	45	20	Nenhuma ligação
8F6	90	31	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação
1D4	25	62	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação

Estudos de competição cruzada entre os vários anticorpos anti-IP-10 também foram realizados por meio de ELISA utilizando formas biotiniladas de 6A5 e 2G1 para determinar se os anticorpos reconhecem epítomos diferentes em IP-10. O procedimento para os ELISAs de competição foi similar ao ELISA descrito acima no Exemplo 1. Em resumo, placas de microtitulação foram revestidas com IP-10

recombinante purificada a partir de *E. coli* a 0,2 µg/ml em PBS, 50 µl/poço e incubadas a 4 °C durante a noite. Os poços foram depois bloqueados com 200 µl/poço de soro de galinha a 5 % em PBS/Tween (0,05 %). Diluições de anticorpos anti-humanos de IP-10 humana purificados (a partir de 2 µg/ml a 3,91 ng/ml) foram adicionados a cada poço e incubados por 30 minutos na temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com 0,1 µg/ml de biotina-6A5 ou biotina-2G1 por 30 minutos. As placas foram depois lavadas três vezes com PBS/Tween. Depois de lavar, estreptavidina rotulada com fosfatase (KPL, Cat #: 15-30-00) foi adicionada na diluição de 1:2000 em soro de galinha a 5 % a cada poço e incubados por 1 hora na temperatura ambiente. Depois de lavar, as placas foram desenvolvidas com substrato p-NPP. (Moss, Inc, lote 10274021) e analisado pelo espectrofotómetro na OD 405. Como esperado, 2G1 não rotulado pode competir com biotina-2G1 quanto a ligação à IP-10 e, além disso, 6A5, 7C10, 10A12, 10A12S, 6B10, 8F6 e 1D4 não rotulados foram cada um capaz de competir com a ligação de biotina-2G1 à IP-10 humana. Similarmente, 6A5 não rotulado pode competir com biotina-6A5 quanto a ligação à IP-10 e, além disso, 2G1, 7C10, 10A12, 10A12S, 6B10, 8F6 e 1D4 não rotulados foram cada um capaz de competir a ligação de biotina-6A5 à IP-10 humana. Estes resultados indicam que cada um destes anticorpos tem uma especificidade de ligação para o mesmo epítopo (ou grupo de epítopo) de IP-10 humana.

Exemplo 4: Inibição da Ligação de IP-10 ao CXCR3

Neste exemplo, a capacidade dos anticorpos anti-IP-10 para inibir a ligação de IP-10 humana ao seu receptor, CXCR3, nas células que expressam o receptor foi examinada. Primeiro, uma análise de Scatchard foi realizada para a ligação de ¹²⁵I-IP-10 às células 300.19 transfectadas para expressar CXCR3. As células foram cultivadas em meio RPMI contendo 10 % de FCS e Selecção de G418. Antes da

utilização, as células foram lavadas duas vezes com Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS) a 4 °C e ajustadas a 4×10^7 células/ml. Placas de fibra de vidro (Millipore MultiScreen®, Cat. # MAFBNOB50) foram bloqueadas com 200 µl de uma solução a 0,1 % de polietilenoimina um dia antes do experimento. No dia do estudo, o tampão de bloqueio foi aspirado utilizando-se um tubo de distribuição Millipore. As placas foram lavadas três vezes com 200 µl de tampão de ligação (50 mM de HEPES, pH 7,2, 1 mM de CaCl_2 , 5 mM de MgCl_2 , 0,5 % de BSA). Vinte e cinco microlitros de tampão de ligação foram adicionados a cada poço seguido por 25 µl de um excesso de 1000 vezes de IP-10 ou tampão de ligação. Vinte e cinco microlitros de ^{125}I -IP-10 (Amersham, Cat. # IM332-25 µCi) em concentrações crescentes foram adicionados, seguido pela 25 µl de células a uma densidade de 1×10^6 células por poço. As placas foram incubadas num agitador de placa por 60 minutos na temperatura ambiente e lavadas três vezes com tampão de lavagem (10 mM de HEPES, pH 7,2, 0,5 M de NaCl, 0,5 % de BSA) num volume de 200 [ú por lavagem. As placas foram secadas, 25 de cintilante foram adicionados e as placas foram contadas num Wallac Microbeta Counter. Os dados foram analisados utilizando software Prism e um K_D foi calculado. Um K_D médio de 0,231 nM foi determinado para a ligação de receptor.

Em seguida, a capacidade dos anticorpos anti-IP-10 para inibir a ligação de 100 pM - ^{125}I -hIP-10 às células que expressam CXCR3 foi examinada. Os ensaios de competição foram conduzidos numa maneira similar ao experimento descrito acima. Em resumo, 25 µl de tampão de ligação foram adicionados às placas de filtro de fibra de vidro, seguido por 25 µl de concentrações crescentes de anticorpos anti-IP-10. Vinte e cinco microlitros de ^{125}I -IP-10 foram adicionados numa concentração final de 0,100 nM. Por fim, 25 µl de células a uma densidade de 1×10^6 células por poço foram adicionadas e as placas foram incubadas num

agitador de placa por 60 minutos na temperatura ambiente, lavadas e contadas como descrito acima. Os valores EC_{50} foram calculados utilizando o software Prism. Os valores K_i (em nM) foram determinados utilizando a fórmula:

$$K_i = \frac{EC_{50}}{1 + [L]/K_D}$$

Os resultados estão resumidos abaixo no Quadro 6:

Quadro 6: Inibição da Ligação de IP-10 ao CXCR3

Clone ID	K_i (nM)
10A12	0,09
10A12S	0,06
2G1	0,09
8F6	0,16
1E1	0,29
6B10	0,30
7C10	0,41
6A5	0,67
6A5 Lote 2	0,35
1D4	0,86

Exemplo 5: Inibição do Fluxo de Cálcio Induzida pela IP-10

Neste exemplo, a capacidade dos anticorpos anti-IP-10 para inibir o fluxo de cálcio induzido pela IP-10 foi examinada utilizando células 300.19 transfectadas para expressar CXCR3 ou linfócitos de sangue periférico humanos activados anti-CD3 (PBLs) que expressam CXCR3. Para preparar os PBLs, sangue humano normal foi purificado pela separação Ficoll padrão. Os PBLs humanos purificados foram estimulados pela adição das células às placas revestidas com 3 µg/ml de anticorpo anti-CD3 e cultivados em RPMI com 10 % de FBS. A seguir de uma incubação de três dias, as células foram mantidas em meio de cultivo contendo 500 U/ml de IL-2. No dia do estudo, as células foram lavadas e colocadas em suspensão em meio a uma densidade de $2,5 \times 10^7$ células/ml. As células 300.19 transfectadas para expressar

CXCR3 foram cultivadas em RPMI contendo 10 % de FBS. As células 300.19 foram recolocadas em suspensão em meio de cultivo a 2×10^6 células/ml.

Para realizar o ensaio, 100 µl de suspensão de célula foram adicionados a uma placa de 96 poços de lado preto, fundo claro que foi revestida com Poli-D-Lisina (Corning/Costar, cat. #3667). 100 microlitros de corante de carga do kit Calcium 3 (FlexStation, Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA) foram adicionados a cada poço, as placas foram giradas a 1100 RPM por 4 minutos e incubadas a 37° C por 30 minutos. Utilizando uma placa reagente de 96 poços, a IP-10 humana (Peprotech, cat. #300-12) foi diluída em Solução Salina Balanceada de Hank com 20 mM de HEPES e 1 % de FBS (800 pM para as células 300.19 e 1200 pM para PBLs humanas). Os anticorpos foram diluídos em série nas placas reagentes contendo IP-10. Os poços de controle contendo apenas tampão ou apenas IP-10 foram incluídos. Vinte e dois microlitros de solução de IP- 10/anticorpo foram adicionados por poço às placas contendo as células rotuladas com o corante e o fluxo de cálcio foi determinado monitorando-se a fluorescência de Calcium 3 utilizando o instrumento FlexStation de acordo com as instruções do fabricante, num período de tempo de 200 segundos. A área sob a curva (AUC) foi calculada pela integração do fluxo de cálcio entre 20 e 100 segundos de acordo com protocolos padrão (veja-se, por exemplo, Smart D. *et al.* (1999) *Br. J. Pharmacol.* 128: 1-3). Os dados foram analisados utilizando o software PrismTM (Molecular Devices, Inc.) e os valores de IC₅₀ (em nM) foram determinados. Os resultados estão resumidos abaixo no Quadro 7:

Quadro 7: Inibição do Fluxo de Cálcio Induzido pela IP-10

<u>ID de Clone</u>	<u>IC₅₀ (nM) para</u> <u>HPBL</u>	<u>IC₅₀ (nM) para Células</u> <u>300,19</u>
10A12	1,25	0,18
10A12S	2,31	0,08

2G1	2,98	0,50
8F6	6,27	0,30
1E1	3,64	NT
6B10	4,40	0,50
7C10	8,15	0,77
6A5	2,85	0,61
6A5 Lote 2	2,18	0,42
1D4	4,07	0,34

Exemplo 6: Inibição da Migração de Células Induzidas pela IP-10

A capacidade dos anticorpos anti-IP-10 para inibir a migração de célula induzida pela IP-10 foi examinada num ensaio de quimiotaxia *in vitro*. Num destes experimentos, as células 300.19 que expressam CXCR3 foram utilizadas e foram estimuladas com: (i) 100 ng/ml de IP-10 humana recombinante (rhIP-10); (ii) sobrenadante de células THP-1 estimuladas com IFN gama (que induz a secreção de IP-10 e MIG nativos), em que a IP-10 derivada de THP-1 estava numa concentração de 16 ng/ml e a actividade de MIG foi bloqueada pela adição de anti-MIG (R & D Systems) a 2,5 µg/ml; ou (iii) 100 ng/ml de IP-10 de macaco rhesus recombinante (rrmIP-10). A inibição da migração de célula foi avaliada utilizando várias concentrações de anticorpos e um índice quimiotático foi determinado.

Especificamente, a inibição da quimiotaxia foi avaliada utilizando um ensaio de placa de 96 poços padrão (placas Multiscreen MIC (Millipore)). Um filtro de 5 µm foi utilizado para as linhas de célula transfectadas; e filtro de 3 µm foi utilizado para as células primárias. As células responsivas (300.19 CXCR3+; células PBMC humanas específicas de MBP) foram recolocadas em suspensão em tampão de quimiotaxia (RPMI + 1 % de BSA ou FBS) a 1×10^6 células/ml. 100 µl de suspensão de célula foram adicionados ao poço superior e deixados incubar por 30 minutos a 37° C.

5 % de CO₂ foi aplicado antes da adição ao poço de fundo.

As IP-10 de ser humano e de macaco rhesus foram preparadas a 100 ng/ml; para a IP-10 derivada de THP-1, as células THP-1 foram estimuladas com IFN- γ (0,2 ng/ml) e o sobrenadante foi colhido; a IP-10 derivada de MS CSF foi usada pura. O ligando foi preparado em 150 μ l de tampão de quimiotaxia e colocado na câmara inferior.

Para os ensaios de inibição de quimiotaxia, o ligando foi pré-incubado com concentrações variáveis do anticorpo anti-IP-10 indicado (5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 1,25 μ g/ml, 0,613 μ g/ml, 0,3 μ g/ml, 0,01 μ g/ml) por 30 minutos a 37° C em 5 % de CO₂ antes do ensaio. A câmara de topo foi colocada em poços e os poços foram incubados por 2 horas a 37° C em 5 % de CO₂. No final da incubação, as células responsivas foram aspiradas da câmara de topo. A câmara de topo foi cuidadosamente removida. As células foram contadas em 4 campos aleatórios/poço na ampliação de 400x. Os dados foram calculados em média sobre três poços e apresentados como um índice de quimiotaxia (isto é, as vezes de migração em resposta ao ligando em relação ao meio sozinho).

Os resultados, expressados como valores IC₅₀, estão resumidos abaixo no Quadro 8:

Quadro 8: Inibição da Migração de Célula Induzida pela IP-10

<u>ID de Clone</u>	<u>rhIP-10 IC₅₀</u> <u>(μg/ml)</u>	<u>THP-1 IP-10</u> <u>IC₅₀ (μg/ml)</u>	<u>rrmIP-10 IC₅₀</u> <u>(μg/ml)</u>
6A5 (Lote 2)	0,156	0,132	0,119
8F6	0,355	0,173	0,100
6B10	1,1	0,193	0,149
10A12S	0,115	0,211	15,1
1D4	0,156	0,247	0,163

A capacidade dos anticorpos anti-IP-10 para inibir a migração de célula 300.19 que expressa CXCR3 em resposta ao fluido cerebrospinal (CSF) de pacientes com esclerose

múltipla (MS) também foi examinada. Mais uma vez, anticorpo anti-MIG a 2,5 µg/ml foi adicionado à amostra do CSF para neutralizar a actividade de MIG. Os resultados de dois experimentos, expressados como valores IC₅₀, estão resumidos abaixo no Quadro 9:

Quadro 9: Inibição da Migração de Célula Induzida pelo MS-CSF

Clone ID	Expt. 1 IC ₅₀ (µg/ml)	Expt. 2 IC ₅₀ (µg/ml)
6A5 (Lote 2)	0,100	0,236
10A12S	0,562	0,577

Estudos de migração de célula também foram realizados utilizando células 300.19 que expressam CXCR3 e MIG humano recombinante (R & D Systems), a 200 ng/ml, para examinar a capacidade dos anticorpos anti-IP-10 para inibir a migração de célula induzida pelo MIG. Os anticorpos anti-IP-10 6B10, 8F6, 1D4, 6A5 lote 2, 10A12 e 10A12S foram individualmente testados a 1 µg/ml e foram verificados não inibir a migração de célula induzida pelo MIG.

Exemplo 7: Ligação de Anticorpos à Secção Cerebral de Pacientes MS

Neste exemplo, a capacidade dos anticorpos anti-IP-10 para tingir secções do cérebro de um paciente com esclerose múltipla (MS) foi examinada. Secções cerebrais de um paciente MS do sexo feminino de 57 anos de idade foram obtidas 19,8 horas posterior à morte e mostraram uma placa periventricular de forma irregular (1,3 cm x 1,0 cm) com numerosas placas menores adicionais presentes por toda a matéria branca remanescente. A coloração com LFB mostrou a desmielinização completa. A imunoistoquímica foi realizada nas secções utilizando os anticorpos anti-IP-10 6A5 (lote 2) e 10A12S, assim como anti-GFAP e anti-CD68, como controlos positivos e um anticorpo de controlo negativo.

Um protocolo de imunoistoquímica padrão foi utilizado para a coloração com anti-IP-10 das secções. As secções

foram bloqueadas utilizando soro de 2 % a 10 %, 100 µl/secção de anticorpo primário (por exemplo, 6A5) diluído 1:100 em 2 % de soro foram adicionados, depois incubados 1 h na temperatura ambiente. Opcionalmente, as secções foram incubadas durante a noite a 4 °C e lavadas. O anticorpo biotinilado anti-humano secundário (diluído em 2 % de soro (100 µl/secção)) foi depois adicionado e incubado 30 a 60 minutos na temperatura ambiente. As peroxidases endógenas foram removidas pela adição de H₂O₂ diluído em MeOH. Em seguida, Solução ABC (Vector Labs) foi adicionada, 100 µl/secção e incubadas por 30 min na temperatura ambiente. Solução de substrato DAB foi preparada imediatamente antes da utilização, 100 µl por secção foram aplicados às lâminas antes de incubar no escuro por 10 a 20 min (como necessário para o desenvolvimento). As lâminas foram depois contra tingidas com corante nuclear Hematoxilina por 3 min (Progresso verificado depois de 1 min). Finalmente as lâminas foram incubadas em bicarbonato de sódio a 2 % por 45 segundos para desenvolver a cor.

Os resultados mostraram que tanto 6A5 quanto 10A12S puderam ligar-se à IP-10 *in situ* nas secções do cérebro do paciente com MS, com o coloração de 6A5 sendo mais intenso do que a coloração de 10A12S.

Exemplo 8: Construção de Estirpes HCol7 de Ratinhos Transgênicos

A estirpe de ratinho transgênico HCol7 foi gerada pela co-injecção do inserto de 80 kb de pH2 (Taylor et al., (1994) Int. Immunol., 6: 579-591), o inserto de 25 Kb de pVX6 e um fragmento de cromossoma artificial de levedura de ~460 kb do cromossoma yIgH24. A construção de pH2 sozinha é completamente capaz de ser rearranjada *in vivo* para formar locais da imunoglobulina da cadeia pesada humana funcionais; pVX6 e yIgH24 foram adicionados para contribuir para a diversidade de V_H da linha germinativa adicional. Os componentes individuais da mistura de ADN utilizados para

produzir HCol7 estão descritos abaixo.

O inserto pH2 descrito acima contém quatro segmentos de gene V_H da linha germinativa funcional: 1-69 (DP-10), 5-51 (DP-73), 4-34 (DP-63) e 3-30.3 (DP-46). Além disso, esta construção também contém sequências genômicas humanas que compreendem 15 segmentos D funcionais, todos os 6 segmentos J, assim como os segmentos da região constante μ e $\gamma 1$ e uma região de comutação μ - $\gamma 1$ funcional.

O inserto pVX6 contém 3 segmentos V_H da linha germinativa humana, V_H1-18 (DP-14), V_H5-51 (DP-73) e V_H3-23 (DP-47). Um fragmento de ADN HindIII/SaII de 8,5 kb, que compreende o gene V_H1-18 (DP-14) da linha germinativa humana, junto com aproximadamente 2,5 kb de flanking 5' e 5 kb de flanking 3' da sequência genômica, foi subclonado no vector plasmídico pSP72 (Promega, Madison, Wis.) para gerar o plasmídeo p343.7.16. Um fragmento de ADN BamHI/HindIII de 7 kb, que compreende o gene V_H5-51 (DP-73) da linha germinativa humana, junto com aproximadamente 5 kb de flanking 5' e 1 kb de flanking 3' da sequência genômica, foi clonado no vector de clonagem de plasmídeo com base em pBR322, pGPlf (Taylor *et al.* (1992) Nucleic Acids Res. 20: 6287- 6295), para gerar o plasmídeo p251f. Um novo vector de clonagem derivado de pGPlf, pGPlk, foi digerido com EcoRV/BamHI e ligado a um fragmento de ADN EcoRV/BamHI de 10 kb, que compreende o gene V_H3-23 (DP47) da linha germinativa humana, junto com aproximadamente 4 kb de flanking 5' e 5 kb de flanking 3' da sequência genômica. O plasmídeo resultante, p112.2RR.7, foi digerido com BamHI/SaII e ligado com o inserto BamHI/SaII purificado de 7 kb de p251f. O plasmídeo resultante, pVx4, foi digerido com XhoI e ligado com o inserto XhoI/SaII de 8,5 kb de p343.7.16. Um clone foi obtido com o gene V_H1-18 na mesma orientação como os outros dois genes V. Este clone, designado pVx6, foi depois digerido com NotI para a preparação de inserto.

O cromossoma artificial de levedura (YAC) yIgH24 foi originalmente identificado pelo rastreio pela PCR utilizando os iniciadores específicos da família V_H3 e Vh4 e é mapeado ao cromossoma humano 14 pelo teor de V_H. Foi estabelecido que ylgH24 contém segmentos V_H incluindo membros das famílias VH VH1, VH2, VH3, VH4, e VH5 e em particular pelo menos VH1-24, VH-45, VH1-46, VH2-26, VH3-30, V 3-30.5, VH3-30.3, VH3-33, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH4-28, VH4-30, VH4-30.4, VH4-30.3, VH4-31, VH4-34, 4-39, e VH-51.

Os insertos purificados de pVX6 (26 kb), pH2 (80 kb), e yIgH24 (-460 kb) foram combinados numa relação molar de 1:1:1, e microinjetado nos pró núcleos de embriões F2 de um dia e meio (C57BL/6J x DBA/2J) como é descrito por Hogan *et al.*, (B. Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 2^a edição, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.). Uma linha iniciadora de ratinhos transgênicos, que compreendem sequências de pVx6, HC2 e yIgH24, foi estabelecida a partir de ratinhos que desenvolveram a partir dos embriões injetados. Estas linhas foram designadas (HCo17) 25950.

A linha (HCo17) 25950 foi depois cruzada com ratinhos que compreendem a mutação CMD (descrita no Exemplo 1 da Publicação PCT WO 01/09187), a mutação JK_D (Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12: 811-820) e o transgene (KCo5) 9272 (Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:845-851). Os ratinhos resultantes expressam o transgene de cadeias pesada e leve capa da imunoglobulina humana num homozigoto de fundo para o rompimento dos locais de cadeia pesada e leve capa de ratinhos.

SUMÁRIO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA	SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA
1	VH CDR1 a.a. 1D4	24	VH CDR3 a.a. 1D4
2	VH CDR1 a. a. 1E1	25	VH CDR3 a.a. 1E1

3	VH CDR1 a.a. 2G1	26	VH CDR3 a.a. 2G1
4	VH CDR1 a.a. 3C4	27	VH CDR3 a.a. 3C4
5	VH CDR1 a.a. 6A5	28	VH CDR3 a.a. 6A5
6	VH CDR1 a.a. 6A8	29	VH CDR3 a.a. 6A8
7	VH CDR1 a.a. 6B10	30	VHCDR3 a.a. 6B10
8	VHCDR1 a.a. 7C10	31	VHCDR3 a.a. 7C10
9	VH CDR1 a.a. 8F6	32	VH CDR3 a.a. 8F6
10	VH CDR1 a.a. 10A12	33	VH CDR3 a.a. 10A12
11	VHCDR1 a.a. 10A12S	34	VH CDR3 a.a. 13C4
12	VHCDR1 a.a. 13C4		
13	VH CDR2 a. a. 1D4	36	VH a.a. 1E1
14	VH CDR2 a. a. 1E1	37	VH a.a. 2G1
15	VH CDR2 a. a. 2G1	38	VH a.a. 3C4
16	VH CDR2 a.a. 3C4	39	VH a. a. 6A5
17	VH CDR2 a. a. 6A5	40	VH a.a. 6A8
18	VH CDR2 a. a. 6A8	41	VH a.a. 6B10
19	VH CDR2 a.a. 6B10	42	VH a.a. 7C10
20	VHCDR2 a. a. 7C10	43	VH a.a. 8F6
21	VH CDR2 a.a. 8F6	44	VH a.a. 10A12
22	VHCDR2 a.a. 10A12	45	VH a.a. 10A12S
23	VHCDR2 a.a. 13C4	46	VH a.a. 13C4
47	linha germinativa VH 3-33 a.a.	49	linha germinativa VH 5-51 a.a.
48	linha germinativa VH 3-30.3 a.a.	50	linha germinativa VH 4-61 a.a.
51	Vk CDR1 a. a. 1D4	73	Vk CDR3 a.a. 1D4
52	Vk CDR1 a.a. 1E1	74	Vk CDR3 a.a. 1E1
53	Vk CDR1 a.a. 2G1	75	Vk CDR3 a.a. 2G1
54	Vk CDR1 a.a. 3C4	76	Vk CDR3 a.a. 3C4
55	Vk CDR1 a.a. 6A5	77	Vk CDR3 a.a. 6A5
56	Vk CDR1 a.a. 6A8	78	Vk CDR3 a.a. 6A8
57	VkCDR1 a.a. 6B10	79	Vk CDR3 a.a. 6B10
58	VkCDR1 a.a. 7C10	80	Vk CDR3 a.a. 7C10
59	Vk CDR1 a.a. 8F6	81	Vk CDR3 a.a. 8F6

60	VkCDR1 a.a. 10A12	82	Vk CDR3 a.a. 10A12
61	VkCDR1 a.a. 13C4	83	Vk CDR3 a.a. 13C4
62	Vk CDR2 a.a. 1D4	84	Vk a.a. 1D4
63	Vk CDR2 a. a. 1E1	85	Vk a.a. 1E1
64	Vk CDR2 a.a. 2G1	86	Vk a.a. 2G1
65	Vk CDR2 a.a. 3C4	87	Vk a.a. 3C4
66	Vk CDR2 a.a. 6A5	88	Vk a.a. 6A5
67	Vk CDR2 a.a. 6A8	89	Vk a.a. 6A8
68	Vk CDR2 a.a. 6B10	90	Vk a.a. 6B10
69	Vk CDR2 a.a. 7C10	91	Vk a.a. 7C10
70	Vk CDR2 a.a. 8F6	92	Vk a.a. 8F6
71	Vk CDR2 a.a. 10A12	93	Vk a.a. 10A12
72	Vk CDR2 a.a. 13C4	94	Vk a.a. 13C4
95	linha germinativa Vk A27 a.a.	97	linha germinativa Vk LI8 a.a.
96	linha germinativa Vk L6 a.a.	98	linha germinativa Vk LI 5 a.a.
99	VHn.t. 1D4	121	IP-10 Humana a. a.
100	VHn.t. 1E1	122	CXCR3 Humano a.a.
101	VH n.t. 2G1	123	EP-10 Macaco Rhesus a.a.
102	VHn.t. 3C4	124	IP-10 de Ratinho a.a.
103	VH n.t. 6A5	125	MIG Humano a.a.
104	VH n.t. 6A8	126	ITAC Humano a.a.
105	VHn.t. 6B10		
106	VH n.t. 7C10		
107	VH n.t. 8F6		
108	VHn.t. 10A12		
109	VH n.t. 13C4		
110	Vk n.t. 1D4		
111	Vk n.t. 1E1		
112	Vk n.t. 2G1		
113	Vk n.t. 3C4		
114	Vk n.t. 6A5		

115	Vk n.t. 6A8		
116	Vk n.t. 6B10		
117	Vk n.t. 7C10		
118	Vk n.t. 8F6		
119	Vk n.t. 10A12		
120	Vk n.t 13C4		

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Medarex, Inc. *et al.*

<120> ANTICORPOS IP-10 E SUAS UTILIZAÇÕES

<130> MXI-312PC

<150> 60/529180

<151> 10-12-2003

<160> 126

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Tyr Gly Met His
1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

EP2383295B1

<400> 3

Asn	Cys	Gly	Met	His
1				5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser	Tyr	Trp	Ile	Gly
1				5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asn	Asn	Gly	Met	His
1				5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr	Tyr	Gly	Met	His
1				5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asn	Ser	Ala	Met	His
1				5

<210> 8

<211> 5

EP2383295B1

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Asn Ser Gly Met His
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Thr Tyr Gly Met His
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Asn Cys Gly Met His
1 5

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Asn Ser Gly Met His
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 13
<211> 17

EP2383295B1

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Val	Ile	Trp	Phe	Glu	Gly	Ser	Ile	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Asp															

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Leu	Ile	Gly	Tyr	Asp	Gly	Ile	Asn	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Val	Ile	Ser	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln
1				5					10					15	
Gly															

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Val Ile Trp Phe Asp Gly Met Asn Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asp Tyr Ala Ala Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

Leu Ile Pro Phe Asp Gly Tyr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

Val Ile Asp Tyr Asp Gly Ile Ile Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ile Ile Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

EP2383295B1

<400> 22

Leu	Ile	Gly	Phe	Asp	Gly	Ile	Asn	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Ser	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10					15

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asn	Ile	Ala	Val	Ala	Asp	Val	Ala	Phe	Asp	Leu
1				5					10	

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp	Trp	Pro	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10		

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

EP2383295B1

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gly Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Pro Phe Phe Gln Tyr
1 5 10

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Glu Gly Asp Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Gly Asp Gly Ser Ser Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Gly Gly Tyr Thr Gly Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Arg Gly Thr His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

EP2383295B1

<213> Homo sapiens

<400> 32

Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Trp Pro Glu Gly Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gly Gly Gly Thr Val Val Arg Gly Ile Ile His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15
Gly Met Asp Val
20

<210> 35

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

EP2383295B1

<210> 36
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

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

<210> 37
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

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

<210> 38
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

```

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

```

<210> 39

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

```

Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn
           20           25           30

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

```

<210> 40

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

<210> 41

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu
	130					135					140				
Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Ser	Ala	Met	His	Trp
145					150					155				160	
Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Leu	Ile	Pro
			165						170					175	
Phe	Asp	Gly	Tyr	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe
		180						185				190			
Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn
	195					200						205			
Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly
	210					215					220				
Gly	Tyr	Thr	Gly	Tyr	Asp	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Ile
225					230					235				240	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				245											

<210> 42
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

```

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

```

<210> 43
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

```

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

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
      100           105           110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115           120

```

<210> 44
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

```

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

```

<210> 45
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

```

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

```

<210> 46
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ile Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
      20           25           30
Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35           40           45
Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50           55           60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65           70           75           80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85           90           95
Cys Ala Arg Gly Gly Gly Thr Val Val Arg Gly Ile Ile His Tyr Tyr
      100           105           110
Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
      115           120           125
Ser Ser
      130

```

<210> 47
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

```

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

```

<210> 48
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

```

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Val Thr Val Ser Ser
           100

```

<210> 49
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

```

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

```

<210> 50
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

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

<210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Gly	His	Leu	Ala
1				5					10		

<210> 52
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 53
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10		

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54

EP2383295B1

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 56
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Gly Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

EP2383295B1

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Val Ala
1 5 10

<210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 61
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

EP2383295B1

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

EP2383295B1

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

EP2383295B1

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr
1 5 10

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Phe Thr
1 5 10

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Gln Gln Phe Asp Ser Phe Pro His Thr
1 5

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Phe Thr
1 5 10

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr
1 5

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

EP2383295B1

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Tyr Thr
1 5 10

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Gln Gln Arg Ser Asn Ser Pro Pro Trp Thr
1 5 10

<210> 82
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Phe Thr
1 5 10

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Glu Tyr Thr
1 5 10

<210> 84
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

EP2383295B1

```

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

```

<210> 85
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 85

```

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

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

```

<210> 86
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86


```

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

```

<210> 87
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 87

```

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

```

<210> 88
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 88

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45

```

```

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
  50          55          60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65          70          75          80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
          85          90          95
Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
          100          105

```

<210> 89
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 89

```

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

```

<210> 90
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 90

```

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

```

<210> 91

EP2383295B1

<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91

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

<210> 92
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

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

<210> 93
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93

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

<210> 94
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 94

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

<210> 95
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 95

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

<210> 96
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96

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

<210> 97
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 97

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

<210> 98

EP2383295B1

<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98

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

<210> 99
<211> 372
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 99

cagggtgcagt	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cgtctggatt	caccttcagt	agctatggca	tgactgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatggtttg	aaggaaagtat	taaatactat	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	tacgctgtat	240
ctgcaaataga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attattgtgc	gagagagggt	300
gcggggagtt	ctctctacta	ctactacggt	atggacgtct	ggggccaagg	gaccacggtc	360
accgtctcct	ca					372

<210> 100
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 100

caggagcagc	tggtggagtc	tgggggaaac	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cgtctggatt	cacctttagt	acttatggca	tgactgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatggtatg	atggaagtga	taaatactat	180
gcagactccg	tgaaggaccg	attcacggtc	tccaaagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaataga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagaaatata	300
gcagtggctg	acgttgcttt	tgatctctgg	ggccagggga	caatggtcac	cgtctcttca	360

<210> 101
<211> 363
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 101

```

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactgtggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atagggtatg atggaattaa tgaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt tttactgtgc gagagactgg 300
cctgaggggt actacaacgg catggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca

```

<210> 102

<211> 369

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 102

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata caactttccc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
cccgggaaag gcctggagtg gatgggggtc atctctcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgctct tccaaggcca agtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgcatgtt attactgtgc gagaggatat 300
tgtagtggtg gtagctgcta cccattcttc cagtactggg gccagggcac cctgggtcac 360
gtctctctcc

```

<210> 103

<211> 372

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 103

```

caaatgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtacag cgtctggatt caccttcagt aacaatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtttg atggaatgaa taaattctat 180
gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctggaatatga acagcctgag agccgaggac acggctatat attactgtgc gagagaaggg 300
gatgggtccg ggatttatta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca

```

<210> 104

<211> 372

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 104

```

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtacag cgtctggatt caccttcagt acctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaatt atatggttcg atggaagtaa tgaagattat 180
gcagcctccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagggg 300
gatgggagct ccttatacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca

```

EP2383295B1

<210> 105
<211> 366
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 105

```
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aactctgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt ataccatttg atggatacaa taaatactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataa acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgcgc gagagaaggt 300
ggatatactg gctacgatgg gggatttgac tattggggcc agggaatcct ggtcaccgtc 360
tcctca
```

<210> 106
<211> 369
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 106

```
caggtgcaac tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactctggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atagactatg atggaattat tcaatactat 180
gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gacagagagg 300
ggcacgcatt actatggttc ggggagtttt gactactggg gccaggggaa cctggtcacc 360
gtctcctca
```

<210> 107
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 107

```
caggtgcaac tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcaat acctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaatcat taaacactac 180
gccgactccg tgaagggccg attcaccata accagagaca attccaagaa catggtgcat 240
ctgcaaataa acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatagc 300
agcagctggt acgtctactt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360
```

<210> 108
<211> 363
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 108


```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccctcagt aactgtggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atagggtttg atggaattaa tgaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

```

```

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attattgtgc gagagactgg 300
cctgagggct actacaacgg catggacgtc tggggccaag ggaccacggc caccgtctcc 360
tca 363

```

<210> 109
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 109

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctccggagac cctgtccctc 60
acctgcacta tctctggtgg ctccgtcagc agtggtgatt actactggag ctggatccgg 120
cagcccccag ggaagggact ggagtggatt gggaacatct attacagtgg gagcaccaac 180
tacaaccctt ccctcaagag tcgagtcacc atatcggtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagaggg 300
gggggtactg tggttcgggg aattatccat tactactact actacggtat ggacgtctgg 360
ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 390

```

<210> 110
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 110

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcggacact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
ggcaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta gctcaccgta cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caaa 324

```

<210> 111
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 111

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccatc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
agggttcagt gcagtggtgt tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctggagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccact cactttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324

```

<210> 112

EP2383295B1

<211> 324
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 112

```
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccatc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctggagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccact cactttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324
```

<210> 113
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 113

```
gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcaattgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctggtagca gcagaaacca 120
gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttgatagtt tccctcacac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

<210> 114
<211> 327
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 114

```
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctatt tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacagggttc gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcacctat attcactttc 300
ggcctggga ccaaagtga tatcaaa 327
```

<210> 115
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 115

```

'gaagtttgtg  tgacgcagtc  tccagggcacc  ctgtctttgt  ctccagggga  aagagccacc  60
ctctcctgca  gggccagtca  gagtattagc  agcggctact  tagcctggta  ccagcagaaa  120
cctggccagg  ctcccaggct  cctcatctat  ggtgcatcca  gcagggccac  tggcatccca  180
gacagggttca  gtggcagtg  gtctgggaca  gacttcactc  tcaccatcag  cagactggag  240
cctgaagatt  ttgcagtgta  ttactgtcag  cagtatggta  gctcaccac  tttcggcgga  300
gggaccaagg  tggagatcaa  a

```

<210> 116
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 116

```

gaaatttgtg  tgacacagtc  tccagccacc  ctgtctttgt  ctccagggga  aagagccacc  60
ctctcctgca  gggccagtca  gagtgttagc  agctacttag  cctggtagca  acagaaacct  120
ggccaggctc  ccaggctcct  catctatgat  gcatccaaca  gggccactgg  cateccagcc  180
aggttcagtg  gcagtgggtc  tgggacagac  ttcactctca  ccacagcag  cctagagcct  240
gaagattttg  cagtttatta  ctgtcagcag  cgtagcaact  ggcctccgta  cacttttggc  300
caggggacca  agctggagat  caaa

```

<210> 117
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 117

```

gacatccaga  tgaccagtc  tccatcctca  ctgtctgcat  ctgtaggaga  cagagtcacc  60
atcacttgtc  gggcgagtc  ggggtattagc  agctgggttag  cctggtagca  gcagaaacca  120
gagaaagccc  ctaagtcct  gatctatgct  gcatccagtt  tgcaaagtgg  ggtcccatca  180
aggttcagcg  gcagtggatc  tgggacagac  ttcactctca  ccacagcag  cctgcagcct  240
gaagattttg  caacttatta  ctgccaacag  tataatagtt  accctccac  tttcggcgga  300
gggaccaagg  tggagatcaa  a

```

<210> 118
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 118

```

gaaatttgtg  tgacacagtc  tccagccacc  ctgtctttgt  ctccagggga  aagagccacc  60
ctctcctgca  gggccagtca  gagtgttagc  agctacgtag  cctggtagca  acagaaacct  120
ggccaggctc  ccaggctcct  catctatgat  gcatccaaca  gggccactgg  catcccagcc  180
aggttcagtg  gcagtgggtc  tgggacagac  ttcactctca  ccacagcag  cctagagcct  240
gaagattttg  caatttatta  ctgtcagcag  cgtagcaact  cgcctccgtg  gacgttcggc  300
caagggacca  aggtggaaat  caaa

```

<210> 119
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 119

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcacctcc attcactttc 300
ggccctggga ccaaagtgga tatcaaaa                                327

```

<210> 120

<211> 654

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 120

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcacctcc attcactttc 300
ggccctggga ccaaagtgga tatcaaaaga attgtgttga cgcagtctcc aggcaccctg 360
tctttgtctc caggggaaaag agccaccctc tcttgagggg ccagtcagag tgtagcagc 420
agctacttag cctggtacca gcagaaacct ggccaggctc ccaggctcct catctatggt 480
gcatccagca gggccactgg catcccagac aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac 540
ttcactctca ccatcagcag actggagcct gaagattttg cagtgtatta ctgtcagcag 600
tatggtagct caccggagta cacttttggc caggggacca agctggagat caaaa      654

```

<210> 121

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

```

Met Asn Gln Thr Ala Ile Leu Ile Cys Cys Leu Ile Phe Leu Thr Leu
 1          5          10          15
Ser Gly Ile Gln Gly Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys
      20          25          30
Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu
      35          40          45

Glu Ile Ile Pro Ala Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala
 50          55          60
Thr Met Lys Lys Lys Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys
65          70          75          80
Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Met Ser Lys Arg
      85          90          95
Ser Pro

```

<210> 122

<211> 368

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

```

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

```

<210> 123

<211> 98

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 123

```

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

```

<210> 124

<211> 98

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 124

```

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

```

<210> 125

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

```

Met Lys Lys Ser Gly Val Leu Phe Leu Leu Gly Ile Ile Leu Leu Val
 1           5           10           15
Leu Ile Gly Val Gln Gly Thr Pro Val Val Arg Lys Gly Arg Cys Ser
           20           25           30
Cys Ile Ser Thr Asn Gln Gly Thr Ile His Leu Gln Ser Leu Lys Asp
           35           40           45

Leu Lys Gln Phe Ala Pro Ser Pro Ser Cys Glu Lys Ile Glu Ile Ile
 50           55           60
Ala Thr Leu Lys Asn Gly Val Gln Thr Cys Leu Asn Pro Asp Ser Ala
65           70           75           80
Asp Val Lys Glu Leu Ile Lys Lys Trp Glu Lys Gln Val Ser Gln Lys
           85           90           95
Lys Lys Gln Lys Asn Gly Lys Lys His Gln Lys Lys Lys Val Leu Lys
           100           105           110
Val Arg Lys Ser Gln Arg Ser Arg Gln Lys Lys Thr Thr
           115           120           125

```

```

<210> 126
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 126

```

```

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

```

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

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

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 0215932 A [0005] [0208]
- WO 0109187 A [0009] [0244] [0295]
- US 5225539 A, Winter [0102] [0137]
- US 5530101 A [0102] [0105] [0137]
- US 5585089 A [0102] [0105] [0137]
- US 5693762 A [0102] [0105] [0137]
- US 6180370 A, Queen [0102] [0105] [0137]
- US 20030153043 A, Carr [0110]
- US 5677425 A, Bodmer [0112]
- US 6165745 A, Ward [0113]
- US 6277375 B, Ward [0114]
- US 5869046 A [0114]
- US 6121022 A, Presta [0114]
- US 5624821 A [0115]
- US 5648260 A, Winter [0115]
- US 6194551 B, Idusogie [0116]
- WO 9429351 A, Bodmer [0117]
- WO 0042072 A, Presta [0118]
- US 5714350 A [0119]
- US 6350861 A, Co [0119]
- EP 1176195 A, Hanai [0120]
- WO 03035835 A, Presta [0120]
- WO 9954342 A, Umana [0120]
- EP 0154316 A, Nishimura [0121]
- EP 0401384 A, Ishikawa [0121]
- WO 02092780 A, Short [0127]

- WO 03074679 A, Lazar [0127]
- US 4816567 A, Cabilly [0137]
- US 5545806 A [0139] [0244]
- US 5569825 A [0139]
- US 5625126 A [0139]
- US 5633425 A [0139]
- US 5789650 A [0139]
- US 5877397 A [0139]
- US 5661016 A [0139]
- US 5814318 A [0139]
- US 5874299 A [0139]
- US 5770429 A, Lonberg and Kay [0139]
- US 5545807 A, Surani [0139] [0244]
- WO 9203918 A [0139]
- WO 9312227 A [0139]
- WO 9425585 A [0139]
- WO 9713852 A [0139]
- WO 9824884 A [0139] [0145] [0245]
- WO 9945962 A, Lonberg and Kay [0139]
- WO 0114424 A, Korman [0139] [0145]
- WO 0243478 A, Ishida [0140] [0244]
- US 5939598 A [0141]
- US 6075181 A [0141]
- US 6114598 A [0141]
- US 6150584 A [0141]
- US 6162963 A, Kucherlapati [0141]
- US 5223409 A [0143]
- US 5403484 A [0143]
- US 5571698 A, Ladner [0143]
- US 5427908 A [0143]
- US 5580717 A, Dower [0143]
- US 5969108 A [0143]
- US 6172197 A, McCafferty [0143]
- US 5885793 A [0143]
- US 6521404 A [0143]

- US 6544731 A [0143]
- US 6555313 A [0143]
- US 6582915 A [0143]
- US 6593081 A, Griffiths [0143]
- US 5476996 A [0144]
- US 5698767 A, Wilson [0144]
- US 4399216 A [0152]
- US 4634665 A [0152]
- US 5179017 A, Axel [0152]
- WO 8704462 A [0154]
- WO 8901036 A [0154]
- EP 338841 A [0154]
- US 4946778 A, Ladner [0171]
- WO 8800052 A, Fanger [0173]
- US 4954617 A [0173]
- WO 9410332 A [0173]
- US 5260203 A [0179]
- US 5455030 A [0179]
- US 4881175 A [0179]
- US 5132405 A [0179]
- US 5091513 A [0179]
- US 5476786 A [0179]
- US 5013653 A [0179]
- US 5258498 A [0179]
- US 5482858 A [0179]
- US 5399163 A [0201]
- US 5383851 A [0201]
- US 5312335 A [0201]
- US 5064413 A [0201]
- US 4941880 A [0201]
- US 4790824 A [0201]
- US 4596556 A [0201]
- US 4487603 A [0201]
- US 4486194 A [0201]
- US 4447233 A [0201]

- US 4447224 A [0201]
- US 4439196 A [0201]

Literatura não relacionada com patentes, citada na descrição

- LUSTER, A.D. et al. *Nature*, 1985, vol. 315, 672-676 [0001]
- LUSTER, A.D. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 2868-2871 [0001]
- LUSTER, A.D. ; RAVETCH, J.V. *J. Exp. Med.*, 1987, vol. 166, 1084-1097 [0001]
- KAPLAN, G. et al. *J. Exp. Med.*, 1987, vol. 166, 1098-1108 [0001]
- PADOVAN, B. et al. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, vol. 71, 669-676 [0001]
- VANGURI, R. ; FARBER, J.M. *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 1411-1418 [0001]
- REN, L.Q. et al. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1998, vol. 59, 256-263 [0001]
- NEVILLE, L.F et al. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1997, vol. 8, 207-219 [0001]
- LOETSCHER, M. et al. *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 184, 963-969 [0002]
- INNGJERDINGEN, M. et al. *Blood*, 2001, vol. 97, 367-375 [0002]
- COLE, K.E et al. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 187, 2009-2021 [0002]
- MAGHAZACHI, A.A. et al. *FASEB J.*, 1997, vol. 11, 765-774 [0003]
- ROMAGNANI, P. et al. *Blood*, 2001, vol. 97, 601-607 [0003]
- SORENSEN, T.L. et al. *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 103, 807-815 [0004] [0208]
- PATEL, D.D. et al. *Clin. Immunol.*, 2001, vol. 98, 39-45 [0004] [0210]
- UGUCCIONI, M. et al. *Am. J. Pathol.*, 1999, vol. 155, 331-

336 [0004] [0212]

- **NARUMI, S. et al.** *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, 5536-5544
[0004] [0237]
- **MCTIGUE, D.M. et al.** *J. Neurosci. Res.*, 1998, vol. 53,
368-376 [0004] [0226]
- **GONZALEZ et al.** *Exp. Neurol.*, 2003, vol. 184, 456-463
[0004] [0226]
- **NARUMI, S. et al.** *Cytokine*, 2000, vol. 12, 1561-1565
[0004] [0214]
- **ZHANG, Z. et al.** *J. Immunol.*, 2002, vol. 168, 3205-3212
[0004] [0224]
- **OGAWA, N. et al.** *Arthritis Rheum.*, vol. 46, 2730-2741
[0004]
- **LIU, M. T. et al.** discloses neutralisation of the chemokine CXCL10 reduces inflammatory cell invasion and demyelination and improves neurological function in a viral model of multiple sclerosis. *J. Immunol.*, vol. 167, 4091-4097 [0006]
- **CARR, D. J. et al.** discloses neutralizing antibody to the chemokine CXCL10 reduces ocular inflammation and delays viral spread following corneal HSV-1 infection. *Arvo Annual Meeting Abstract*, 2003 [0007]
- **CARR, D J et al.** discloses effect of anti-CXCL10 monoclonal antibody on herpes virus type 1 keratitis and retinal infection. *J. Virol.*, 2003, vol. 77, 10037-10046 [0008]
- **MCKAY BROWN et al.** discloses tolerance to single, but not multiple, amino acid replacements in antibody V-H CDR2. *J. Immunol.*, 1996, vol. 156, 3285-3291 [0010]
- **KLEIN, R. S. et al.** discloses IFN-inducible protein 10/CXC chemokine ligand 10-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, 550-559 [0011]
- **BIRD et al.** *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0041] [0134]

- **HUSTON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0041]
- **E. MEYERS ; W. MILLER.** *Comput. Appl. Biosci.*, 1988, vol. 4, 11-17 [0095]
- **NEEDLEMAN ; WUNSCH.** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 444-453 [0095]
- **ALTSCHUL et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-10 [0096]
- **ALTSCHUL et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25 (17), 3389-3402 [0096]
- **RIECHMANN, L. et al.** *Nature*, 1998, vol. 332, 323-327 [0102]
- **JONES, P. et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0102]
- **QUEEN, C. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, vol. 86, 10029-10033 [0102]
- **KABAT, E. A. et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH Publication No. 91-3242, 1991 [0104] [0133]
- **TOMLINSON, I. M. et al.** The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 227, 776-798 [0104]
- **COX, J. P. L. et al.** A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage. *Eur. J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 827-836 [0104]
- **SHIELDS, R.L. et al.** *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 6591-6604 [0118]
- **SHIELDS, R.L. et al.** *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 26733-26740 [0120]
- **UMANA et al.** *Nat. Biotech.*, 1999, vol. 17, 176-180 [0120]
- Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing and Wiley Interscience, 1987 [0128]
- **KABAT, E. A.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH Publication No. 91-3242, 1991 [0132]
- **HUSTON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85,

5879-5883 [0134]

- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0134]
- **KOHLER ; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0135]
- **LONBERG et al.** *Nature*, 1994, vol. 368 (6474), 856-859 [0139]
- **LONBERG, N.** *Handbook of Experimental Pharmacology*. 1994, vol. 113, 49-101 [0139]
- **LONBERG, N. ; HUSZAR, D.** *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0139]
- **HARDING, F. ; LONBERG, N.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1995, vol. 764, 536-546 [0139]
- **TAYLOR, L. et al.** *Nucleic Acids Research*, 1992, vol. 20, 6287-6295 [0139]
- **CHEN, J. et al.** *International Immunology*, 1993, vol. 5, 647-656 [0139]
- **TUAILLON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 3720-3724 [0139]
- **CHOI et al.** *Nature Genetics*, 1993, vol. 4, 117-123 [0139]
- **CHEN, J. et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 821-830 [0139]
- **TUAILLON et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 2912-2920 [0139]
- **TAYLOR, L. et al.** *International Immunology*, 1994, vol. 6, 579-591 [0139]
- **FISHWILD, D. et al.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-851 [0139] [0145] [0245]
- **TOMIZUKA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, 722-727 [0142]
- **KUROIWA et al.** *Nature Biotechnology*, 2002, vol. 20, 889-894 [0142]
- **LONBERG, N. et al.** *Nature*, 1994, vol. 368 (6474), 856-859 [0145] [0245]
- **MORRISON, S.** *Science*, 1985, vol. 229, 1202 [0149]
- **GOEDEL.** *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology.* Academic Press, 1990, vol. 185 [0151]
- **TAKEBE, Y. et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 466-472

[0151]

- **BOSS, M. A. ; WOOD, C. R.** *Immunology Today*, 1985, vol. 6, 12-13 [0153]
- **URLAUB ; CHASIN.** *Proc. Natl. Acad. Sci . USA*, 1980, vol. 77, 4216-42, 20 [0154]
- **R. J. KAUFMAN ; P. A. SHARP.** *Mol. Biol.*, 1982, vol. 159, 601-621 [0154]
- **SAITO, G. et al.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, vol. 55, 199-215 [0164]
- **TRAIL, P.A. et al.** *Cancer Immunol. Immunother.*, 2003, vol. 52, 328-337 [0164]
- **PAYNE, G.** *Cancer Cell*, 2003, vol. 3, 207-212 [0164]
- **ALLEN, T.M.** *Nat. Rev. Cancer*, 2002, vol. 2, 750-763 [0164]
- **PASTAN, I. ; KREITMAN, R. J.** *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2002, vol. 3, 1089-1091 [0164]
- **SENER, P.D. ; SPRINGER, C.J.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, vol. 53, 247-264 [0164]
- Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy. **ARNON et al.** *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*. Alan R. Liss, Inc, 1985, 243-56 [0167]
- Antibodies For Drug Delivery. **HELLSTROM et al.** *Controlled Drug Delivery*. Marcel Dekker, Inc, 1987, 623-53 [0167]
- Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review. **THORPE et al.** *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*. 1985, 475-506 [0167]
- 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 [0167]
- **THORPE et al.** The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates. *Immunol. Rev.*, 1982, vol. 62, 119-58 [0167]
- **GRAZIANO, R.F. et al.** *J. Immunol*, 1995, vol. 155 (10),

4996-5002 [0173]

- **MORTON, H.C. et al.** *Critical Reviews in Immunology*, 1996, vol. 16, 423-440 [0174]
- **MONTEIRO, R.C. et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 1764 [0174]
- **KARPOVSKY et al.** *J. Exp. Med.*, 1984, vol. 160, 1686 [0177]
- **LIU, MA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 8648 [0177]
- **PAULUS.** *Behring Ins. Mitt. No. 78*, 1985, 118-132 [0177]
- **BRENNAN et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 81-83 [0177]
- **GLENNIE et al.** *J. Immunol.*, 1987, vol. 139, 2367-2375 [0177]
- **BERGE, S.M. et al.** *J. Pharm. Sci.*, 1977, vol. 66, 1-19 [0184]
- Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. Marcel Dekker, Inc, 1978 [0200]
- **V.V. RANADE.** *J. Clin. Pharmacol.*, 1989, vol. 29, 685 [0202]
- **UMEZAWA et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, vol. 153, 1038 [0202]
- **P.G. BLOEMAN et al.** *FEBS Lett.*, 1995, vol. 357, 140 [0202]
- **M. OWAIS et al.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, vol. 39, 180 [0202]
- **BRISCOE et al.** *Am. J. Physiol.*, 1995, vol. 1233, 134 [0202]
- **SCHREIER et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 9090 [0202]
- **K. KEINANEN ; M.L. LAUKKANEN.** *FEBS Lett.*, 1994, vol. 346, 123 [0202]
- **J.J. KILLION ; I.J. FIDLER.** *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 273 [0202]
- **GODISKA, R. et al.** *J. Neuroimmunol.*, 1995, vol. 58, 167-176 [0208]

- **FRANCIOTTA et al.** *J. Neuroimmunol.*, 2001, vol. 115, 192-198 [0208]
- **BALASHOV, K.E. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 6873-6878 [0208]
- **SIMPSON, J.E. et al.** *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2000, vol. 26, 133-142 [0208]
- **LIU, M.T. et al.** *J. Immunol.*, 2001, vol. 167, 4091-4097 [0208]
- **FIFE, B.T. et al.** *J. Immunol.*, 2001, vol. 166, 7617-7624 [0208]
- **HANAOKA, R. et al.** *Arthritis Res. and Therapy*, 2003, vol. 5, R74-R81 [0210]
- **RUSCHPLER, P. et al.** *Arthritis Res. Ther.*, 2003, vol. 5, R241-R252 [0210]
- **SALOMON, I. et al.** *J. Immunol.*, 2002, vol. 169, 2685-2693 [0210]
- **SASAKI, S. et al.** *Eur. J. Immunol.*, 2002, vol. 32, 3197-3205 [0212]
- **SINGH, U.P et al.** *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, 1401-1406 [0212]
- **SHIMADA, A. et al.** *Diabetes Care*, 2001, vol. 24, 510-515 [0215]
- **NICOLETTI, F. et al.** *Diabetologia*, 2002, vol. 45, 1107-1110 [0215]
- **FRIGERIO, S. et al.** *Nature Medicine*, 2002, vol. 8, 1414-1420 [0215]
- **GOTTLIEB, A.B. et al.** *J. Exp. Med.*, 1988, vol. 168, 941-948 [0217]
- **ROTTMAN, J.B. et al.** *Lab. Invest.*, 2001, vol. 81, 335-347 [0217]
- **IIJIMA, W. et al.** *Am. J. Pathol.*, 2003, vol. 163, 261-268 [0218]
- **FLIER, J. et al.** 194. *J. Pathol.*, 2001, 398-405 [0219]
- **ROMAGNANI, P. et al.** *Am. J. Pathol.*, vol. 161, 195-206 [0220]

- **KEMP, E.H. et al.** *Clin. Endocrinol.*, 2003, vol. 59, 207-213 [0220]
- **OGAWA, N. et al.** *Arthritis Rheum.*, 2002, vol. 46, 2730-2741 [0221]
- **MEDOFF, B.D. et al.** *J. Immunol.*, 2002, vol. 168, 5278-5286 [0222]
- **SAETTA, M. et al.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2002, vol. 165, 1404-1409 [0222]
- **AGOSTINI, C et al.** *J. Immunol.*, 1998, vol. 161, 6413-6420 [0222]
- **BAKER, M.S. et al.** *Surgery*, 2003, vol. 134, 126-133 [0224]
- **ZHAO, D.X. et al.** *J. Immunol.*, 2002, vol. 169, 1556-1560 [0224]
- **AGOSTINI, C. et al.** *Am J. Pathol.*, 2001, vol. 158, 1703-1711 [0224]
- **BELPERIO, J.A. et al.** *J. Immunol.*, 2002, vol. 169, 1037-1049 [0224]
- **XIA, M.Q. ; HYMAN, D.T.** *J. Neurovirol.*, 1999, vol. 5, 32-41 [0227]
- **XIA, M. et al.** *J. Neuroimmunol.*, 2000, vol. 108, 227-235 [0227]
- **KABASHIMA, H. et al.** *Cytokine*, 2002, vol. 20, 70-77 [0228]
- **BORGLAND, S.L. et al.** *J. V i r o l .* , 2000, vol. 74, 3941-3947 [0229]
- **STRIETER et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, vol. 210, 51-57 [0230]
- **ANGIOLILLO et al.** *J. Exp. Med.*, 1995, vol. 182, 155-162 [0230]
- **LUSTER et al.** *J. Exp. Med.*, 1995, vol. 182, 219-231 [0230]
- **POPOVICH et al.** *J. Comp. Neurol.*, 1997, vol. 377, 443-464 [0230]
- **LASAGNI et al.** *J. Exp. Med.*, 2003, vol. 197, 1537-1549

[0231]

- ROMAGNANI, P. et al. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1999, vol. 10, 2518-2526 [0233]
- SCHADDE, E. et al. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2000, vol. 15, 1046-1053 [0233]
- ROMAGNANI, P. et al. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002, vol. 13, 53-64 [0233]
- WANG, X. et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 24286-24293 [0234]
- MACH, F. et al. *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 104, 1041-1050 [0234]
- LANE, B.R. et al. *Virology*, 2003, vol. 307, 122-134 [0236]
- ASENSIO, V.C. et al. *J. Virol.*, 2001, vol. 75, 7067-7077 [0236]
- HARVEY, C.E. et al. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, vol. 74, 360-369 [0237]
- CARR, D.J. et al. *J. Virol.*, 2003, vol. 77, 10037-10046 [0238]
- LAHRTZ, F. et al. *Eur. J. Immunol.*, 1997, vol. 27, 2484-2489 [0239]
- LAHRTZ, F. et al. *J. Neuroimmunol.*, 1998, vol. 85, 33-43 [0239]
- GASPER, N.A. et al. *Infect Immun.*, 2002, vol. 70, 4075-82 [0241]
- LAPINET, J.A. et al. *Infect Immun.*, 2000, vol. 68, 6917-23 [0241]
- AUBRY, F. et al. *Eur Cytokine Netw.*, 2000, vol. 11, 690-8 [0241]
- CHEN et al. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 811-820 [0244] [0295]
- FISHWILD et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-851 [0244] [0295]
- SMART D. et al. *Br. J. Pharmacol.*, 1999, vol. 128, 1-3 [0279]
- TAYLOR et al. *Int. Immunol.*, 1994, vol. 6, 579-591 [0290]

- **TAYLOR et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1992, vol. 20, 6287-6295 [0292]
- **B. HOGAN et al.** *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994 [0294]

Lisboa, 18 de Maio de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo monoclonal humano isolado, ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo, em o anticorpo se liga especificamente à IP-10 humana e não reage de forma cruzada com MIG humana e não reage de forma cruzada com ITAC humana.

2. O anticorpo da reivindicação 1, que é um anticorpo de comprimento completo de um isotipo de IgG1 ou IgG4 ou é um fragmento de anticorpo.

3. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio da reivindicação 1, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende sequências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências CDR1, CDR2 e CDR3, em que:

(a) a sequência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, e a sequência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 81;

(b) a sequência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende a sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e a sequência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; ou

(c) a sequência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a sequência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 77.

4. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, que compreende:

(a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 9, uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 21, uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 32, uma CDR1 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 59, uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 70 e uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 81;

(b) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 1, uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 13, uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 24, uma CDR1 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 51, uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 62 e uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 73; ou

(c) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 5, uma CDR2 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17, uma CDR3 da região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 28, uma CDR1 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 55, uma CDR2 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 66 e uma CDR3 da região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 77.

5. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno da reivindicação 1 ou 2, que compete pela ligação a IP-10 com o anticorpo da reivindicação 4 ou que se liga ao mesmo

epitopo na IP-10 que o anticorpo da reivindicação 4.

6. Um imunoc conjugado que compreende o anticorpo ou porção de ligação a antígeno de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ligados a um agente terapêutico, tal como uma citotoxina ou isótopo radioativo.

7. Uma molécula biespecífica que compreende o anticorpo ou porção de ligação a antígeno de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ligada a uma segunda fração funcional que tem uma especificidade de ligação diferente do que o dito anticorpo ou porção de ligação a antígeno.

8. Uma composição que compreende o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, o imunoc conjugado da reivindicação 6 ou a molécula biespecífica da reivindicação 7, e um portador farmacêuticamente aceitável.

9. Uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica o anticorpo ou porção de ligação a antígeno de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou um vector de expressão que compreende o dito ácido nucleico, ou uma célula hospedeira que compreende o referido vector de expressão.

10. Um ratinho transgênico que compreende os transgenes de cadeia pesada e leve de imunoglobulina humana, em que o ratinho expressa o anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou um hibridoma preparado a partir do dito ratinho em que o hibridoma produz o referido anticorpo.

11. Um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 para utilização num método para o tratamento de uma doença inflamatória ou

autoimune.

12. Um anticorpo ou porção de ligação a antigénio da reivindicação 11 para utilização num método para o tratamento da reivindicação 11, em que a doença é selecionada a partir de esclerose múltipla, artrite reumátide, doença inflamatória do intestino (por exemplo, colite ulcerativa, doença de Crohn), lúpus eritematoso sistémico, diabetes do tipo I, transtornos inflamatórios da pele (por exemplo, psoríase, líquen plano), doença da tiróide autoimune (por exemplo, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto), síndrome de Sjogren, inflamação pulmonar (por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crónica, sarcoidose pulmonar, alveolite linfocítica), rejeição de transplantes, lesão medular, lesão cerebral (por exemplo, acidente vascular cerebral), doenças neurodegenerativas (por exemplo, doença de Alzheimer, doença de Parkinson), gengivite, inflamação induzida por terapêutica génica, doenças da angiogénese, doença inflamatória do rim (por exemplo, nefropatia por IgA, glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite de rápida progressão) e aterosclerose.

13. Um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de qualquer das reivindicações 1 a 4 para utilização num método para o tratamento de uma infeção bacteriana ou viral que envolve uma atividade de IP-10 indesejada.

14. Um anticorpo ou porção de ligação a antigénio da reivindicação 13 para utilização num método para o tratamento da reivindicação 13, em que a infeção viral é mediada por vírus da imunodeficiência humana (VIH), vírus da hepatite C (HCV), vírus herpes simplex tipo I (HSV-1) ou o vírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS).

15. Um método para preparar o anticorpo ou porção de ligação a antígeno como definido na reivindicação 1, que compreende:

(a) proporcionar:

(i) uma sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência CDR1 que é selecionada a partir das SEQ ID NOs: 5, 9 e 1, uma sequência CDR2 que é selecionada a partir das SEQ ID NOs: 17, 21 e 13; e uma sequência CDR3 que é selecionada a partir das SEQ ID NOs: 28, 32 e 24; ou

(ii) uma sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência CDR1 selecionada a partir das SEQ ID NOs: 55, 59 e 51, uma sequência CDR2 selecionada a partir das SEQ ID NOs: 66, 70 e 62 e uma sequência CDR3 selecionada a partir das SEQ ID NOs : 77, 81 e 73;

(b) alterar pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada e/ou da sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve para criar, pelo menos, uma sequência de anticorpo alterada; e

(c) expressar a sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

Lisboa, 18 de Maio de 2015

FIGURA 1A

VH 1D4 anti-IP10

segmento V: 3-33

segmento D: 3-10

segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V E S Q G G V V Q P G R S L
   CAG GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                   CDR1
                                   -----
55  R L S C A A S Q F T P S S Y Q M H W
   AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG

                                   CDR2
                                   -----
109 V R Q A P G K Q L E W V A V I W F E
   GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TTT GAA

                                   CDR2
                                   -----
163 G S I K Y Y A D S V K G R F T I S R
   GGA AGT ATT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
   CAC AAT TCC AAG AAT ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GGC GAG GAC

                                   CDR3
                                   -----
271 T A V Y Y C A R E Q A G S S L Y Y Y
   ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG AGA GAG GGT GCG GGG AGT TCT CTC TAC TAC TAC

                                   CDR3
                                   -----
325 Y G M D V N G Q G T T V T V S S
   TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 1B

VK 1D4 anti-IP10

segmento V: A27
segmento J: JK2

```

      E I V L T Q S P Q T L S L S P Q E R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
      A T L S C R A S Q S V S S G H L A W
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC GGA CAC TTA GCC TGG

                                CDR2
      Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR3
      R A T G I P G R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GGC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

      T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTG GCA CTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      Q Y G S S P Y T P G Q G T K L E I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

```

FIGURA 2A

VH 1E1 anti-IP10

segmento V: VH3-33
 segmento D: indeterminado
 segmento J: JH3a

```

1   Q E Q L V E S G G N V V Q P C R S L
    CAG GAG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA AAC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
55  R L S C A A S G P T F S T Y Q M H W
    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTT AGT ACT TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
109 V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT

                                CDR2
163 G S D K Y Y A D S V K D R P T V S K
    GGA AGT GAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GAC CGA TTC ACG GTC TCC AAA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
271 T A V Y Y C A R N I A V A D V A F D
    ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA AAT ATA GCA GTG GCT GAC GTT GCT TTT GAT

                                CDR3
325 L W G Q G T N V T V S S
    CTC TGG GGC CAG GCG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA
  
```

→

FIGURA 2B

VK 1E1 anti-IP10

segmento V: L6
 segmento J: JK4

```

      E I V L T Q S P A I L S L S P G E R
1  GAA ATT CTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ATC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      A T G I P A R P S G S G S G T D F T
163  GCC ACT GGC ATC CCA GGC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217  CTC ACC ATC AGC AGC CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TOT CAG CAG

      CDR3
      R S N W P P L T F G G G T R V E I K
271  CGT AGC AAC TGG CCT CCA CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
  
```

FIGURA 3A

VH 2G1 anti-IP10

segmento V: 3-33
 segmento D: indeterminado
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
55  R L S C A A S G F T F S H C Q M H W
    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TGT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q A P G K G L E W V A L I G Y D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA GGG TAT GAT

                                CDR3
                                -----
163 G I N E Y Y A D S V K G R F T I S R
    GGA ATT AAT GAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

                                CDR3
                                -----
217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A S D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A V F Y C A R D W P E Q Y Y N G H
    ACG GCT GTG TTT TAC TGT GCG AGA GAC TGG CCT GAG GGC TAC TAC AAC GGC ATG

                                CDR3
                                -----
325 D V W G Q G T T V T V S S
    GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

FIGURA 3B

VK 2G1 anti-IP10

segmento V: A27

segmento J: JK3

```

1      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
55      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
109     Y Q Q K P Q Q A P R L L I Y G A S S
      TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR3
163     R A T G I P D R F S G S G S G T D F
      AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
217     T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
      ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
271     Q Y G S S P P F T F G P G T K V D I
      CAG TAT GGT AGC TCA CCT CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC

325     K
      AAA

```

FIGURA 4A

VH 3C4 anti-IP10

segmento V: 5-51
 segmento D: D2-15
 segmento J: JH1

```

1      E V Q L V Q S G A E V K X P G E S L
      CAG GTG CAG CTG CTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                -----
35     K I S C K G S G Y N F P S Y W I G W
      AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AAC TTT CCC AGC TAC TGG ATC GGC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V R Q M P G K G L E W M G V I S P G
      CTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG GTC ATC TCT CCT GGT

                                CDR2
                                -----
163    D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAA GTC ACC ATC TCA GCC

217    D R S I S T A Y L Q W S S L K A S D
      GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                -----
271    T A M Y Y C A R G Y C S G G S C Y P
      ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA GGA TAT TGT AGT GGT GGT AGC TGC TAC CCA

                                CDR3
                                -----
325    F F Q Y W G Q G T L V T V S S
      TTC TTC CAG TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCC

```


FIGURA 4B

VK 3C4 anti-IP10

segmento V: L18
segmento J: JK4

```

1   A I Q L T Q S F S S L S A S V G D R
   GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
55  V T I T C R A S Q G I S S R L A W Y
   GTC ACC ATC ACT TGC CCG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
109 Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
   CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

   CDR2
   -----
163 E S G V P S R P S G S G S G T D F T
   GAA AGT GGG GTC CCA TCA ACG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217 L T I S S L Q P R D F A T Y Y C Q Q
   CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

   CDR3
   -----
271 P D S F P H T P G G G T K V E I K
   TTT GAT AGT TTC CCT CAC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

FIGURA 5A

VH 6A5 anti-IP10

segmento V: 3-33
 segmento D: 3-10
 segmento J: JH6b

```

1   Q M Q L V E S G G G V V Q P G R S L
    CAA ATG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
55  R L S C T A S G P T F S N N G H H W
    AGA CTC TCC TGT ACA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC AAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
109 V R Q A P G K G L E H V A V I W F D
    GTC CQC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TTT GAT

                                CDR3
163 G H N K F Y V D S V K G R F T I S R
    GGA ATG AAT AAA TTC TAT GTA GAC TCC GTG ARG GCG CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L E H N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG GAA ATG AAC ACC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
271 T A I Y Y C A R E G D G S G I V Y Y
    ACG GCT ATA TAT TAC TGT GCG AGA GAA GGG GAT GGT TCG GGG ATT TAT TAC TAC

                                CDR3
325 Y G M D V N G Q G T T V T V S S
    TAC GGT ATG GAC GTC TGG GCC CAA GCG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

FIGURA 5B

VK 6A5 anti-IP10

segmento V: A27
segmento J: JK3

```
1   E I V L T Q S P S T L S L S P G E R  
    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA  
                                     CDR1  
55   A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W  
    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAT TTA GCC TGG  
                                     CDR2  
109  Y Q Q K P G Q A P R L L I Y Q A S S  
    TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC  
    CDR2  
163  R A T G I P D R P S G S G S G T D F  
    AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC  
                                     CDR3  
217  T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q  
    ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TOT CAG  
    CDR3  
271  Q Y G S S P I P T F G P G T R V D I  
    CAG TAT GGT AGC TCA CCT ATA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC  
325  K  
    AAA
```

FIGURA 6A

VH 6A8 anti-IP10

segmento V: 3-33
 segmento D: indeterminado
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
55  R L S C T A S G F T F S T Y G M H W
    AGA CTC TCC TGT ACA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT ACC TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
109 V R Q A P G K G L E W V A I I W F D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA ATT ATA TGG TTC GAT

                                CDR3
163 G S N E D Y A A S V K G R F T I S R
    GGA AGT AAT GAA GAT TAT GCA GCC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
271 T A V Y Y C A R E G D G S S L Y Y Y
    ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG GGG GAT GGG AGC TCC TTA TAC TAC TAC

                                CDR3
325 Y G M D V W G Q G T T V T V S S
    TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

FIGURA 6B

VK 6A8 anti-IP10

segmento V: A27
segmento J: JK4

```
1   E V V L T Q S P G T L S L S P G E R
    GAA GTT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
    A T L S C R A S Q S I S S G Y L A W
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC GGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
    Y Q Q R F G Q A P R L L I Y G A S S
109  TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

    CDR2
    R A T G I P D R P S G S G S G T D F
163  AAG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

    CDR3
    T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217  ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

    CDR3
    Q Y G S S P T F G G G T K V E I K
271  CAG TAT GGT AGC TCA CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
```

FIGURA 7A

VH 6B10 anti-IP10

segmento V: 3-30.3
 segmento D: 5-12
 segmento J: JH4b

```

      Q V Q L V E S G G G V V Q F G R S L
1  CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                     CDR1
                                     -----
      R L S C A A S G F T F S N S A M H W
55  AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TCT GCT ATG CAC TGG

                                     CDR2
                                     -----
      V R Q A F G K G L E W V A L I P P D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA CCA TTT GAT

      CDR2
      -----
      G Y N R Y Y A D S V K G R F T I S R
163 GGA TAC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

                                     CDR3
                                     -----
      T A V Y Y C A R E G G Y T G Y D G G
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGC GCG AGA GAA GGT GGA TAT ACT GGC TAC GAT GGG GGA

      CDR3
      -----
      F D Y W G Q G I L V T V S S
325 TTT GAC TAT TGG GGC CAG GGA ATC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 7B

VK 6B10 anti-IP10

segmento V: L6
segmento J: JK2

```

1   E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
    GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55  A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
    GCC ACC CTC TCC TCC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
109 Q Q K P Q Q A P R L L I Y D A S N R
    CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

    CDR2
    -----
163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
    GGC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
    CTC ACC ATC AGC AGC CTA CAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

    CDR3
    -----
271 R S N W P P Y T P Q Q G T K L E I K
    CGT AGC AAC TGG CCT CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

```

FIGURA 8A

VH 7C10 anti-IP10

segmento V: 3-33
 segmento D: 3-10
 segmento J: JH4b

```

1   Q V Q L V E S Q G G V V Q P G R S L
    CAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
55  R L S C A A S G F T F S H S G H H W
    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TCT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
109 V R Q A F G K G L E W V A V I D Y D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA GAC TAT GAT

                                CDR2
163 G I I Q Y Y A D S V K G R P T I S R
    GGA ATT ATT CAA TAC TAT GCC GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q I H S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATA AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
271 T A V Y Y C A T E R G T R Y Y G S G
    ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACA GAG AAG GGC ACG CAT TAC TAT GGT TCG GGG

                                CDR3
325 S F D Y W G Q G T L V T V S S
    AGT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```


FIGURA 8B

VK 7C10 anti-IP10

segmento V: L15
segmento J: JK4

```

1   D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
55  V T I T C R A S Q Q I S S W L A W Y
    GTC ACC ATC ACT TGT CCG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
    CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

    CDR2
163 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
    CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
    CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

    CDR3
271 Y N S Y P P T F G G G T K V E I K
    TAT AAT AGT TAC CCT CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

FIGURA 9A

VH 8F6 anti-IP10

segmento V: 3-30.3
 segmento D: 6-13
 segmento J: JH4b

Q V Q L V D S G G V V Q P C R S L
 1 CAG GTG CAA CTG GTG GAC TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

CDR1

R L S C A A S G F T F N T Y G N H W
 55 AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTC AAT ACC TAT GGC ATG CAC TGG

CDR2

V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D
 109 CTC CCC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG CTC GCA GTT ATA TCA TAT GAT

CDR2

G I I K H Y A D S V R G R F T I T R
 163 GGA ATC ATT AAA CAC TAC GCC GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATA ACC AGA

D N S K N M V H L Q M N S L R A E D
 217 GAC AAT TCC AAG AAC ATG GTG CAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

CDR3

T A V Y Y C A R D S S S W Y V Y F D
 271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT AGC AGC AGC TGG TAC GTC TAC TTT GAC

CDR3

Y W G Q G T L V T V S S
 325 TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

FIGURA 9B

VK 8F6 anti-IP10

segmento V: L6
segmento J: JK1

```
      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR1
      -----
      A T L S C R A S Q S V S S Y V A W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT ACC AGC TAC GTA GCC TGG TAC

      CDR2
      -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G I F A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

      CDR3
      -----
      L T I S S L E P E D F A I Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA ATT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      R S N S P P W T F G Q G T K V E I K
271 CGT ACC AAC TCG CCT CCG TGG ACC TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

FIGURA 10A

VH 10A12 anti-IP10

segmento V: 3-33
 segmento D: indeterminado
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P C R S L
    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
55  R L S C A A S G F T F S N C G M H W
    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TGT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
109 V R Q A P G K G L E N V A L I G F D
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA GGG TTT GAT

                                CDR2
163 G I N E Y Y A D S V K G R F T I S R
    CGA ATT AAT GAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GGC GAG GAC

                                CDR3
271 T A V Y Y C A R D W P E G Y Y N G M
    ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG AGA GAC TGG CCT GAG GGC TAC TAC AAC GGC ATG

                                CDR3
325 D V W G Q G T T V T V S S
    GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 10B

VK 10A12 anti-IP10

segmento V: A27
segmento J: JK3

```

1      E I V L T O S P G T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
55      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC ACC ACC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
109     Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
      TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
163     R A T G I P D R F S G S G S G T D P
      AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

      CDR3
217     T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
      ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
271     Q Y G S S P P F T F G F G T K V D I
      CAG TAT GGT AGC TCA CCT CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC

325     K
      AAA

```

FIGURA 11A

VH 13C4 anti-IP10

segmento V: 4-61
 segmento D: 3-10
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L Q S S G P G L V K P S E T L
    CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
55   S L T C T I S G G S V S S G D Y Y W
    TCC CTC ACC TGC ACT ATC TCT GGT GGC TCC GTC AGC AGT GGT GAT TAC TAC TGG

    CDR1                                CDR2
109  S W I R Q P P G K G L E W I G N I Y
    AGC TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG AAC ATC TAT

                                CDR2
163  Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S
    TAC AGT GGG AGC ACC AAC TAC AAC CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCG

217  V D T S K N Q P S L K L S S V T A A
    GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCT GCG

                                CDR3
271  D T A V Y Y C A R G G G T V V R G I
    GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGG GGT ACT GTG GTT CGG GGA ATT

                                CDR3
325  I H Y Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V
    ATC CAT TAC TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC

379  T V S S
    ACC GTC TCC TCA
  
```

FIGURA 11B

VK 13C4 anti-IP10

segmento V: A27

segmento J: JK2

```

1   E I V L T Q S P G T L S L S F G E R
   GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
55   A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
   GCC ACC CTC TCC TCC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR3
109  Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
   TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

                                CDR2
163  R A T G I P D R F S G S G S G T D F
   AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
217  T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
   ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                                CDR3
271  Q Y G S S P E Y T F G Q G T K L E I
   CAG TAT GGT ACC TCA CCG GAG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC

325  K
   AAA

```

3 - 33 linha germinativa	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L K L S C A A S G P T F S S Y G M H	CDR1
6A5	M	- - - - - T - - - - - N N - -
6A8	-	- - - - - T - - - - - T - - - -
2G1	-	- - - - - - - - - - - - - - - -
10A12	-	- - - - - - - - - - - - - - - -
1E1	-	- - - - - N - - - - - - - - - -
7C10	-	- - - - - - - - - - - - - - - -
1D4	-	- - - - - - - - - - - - - - - -

1 - 33 linha germinativa	W V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y V A D S V K G R F T I	CDR2
6A5	-	- - - - - - - - - - - F - - - - - V - - - -
6A8	-	- - - - - - - - - - - I - - - - - E D - - - - - A - - - -
2G1	-	- - - - - - - - - - - L Q - - - - - I E - - - - - - - - -
10A12	-	- - - - - - - - - - - L G F - - - - - I E - - - - - - - - -
1E1	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
7C10	-	- - - - - - - - - - - D - - - - - I I Q - - - - - D - - - - - V - - - -
1D4	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - F E - - - - - I - - - - - - - - -

3 - 33 linha germinativa	S R D N S K N T L Y L Q M N S L K A E D T A V Y V C A R	CDR3
6A5	-	- - - - - - - - - - - I - - - - - E G D G S G I - - - - - S L - - - -
6A8	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2G1	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
10A12	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
1E1	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
7C10	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
1D4	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

3 - 33 linha germinativa	Y Y Y Y G M D V N G Q G T T V T V S S	CDR3
6A5	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
6A8	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2G1	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
10A12	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
1E1	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
7C10	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
1D4	-	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

FIGURA 12

3-30.3 linha germinativa
 6B10 VH
 8F6 VH

Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	H	V	R	Q
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	T	-	G	-	-	-	

CDR1

3-30.3 linha germinativa
 6B10 VL
 8F6 VH

A	P	G	K	G	L	E	N	V	A	V	I	S	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	P	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	I	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	M		

CDR2

3-30.3 linha germinativa
 6B10 VL
 8F6 VH

L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
V	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

CDR3

-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

6B10 VH
 8F6 VH

V	T	V	S	S
-	-	-	-	-

FIGURA 13

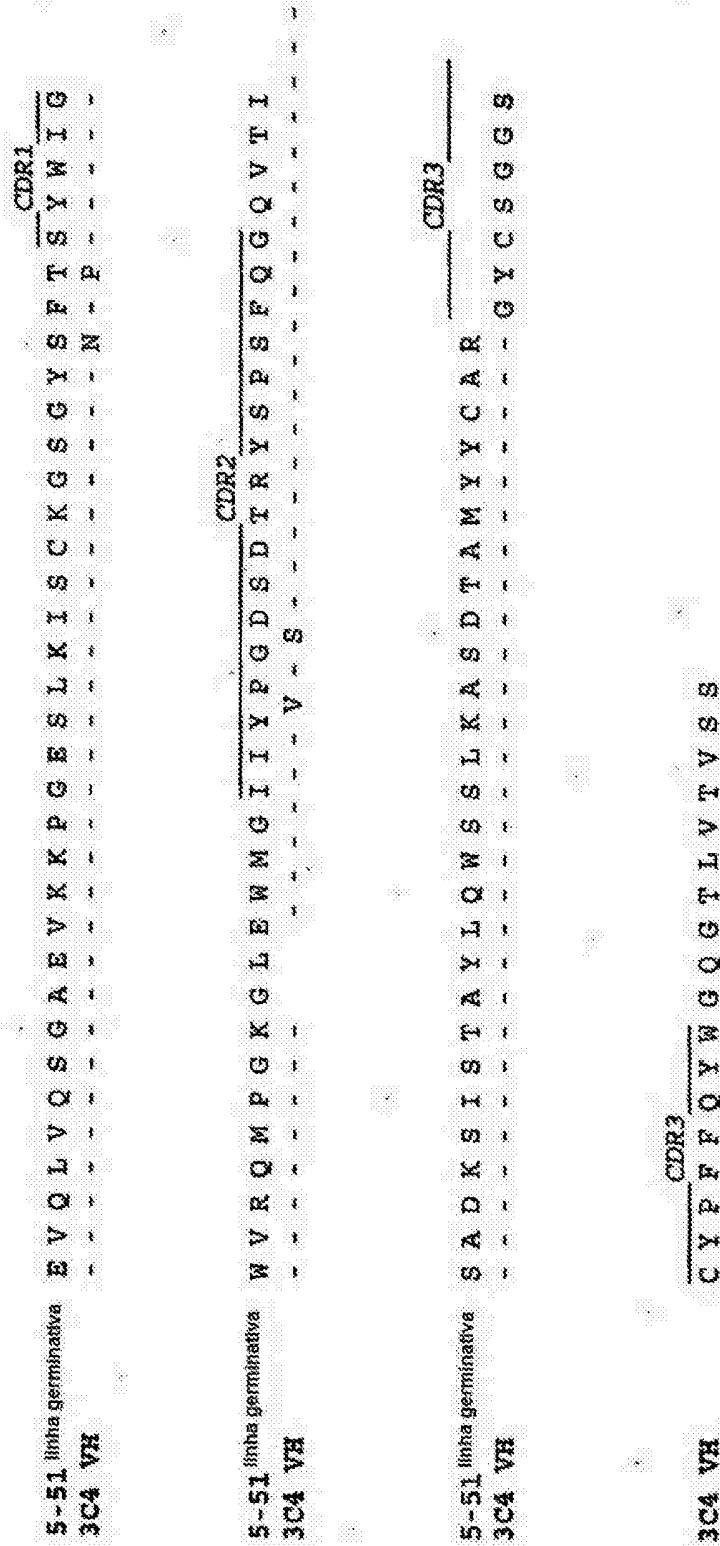


FIGURA 14

4-61 linha germinativa: Q V Q L Q E S Q P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S V S S G S Y Y W S W I R Q P
13C4 VH: - - - - - I - - - - - D - - - - -

CDR1

4-61 linha germinativa: P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L
13C4 VH: - - - - - N - - - - - - - - - - - - - - - -

CDR2

4-61 linha germinativa: S S V T A A D T A V Y Y C A R
13C4 VH: - - - - - G G G T V V R G I I H Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S

CDR3

FIGURA 15

