

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.05.22	(73) Titular(es): CURE TECH LTD.	
(30) Prioridade(s): 2002.05.23 IL 14982002	HAYARKON STREET 42 81227 YAVNE	IL
(43) Data de publicação do pedido: 2005.09.21	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.07.08	BRITTA HARDY	IL
214/2015	STEVEN TARRAN JONES	GB
	LEAH KLAPPER	IL
	(74) Mandatário:	
	ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO	PT
	RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA	

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS IMUNOMODULADORES PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA NEOPLÁSICA OU IMUNODEFICIÊNCIA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UM ANTICORPO MONOCLONAL HUMANIZADO TENDO EFEITOS IMUNOESTIMULADORES. ESTE ANTICORPO LIGA-SE ESPECIFICAMENTE A CÉLULAS LINFOBLASTÓIDES B, INDUZ PROLIFERAÇÃO E ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO E É CAPAZ DE INDUZIR UM EFEITO ANTITUMORAL APÓS ADMINISTRAÇÃO A INDIVÍDUOS QUE SOFREM DE CANCRO.

RESUMO

"ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS IMUNOMODULADORES PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA NEOPLÁSICA OU IMUNODEFICIÊNCIA"

A presente invenção proporciona um anticorpo monoclonal humanizado tendo efeitos imunoestimuladores. Este anticorpo liga-se especificamente a células linfoblastóides B, induz proliferação e ativação de linfócitos de sangue periférico e é capaz de induzir um efeito antitumoral após administração a indivíduos que sofrem de cancro.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS IMUNOMODULADORES PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA NEOPLÁSICA OU IMUNODEFICIÊNCIA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo da imunoterapia e mais especificamente refere-se a anticorpos monoclonais humanizados úteis para terapia de uma variedade de indicações, particularmente no tratamento do cancro.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O cancro nas suas diferentes formas é uma importante causa de morte nos humanos. Os tratamentos terapêuticos mais amplamente utilizados do cancro são a cirurgia, radiação e quimioterapia. O aumento rápido do conhecimento nos últimos anos acerca das bases moleculares e celulares da regulação imune, particularmente ao nível de respostas de células T, proporciona um novo arsenal de abordagens imunoterapêuticas, incluindo o desenvolvimento de vacinas tumorais. Foi demonstrado que determinados anticorpos monoclonais (mAbs) têm atividade imunomoduladora, incluindo a capacidade para se ligarem a determinantes na superfície de células T e para induzirem proliferação, ativação ou diferenciação destas células.

Os anticorpos monoclonais derivados de hibridomas de murganho contêm extensões substanciais da SEQuências de

aminoácidos que são imunogénicas quando injetadas num doente humano, eliminando frequentemente a eficácia terapêutica do anticorpo após um tratamento inicial. Embora a produção dos denominados "anticorpos quiméricos" (*i. e.*, regiões variáveis de murganho ligadas a regiões constantes humanas) provou ser um tanto ao quanto bem-sucedida, um impedimento significativo de imunogenicidade permanece.

A tecnologia de ADN recombinante tem sido utilizada para produzir imunoglobulinas contendo regiões estruturais humanas (FR) combinadas com regiões determinantes de complementaridade (CDR) a partir de uma imunoglobulina dadora de murganho ou rato. Estas novas proteínas são denominadas imunoglobulinas "reformuladas" ou "humanizadas" e o processo através do qual a imunoglobulina dadora é convertida numa imunoglobulina de tipo humano através da combinação das suas CDR com uma estrutura humana é denominado "humanização". Os anticorpos humanizados são importantes porque se ligam ao mesmo antigénio que os anticorpos originais, mas são menos imunogénicos quando injetados em humanos.

A Patente U.S. Nº 6294654 divulga uma molécula de imunoglobulina modificada ou um seu fragmento ou parte funcional (Ig), que tem um péptido antigénico estranho à Ig incorporada e um ou mais ansas não CDR e em que os principais aspetos gerais da estrutura do domínio constante são mantidos. É ainda divulgada a utilização do anticorpo modificado para utilização terapêutica ou profilática.

A Patente U.S. Nº 6074635 divulga um método para ativação independente de antigénio de células T *in vitro* compreendendo a colocação em contato de células T na ausência de antigénio com uma combinação de, pelo menos, duas citocinas selecionadas do

grupo consistindo de interleucina-2, interleucina-6 e fator alfa de necrose tumoral ou os seus fragmentos funcionalmente equivalentes.

A Patente U.S. Nº 5658741 divulga um método para induzir a ativação e proliferação de células T, compreendendo o referido método: (a) conjugar uma pluralidade de anticorpos monoclonais específicos de células T a uma molécula de aminodextrano tendo 7-20% em peso de grupos amina e um peso molecular de, pelo menos, 100000 daltons, em que a razão molar dos referidos anticorpos para o referido aminodextrano é maior ou igual a dois; e (b) fazer reagir o referido conjugado com uma amostra contendo as referidas células T para efetuar a ligação dos referidos anticorpos conjugados às referidas células T para induzir a ativação e proliferação das referidas células T.

A Patente U.S. 5585089 de Queen et al. divulga uma imunoglobulina humanizada tendo regiões determinantes de complementaridade (CDR) de uma imunoglobulina dadora e estruturas de região variável de cadeia pesada e leve das cadeias pesadas e leves de imunoglobulina aceitadora humana, cuja imunoglobulina humanizada liga-se especificamente a um antígeno com uma constante de afinidade de, pelo menos, 10^7 M^{-1} e não maior do que cerca de quatro vezes a da imunoglobulina dadora, em que a referida imunoglobulina humanizada compreende aminoácidos da estrutura de imunoglobulina dadora fora das CDR de Kabat e Chothia, em que os aminoácidos dadores substituem os aminoácidos correspondentes nas estruturas de cadeia pesada ou leve de imunoglobulina aceitadora, e cada dos referidos aminoácidos dadores: (I) está adjacente a uma CDR na sequência de imunoglobulina dadora, ou (II) contém um átomo dentro de uma distância de 4 Å de uma CDR na referida imunoglobulina humanizada.

A Patente U.S. 5225539 de Winter, divulga um anticorpo alterado ou um seu fragmento de ligação a antigénio, em que um domínio variável do anticorpo ou fragmento de ligação a antigénio tem as regiões de estrutura do domínio variável da cadeia pesada ou leve de uma primeira imunoglobulina e as regiões determinantes de complementaridade do domínio variável da cadeia pesada ou leve de uma segunda imunoglobulina, em que o referido domínio variável da cadeia pesada ou leve da segunda imunoglobulina é diferente do referido domínio variável da cadeia pesada ou leve da primeira imunoglobulina em especificidade de ligação ao antigénio, afinidade de ligação ao antigénio, espécie, classe ou subclasse.

As patentes U.S. 5585089 e U.S. 5225539 não proporcionam ferramentas suficientes nem descrição detalhada para realizar a síntese de um anticorpo alterado, particularmente um anticorpo humanizado, por um especialista na técnica.

A Patente U.S. Nº 5897862 de um dos requerentes da presente invenção, a qual é aqui incorporada por referência, divulga um anticorpo monoclonal ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, em que o anticorpo monoclonal: (i) é excretado pela linha celular de hibridoma depositada na Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), sob o Nº de Acesso I-1397, ou (ii) reconhece o mesmo epitopo antigénico que o anticorpo em (i). O anticorpo monoclonal divulgado no documento US 5897862 é dirigido contra células "Daudi", uma linha celular linfoblastóide B humana, e foi mostrado que estimula linfócitos de murino e células T de sangue periférico humano (Hardi *et al.*, Cell Immunol. 118:22, 1989). Este anticorpo de murino é também aqui denominado mais à frente mBAT-1. mBAT-1 também apresenta efeitos antitumorais e imunoestimuladores em vários tipos de

tumores (Hardi *et al.*, Int. J. Oncol. 19:897, 2001) incluindo tumores de origem humana (Hardi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5756, 1997).

O Pedido de Patente Internacional WO 00/58363 de um dos requerentes da presente invenção, divulga um anticorpo monoclonal que tem uma região variável compreendendo a região variável da cadeia pesada e/ou a região variável da cadeia leve Kapa de mBAT-1 ou uma região variável da cadeia pesada e/ou uma região variável da cadeia leve de Kapa tendo, pelo menos, 70% de identidade com a região variável da cadeia pesada e/ou a região variável da cadeia leve Kapa de mBAT-1.

Em parte alguma da técnica anterior é ensinado ou sugerido que um anticorpo monoclonal humanizado compreendendo CDR de uma origem de murino e FR de uma origem humana pode induzir uma resposta imune e pode, ainda, apresentar atividade anticancerígena. Além disso, existe uma necessidade não satisfeita para métodos de confiança para conceber anticorpos humanizados funcionais, como é bem conhecido na técnica, que a síntese do anticorpo humanizado da presente invenção não pode ser previsivelmente ou rotineiramente baseada na técnica anterior.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É um objetivo da presente invenção proporcionar um anticorpo imunomodulador monoclonal humanizado, também aqui denominado adiante hBAT-1, que se liga a células linfoblastóides B e induz proliferação e ativação de linfócitos de sangue periférico. O referido hBAT-1 é baseado no anticorpo imunomodulador monoclonal de murino previamente conhecido, também aqui denominado mBAT-1,

o qual se liga a células linfoblastóides B e induz proliferação e ativação de linfócitos de sangue periférico e induz ainda um efeito antitumoral quando injetado num indivíduo que tem tumor.

A presente divulgação proporciona uma descrição detalhada do processo de humanização de mBAT-1 em conjunto com a fundamentação para cada passo de síntese. Assim, a descrição do processo de humanização proporcionado na presente invenção é adequada para humanização de anticorpos BAT, além de mBAT-1, por um especialista na técnica.

A administração do anticorpo BAT-1 humanizado oferece um método para prevenção terapêutica, detecção ou tratamento do cancro. O tratamento de um indivíduo com a sua necessidade, com a forma humanizada do anticorpo BAT-1, como proporcionado pela presente invenção, é consideravelmente mais eficiente do que o tratamento com um anticorpo BAT-1 quimérico e evita respostas imunogénicas adversas.

A presente invenção é baseada, em parte, na inesperada observação de que o anticorpo BAT-1 humanizado parece induzir um maior efeito antitumoral do que o induzido pelo anticorpo BAT-1 de murino parental.

De acordo com um primeiro aspeto, a presente invenção proporciona um anticorpo monoclonal humanizado tendo, pelo menos, uma região determinante de complementaridade (CDR) do anticorpo monoclonal de murino BAT-1 (mBAT-1) e uma região de estrutura (FR) derivada de uma imunoglobulina humana aceitadora, em que o anticorpo humanizado retém a atividade antitumoral do anticorpo monoclonal mBAT-1 e é menos imunogénico num indivíduo humano do que o referido anticorpo de murino.

De acordo com uma forma de realização, o anticorpo humanizado induz um maior efeito antitumoral do que aquele induzido pelo anticorpo BAT-1 de murino parental .

De acordo com outra forma de realização, o anticorpo humanizado compreende as regiões determinantes de complementaridade (CDR) do anticorpo monoclonal de murino BAT-1 (mBAT-1), em que o anticorpo humanizado compreende:

a. regiões variáveis da cadeia leve da fórmula:

$FR_{L1}-CDR_{L1}-FR_{L2}-CDR_{L2}-FR_{L3}-CDR_{L3}-FR_{L4}$, em que cada FR é independentemente uma região de estrutura de um anticorpo humano e cada CDR é uma região determinante de complementaridade, derivadas de BAT-1;

b. regiões variáveis da cadeia pesada da fórmula:

$FR_{H1}-CDR_{H1}-FR_{H2}-CDR_{H2}-FR_{H3}-CDR_{H3}-FR_{H4}$, em que cada FR é separadamente uma região de estrutura de um anticorpo humano e cada CDR é uma região determinante de complementaridade, de mBAT-1.

De acordo com um segundo aspeto, a presente invenção proporciona um anticorpo monoclonal humanizado tendo uma região Fab geneticamente modificada compreendendo as regiões determinantes de complementaridade (CDR) do anticorpo monoclonal de murino BAT-1 (mBAT-1), em que o anticorpo geneticamente modificado retém a atividade biológica do referido mBAT-1 e em que o referido anticorpo monoclonal geneticamente modificado compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de:

(i) uma região variável da cadeia pesada compreendendo as sequências de aminoácidos de: CDR_{H1} (SEQ ID N°: 12); CDR_{H2} (SEQ ID N°: 13); CDR_{H3} (SEQ ID N°: 14); e uma região variável da cadeia leve compreendendo as sequências de aminoácidos de CDR_{L1} (SEQ ID N°: 9); CDR_{L2} (SEQ ID N°: 10); CDR_{L3} (SEQ ID N°: 11);

(ii) regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve compreendendo as sequências de aminoácidos tendo mais do que cerca de 80 por cento de semelhança com a totalidade ou parte das sequências de: CDR_{H1} (SEQ ID N°: 12); CDR_{H2} (SEQ ID N°: 13); CDR_{H3} (SEQ ID N°: 14); CDR_{L1} (SEQ ID N°: 9); CDR_{L2} (SEQ ID N°: 10); CDR_{L3} (SEQ ID N°: 11);

(iii) um anticorpo de (i) ou (ii) em que um ou mais resíduos de aminoácidos foi adicionado, suprimido, substituído ou modificado quimicamente, sem afetar substancialmente a especificidade biológica ou a atividade de ligação do anticorpo.

De acordo com uma forma de realização, as regiões de estrutura (FR) são derivadas de um anticorpo humano.

De acordo com outra forma de realização, o anticorpo monoclonal humanizado compreende regiões determinantes de complementaridade (CDR) do anticorpo monoclonal de murino BAT-1 (mBAT-1), em que o referido anticorpo humanizado compreende:

a. regiões variáveis da cadeia leve da fórmula:

FR_{L1}-CDR_{L1}-FR_{L2}-CDR_{L2}-FR_{L3}-CDR_{L3}-FR_{L4}, em que cada FR é independentemente uma região de estrutura de um anticorpo humano e cada CDR é uma região determinante de complementaridade, em que a sequência de aminoácidos de CDR_{L1} é SARSSVSYMH (SEQ ID N°: 9); CDR_{L2} é RTSNLAS (SEQ ID N°: 10); CDR_{L3} é QQRSSFPLT (SEQ ID N°: 11);

b. as regiões variáveis da cadeia pesada da fórmula:

FR_{H1}-CDR_{H1}-FR_{H2}-CDR_{H2}-FR_{H3}-CDR_{H3}-FR_{H4}, em que cada FR é, separadamente, uma região de estrutura de um anticorpo humano e cada CDR é uma região determinante de complementaridade, em que a sequência de aminoácidos de: CDR_{H1} é NYGMN (SEQ ID N°: 12); CDR_{H2} é WINTDSGESTYAEFFKG (SEQ ID N°: 13); CDR_{H3} é VGYDALDY (SEQ ID N°: 14).

Ainda de acordo com outra forma de realização, o referido anticorpo humanizado induz um maior efeito antitumor do que o anticorpo BAT-1 monoclonal de murino; ou o referido anticorpo humanizado induz um maior efeito antimetastático do que o anticorpo BAT-1 monoclonal de murino; ou as FR da região variável da cadeia pesada são derivadas da FR da região variável da cadeia pesada do anticorpo hsinhvl295 humano; ou as FR da região variável da cadeia leve kapa são baseadas nas FR da região variável da cadeia leve kapa do anticorpo TEL9 humano; ou tem uma região constante kapa humana; ou o anticorpo é ainda marcado com um marcador de detecção, imobilizado numa fase sólida, ou conjugada com um composto heterólogo; ou as regiões variáveis da cadeia leve do anticorpo monoclonal humanizado são selecionadas do grupo consistindo de: BATR_{K_A} (SEQ ID N°: 15), BATR_{K_B} (SEQ ID N°: 16), BATR_{K_C} (SEQ ID N°: 17), BATR_{K_D} (SEQ ID N°: 18), e as regiões variáveis da cadeia pesada são selecionadas do grupo consistindo de: BATR_{H_A} (SEQ ID N°: 20), BATR_{H_B} (SEQ ID N°: 21), BATR_{H_C} (SEQ ID N°: 22), BATR_{H_D} (SEQ ID N°: 23) ou BATR_{H_E} (SEQ ID N°: 24); ou as regiões variáveis do anticorpo monoclonal humanizado são selecionadas do grupo consistindo de: BATR_{H_A}/BATR_{K_A} (SEQ ID N°: 20/SEQ ID N°: 15), BATR_{H_B}/BATR_{K_A} (SEQ ID N°: 21/SEQ ID N°: 15), BATR_{H_B}/BATR_{K_B} (SEQ ID N°: 21/SEQ ID N°: 16), BATR_{H_C}/BATR_{K_B} (SEQ ID N°: 22/SEQ ID N°: 16), BATR_{H_B}/BATR_{K_D} (SEQ ID N°: 21/SEQ ID N°: 18) ou BATR_{H_C}/BATR_{K_D} (SEQ ID N°: 22/SEQ ID N°: 18).

Ainda de acordo com outra forma de realização, o anticorpo é um anticorpo de tamanho total.

Ainda de acordo com outra forma de realização, o anticorpo é do isotipo IgG.

Ainda de acordo com outra forma de realização, a referida subclasse de isotipo é selecionada de IgG₁ ou IgG₄.

De acordo com um terceiro aspeto, a presente invenção proporciona um fragmento de anticorpo derivado do anticorpo humanizado como acima indicado, em que o fragmento de anticorpo é selecionado do grupo consistindo de: Fv, F(ab'), F(ab')₂, um anticorpo de cadeia simples.

De acordo com uma forma de realização, o anticorpo humanizado é gerado por tecnologia de ADN recombinante, utilizando enxerto de CDR.

De acordo com um quarto aspeto, a presente invenção proporciona uma construção polinucleotídica isolada codificando qualquer dos anticorpos monoclonais, como mencionados acima ou os seus fragmentos.

De acordo com uma forma de realização, a construção polinucleotídica isolada codifica uma região variável da cadeia da leve kapa selecionada do grupo consistindo de: SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18.

De acordo com outra forma de realização, a construção polinucleotídica isolada é selecionada do grupo consistindo de: SEQ ID N°: 87, SEQ ID N°: 88, SEQ ID N°: 89.

Ainda de acordo com outra forma de realização, a construção polinucleotídica isolada codifica uma região variável da cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24.

De acordo com ainda outra forma de realização, a construção polinucleotídica isolada é selecionada do grupo consistindo de: SEQ ID N°: 90, SEQ ID N°: 91, SEQ ID N°: 92.

De acordo com um quinto aspecto, a presente invenção proporciona um vetor compreendendo qualquer dos polinucleótidos acima.

De acordo com uma forma de realização, o vetor compreende ainda, pelo menos, uma sequência de polinucleótidos que codifica um componente selecionado do grupo consistindo de: um promotor ligado operativamente ao polinucleótido que codifica o anticorpo, um ou mais genes de resistência, uma sequência de Kozak, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores de seleção, um elemento intensificador, terminador de transcrição, um péptido de sinal, região constante kapa humana genômica, região constante de IgG humana genômica.

De acordo com outra forma de realização, o vetor é um plasmídeo ou um vírus. De um modo preferido, o vetor é selecionado do grupo compreendendo: pKN110, pG1D200, pG1KD210, pUC ou pBR322.

De acordo com ainda outra forma de realização, o vetor compreende a sequência de polinucleótidos da SEQ ID N°: 93.

De acordo com um sexto aspecto, a presente invenção proporciona uma célula hospedeira compreendendo o vetor acima.

De acordo com uma forma de realização, a célula hospedeira é capaz de expressar um anticorpo ou os seus fragmentos; ou é selecionada de eucariótica e procariótica; ou é selecionada do grupo consistindo de: células CHO, CHOd hfr , NSO, COS ou COS7.

De acordo com um sétimo aspecto, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo como um ingrediente ativo, o anticorpo acima ou os seus fragmentos de anticorpo.

De acordo com uma forma de realização, a composição farmacêutica compreende ainda um veículo, diluente ou estabilizador fisiologicamente aceitável.

De acordo com um oitavo aspecto, a presente invenção proporciona a utilização do anticorpo acima ou dos seus fragmentos de anticorpo, para a preparação de um medicamento para o tratamento do cancro.

De acordo com uma forma de realização, o cancro é selecionado de melanoma, tumores pulmonares, cancro colorretal ou metástases hepáticas.

De acordo com um nono aspecto, a presente invenção proporciona a utilização do anticorpo monoclonal humanizado acima ou fragmentos de anticorpo, para a preparação de uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz do referido anticorpo ou fragmentos de anticorpo, para induzir atividade proliferativa, citolítica ou estimuladora de células T CD4+.

De acordo com um décimo aspecto, a presente invenção proporciona a utilização do anticorpo monoclonal humanizado acima ou fragmentos de anticorpo, para a preparação de uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz do referido anticorpo ou fragmentos de anticorpo, para aumentar a sobrevivência de células T CD4+.

De acordo com uma forma de realização, a composição farmacêutica é dirigida ao tratamento de uma imunodeficiência genética ou adquirida.

De acordo com outra forma de realização, a composição farmacêutica é dirigida ao tratamento das fases iniciais da infecção por HIV.

Ainda de acordo com outra forma de realização, a composição farmacêutica é dirigida ao tratamento da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida).

De acordo com ainda outra forma de realização, a composição farmacêutica é dirigida ao tratamento de doentes que têm um contagem sanguínea que mostra uma diminuição em células T CD4+.

De acordo com um décimo primeiro aspeto, a presente invenção proporciona um método para produzir o anticorpo acima. O método compreende os passos de (i) transfetar de uma célula hospedeira com um vetor compreendendo uma sequência de polinucleótidos que codifica o referido anticorpo, ou cotransfecção da célula hospedeira com 2 vetores, cada compreendendo uma sequência de polinucleótidos que codifica as regiões da cadeia pesada ou leve do referido anticorpo; (ii) cultivar a célula hospedeira de (i) de modo que o referido anticorpo seja expresso; e (iii) recuperar o anticorpo a partir do hospedeiro.

Outros objetivos, características e vantagens da presente invenção tornar-se-ão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e reivindicações anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A **FIGURA 1** mostra as sequências de ADN e peptídicas da região variável da cadeia leve kapa (V_K) do anticorpo BAT-1 de murino.

A **FIGURA 2** descreve as classes canônicas de CDR na região V_K de BAT-1 de murino. "Classes canônicas de Chothia" indica onde foram utilizadas as classes canônicas como definidas por Chothia e seus colegas (Chothia *et al.*, 1987, 1989, 1992 *ibid*; Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol. 215:175, 1990), enquanto "classes canônicas de Martin" significa onde foram utilizadas as classes canônicas definidas por Martin e Tornton (Martin *et al.*, J. Mol. Biol. 263:800, 1996). Os resíduos da FR são destacados a negrito.

A **FIGURA 3** apresenta as sequências de ADN e peptídicas da região variável da cadeia pesada (V_H) do anticorpo BAT-1 de murino.

A **FIGURA 4** descreve as classes canônicas de CDR na região V_H de BAT-1 de murino. "Classes canônicas de Chothia" indica onde foram utilizadas as classes canônicas como definidas por Chothia e seus colegas (Chothia *et al.*, 1987, 1989, 1992 *ibid*; Tramontano *et al.*, *ibid*), enquanto "classes canônicas de Martin" significa onde foram utilizadas as classes canônicas definidas por Martin e Tornton (Martin *et al.*, *ibid*). Os resíduos da FR são destacados a negrito.

A **FIGURA 5** mostra as sequências de aminoácidos das várias versões da região V_K de BAT-1 humanizado que são propostas (SEQ ID Nº 15-18). Nos casos em que os resíduos da região V_K de

BAT-1 correspondem à sequência da região V_K de TEL9 é mostrado um ponto [.]. Nos casos em que nenhum aminoácido está presente numa posição de resíduo específica é mostrado um traço [-]. Nos casos em que um aminoácido nas FR de TEL9 é alterado na região V_K de BAT-1 humanizado, é destacado a negrito. As CDR são descritas através da utilização da nomenclatura [==L1==]. A numeração utilizada é de acordo com Kabat (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, 1991).

A **FIGURA 6** apresenta as sequências de aminoácidos das várias versões da região V_H de BAT-1 humanizado que são propostas (SEQ ID N° 20-24). Nos casos em que os resíduos da região V_H de BAT-1 correspondem às sequências da região V_H hsighv1295 humana é mostrado um ponto [.]. Nos casos em que nenhum aminoácido está presente numa posição de resíduo específica é mostrado um traço [-]. Nos casos em que um aminoácido nas FR de hsighv1295 é alterado na região V_H de BAT-1 humanizado, é destacado a negrito. As CDR são descritas através da utilização da nomenclatura [==H1==], enquanto [-----] denota parte da ansa estrutural de H1. A numeração utilizada é de acordo com Kabat (Kabat et al., *ibid*).

A **FIGURA 7** mostra as sequências de ADN (SEQ ID N° 87) e peptídicas (SEQ ID N° 15) da versão A (BATR_{K_A}) da região variável da cadeia leve kapa humana reformulada do anticorpo BAT-1 humanizado.

A **FIGURA 8** mostra as sequências de ADN (SEQ ID N° 88) e peptídicas (SEQ ID N° 16) da versão B (BATR_{K_B}) da região variável

da cadeia leve kapa humana reformulada do anticorpo BAT-1 humanizado.

A **FIGURA 9** apresenta as sequências de ADN (SEQ ID Nº 89) e peptídicas (SEQ ID Nº 18) da versão D (BATR_{K_D}) da região variável da cadeia leve kapa humana reformulada do anticorpo BAT-1 humanizado.

A **FIGURA 10** é uma representação esquemática da construção do vetor pKN110-BATR_{K_D}.

A **FIGURA 11** é uma representação esquemática da cassette da cadeia leve de BAT-1 introduzida em vetores de expressão da cadeia leve de BAT-1.

As **FIGURAS 12-14** não fazem parte da presente invenção.

A **FIGURA 15** é uma representação esquemática da construção do vetor pG1D110.BAT-1.RH_C.

A **FIGURA 16** é uma representação esquemática da cassette cadeia pesada de BAT-1 introduzida em vetores de expressão da cadeia pesada de BAT-1.

A **FIGURA 17** é uma representação esquemática do vetor de expressão de mamífero da cadeia pesada de imunoglobulina gama-1 pG1D200.

A **FIGURA 18** é uma representação esquemática do vetor de expressão simples pG1KD210.BAT-1.RHC/RKD (SEQ ID Nº 93).

A **FIGURA 19** é uma representação esquemática da cassete da cadeia pesada e leve $BATR\kappa_D/BATR\eta_C$ introduzida no vetor de expressão simples para a expressão do anticorpo BAT-1 completo.

A **FIGURA 20** mostra um ELISA de células Daudi da variante humanizada $BATR\eta_B/BATR\kappa_B$ contra anticorpo quimérico BAT-1.

A **FIGURA 21** mostra um ELISA de células Daudi das variantes humanizadas $BATR\eta_B/BATR\kappa_A$ e $BATR\eta_A/BATR\kappa_A$ contra o anticorpo quimérico BAT-1.

A **FIGURA 22** mostra um ELISA de células Daudi das variantes humanizadas $BATR\eta_C/BATR\kappa_B$ e $BATR\eta_C/BATR\kappa_D$ contra anticorpo quimérico BAT-1.

A **FIGURA 23** mostra um ELISA de células Daudi da variante humanizada $BATR\eta_B/BATR\kappa_D$ contra o anticorpo quimérico BAT-1.

A **FIGURA 24** apresenta curvas de ligação dependentes da dose para células Daudi do mAb BAT-1 de murino e do mAb $\gamma 1$ humanizado $BATR\eta_C/BATR\kappa_D$.

A **FIGURA 25** ilustra a atividade antimetastática dependente da dose do mAb $\gamma 1$ humanizado $BATR\eta_C/BATR\kappa_D$ (hBAT) em tumores pulmonares B16 de murino, em relação ao controlo (sem tratamento) e ao tratamento com o mAb BAT-1 de murino original. Todos os tratamentos foram administrados intravenosamente 14 dias após inoculação do tumor e os pulmões foram examinados 10 dias após o tratamento.

A **FIGURA 26** representa o efeito inibidor do mAb $\gamma 1$ humanizado $BATR\eta_C/BATR\kappa_D$ no melanoma humano (SK-28) em murganhos

SCID enxertados com linfócitos humanos. O efeito do BAT-1 humanizado no crescimento tumoral é comparado com o controle (sem tratamento) ou o tratamento com mAb BAT-1 de murino (mBAT-1).

A **FIGURA 27** demonstra a atividade antimetastática do mAb $\gamma 1$ humanizado BATRH_C/BATRK_D num Modelo de Tumor de Murino (HM7) implantado em murganhos BALB/c nude.

A **FIGURA 28** mostra a co-localização do mAb $\gamma 1$ humanizado BATRH_C/BATRK_D (hBAT) com CD4 (A) e CD8 (B) determinada por citometria de fluxo em linfócitos circunscritos.

A **FIGURA 29** apresenta a ligação do mAb $\gamma 1$ humanizado BATRH_C/BATRK_D aos marcadores celulares CD19 (A) e CD20 (B) de linfócitos B isolados a partir de um dador normal.

A **FIGURA 30** representa a ligação do mAb BAT humanizado a células T CD4⁺ não ativadas (dia 0, A; dia 5, C) e ativadas (2 dias, B; 5 dias, D).

A **FIGURA 31** mostra a ligação do mAb BAT humanizado a células T CD69⁺ ativadas com esferas conjugadas a anti-CD3 e anti-CD28 de um modo dependente da dose (sem ativação, A; 0,25 μ L, B; 0,5 μ L, C).

A **FIGURA 32** apresenta a co-localização do mAb $\gamma 1$ humanizado BATRH_C/BATRK_D com marcador CD25 de células T de um modo dependente do tempo: dia 0, A; dia 2 e dia 5 da ativação, B e D respetivamente; dia 5 sem ativação, C.

A **FIGURA 33** mostra a co-localização do mAb $\gamma 1$ humanizado BATRH_C/BATRK_D com marcador ligando-de-CD40 de células T de um modo dependente do tempo: dia 0, A; dia 1, dia 2 e dia 5 da ativação, B-C e E, respetivamente; dia 5 sem ativação, D.

A **FIGURA 34** descreve o aumento induzido por hBAT no número de células CD4+ viáveis, isoladas a partir de dois dadores separados (A e B).

A **FIGURA 35** apresenta a ligação de hBAT a linhas celulares Daudi (A) e Jurkat (B).

A **FIGURA 36** demonstra a ligação de hBAT a PBL de doentes cancerígenos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Definições

Por conveniência, são apresentados determinados termos utilizados na descrição, exemplos e reivindicações.

O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais amplo e cobre especificamente anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de tamanho total) e fragmentos de anticorpo desde que apresentem a atividade biológica desejada. Os "fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo de tamanho total, geralmente a sua região variável ou de ligação a antigénio. Os exemplos de fragmentos de anticorpo incluem Fab, Fab', F(ab'), e fragmentos Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia simples; e

anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

A expressão "anticorpo monoclonal" como aqui utilizada, refere-se a anticorpos que são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único local antigénico. Os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser feitos por métodos de ADN recombinante (ver, e. g., Patente U.S. 4816567 de Cabilly *et al.*).

A expressão resíduos de "região de estrutura" ou "FR" são aqueles resíduos de domínio variável que não aqueles resíduos da região hipervariável como aqui definida. A expressão "região hipervariável" quando aqui utilizada refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis por ligação ao antigénio. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos de uma "região determinante de complementaridade" ou "CDR". As CDR são principalmente responsáveis por ligação a um epitopo de um antigénio. A extensão de FR e CDR foi definida precisamente (ver, Kabat *et al.*, *ibid*).

Como aqui utilizado, a expressão "anticorpo humanizado" refere-se a um anticorpo compreendendo uma região de estrutura de um anticorpo humano e uma ou mais CDR de uma imunoglobulina não humana (geralmente um murganho ou um rato). As partes de uma imunoglobulina humanizada, à exceção possivelmente de CDR, são substancialmente idênticas às partes correspondentes da SEQuências de imunoglobulina humana natural. Importante, é esperado que o anticorpo humanizado se ligue ao mesmo antigénio que o anticorpo dador que proporciona as CDR. Para mais detalhes, ver, e. g., Pat. U.S. Nº 5225539 da Medical Research Council, Reino Unido.

A expressão "anticorpo humano" pretende designar um anticorpo codificado por um gene que ocorre de facto num humano, ou um seu alelo, variante ou mutante.

Como aqui utilizado, o termo imunoglobulina "dadora" ou "parental" refere-se à imunoglobulina não humana que proporciona as CDR.

Como aqui utilizado, o termo imunoglobulina "aceitadora" refere-se à imunoglobulina humana que proporciona a estrutura.

Como aqui utilizado, a expressão "vetor de expressão" refere-se a uma molécula de ADN recombinante contendo uma sequência codificante desejada e sequências de ácidos nucleicos apropriadas necessárias para a expressão da sequência codificante operativamente ligada numa célula hospedeira particular. Está contemplado que a presente invenção abrange vetores de expressão que estão integrados em genomas de células hospedeiras, assim como vetores que permanecem não integrados no genoma do hospedeiro.

A expressão "células geneticamente modificadas", como aqui referida refere-se a células que são transfectadas ou infectadas por um vetor, como exemplificado por um vírus que codifica um polipéptido de interesse, sendo as referidas células capazes de expressar o referido polipéptido. Particularmente no contexto desta invenção, as células geneticamente modificadas são capazes de expressar e excretar o anticorpo da invenção.

O termo "transfecção" refere-se à introdução de ADN numa célula hospedeira. É contemplado que as sequências codificantes podem ser expressas em células transfectadas. São conhecidos

numerosos métodos de transfeção do técnico com conhecimento geral na matéria, por exemplo, CaPO_4 e eletroporação.

Como aqui utilizado, a expressão "efeito antitumoral" refere-se a um efeito biológico que pode ser manifestado por uma diminuição em volume tumoral, uma diminuição no número de células tumorais, uma diminuição no número de metástases, um aumento na esperança de vida ou melhoria de vários sintomas fisiológicos associados com o estado cancerígeno. Um "efeito antitumoral" pode também ser manifestado, em primeiro lugar, pela capacidade do anticorpo da invenção na prevenção da ocorrência do tumor. Dadas as suas propriedades, o anticorpo da invenção pode ser utilizado no tratamento de cancro agudo, assim como na profilaxia do cancro.

Aqui o termo "excipiente" refere-se a uma substância inerte adicionada a uma composição farmacêutica para facilitar adicionalmente a administração de um composto. Os exemplos, sem limitação, de excipientes incluem carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares e tipos de amido, derivados de celulose, gelatina, óleos vegetais e polietilenoglicóis. As composições farmacêuticas podem também incluir um ou mais ingredientes ativos adicionais.

A expressão "Reacção em Cadeia da Polimerase" ("PCR") refere-se aos métodos divulgados nas Pat. U.S. Nº 4683195; 4683202 e 4965188.

II. Modos preferidos para realizar a invenção

a. Preparação do anticorpo

De modo a humanizar o anticorpo BAT-1, é preparado o material inicial de anticorpo não humano, nomeadamente mBAT-1, seguindo a conceção e preparação das variantes humanizadas. Alguns aspetos desta invenção, incluindo a seleção de um domínio variável de anticorpo não humano dador, humanização de uma sequência de gene de anticorpo e produção de um anticorpo humanizado desejado, são descritos nas seguintes secções.

(i) Preparação do anticorpo não humanizado

O anticorpo monoclonal BAT-1 de murino foi descrito previamente na patente U.S. 5897862. Desta forma, uma linha celular de hibridoma representativa que produz anticorpos monoclonais BAT-1 de murino, foi depositada na Colecção Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institute Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, 75724, Paris, Cedex 15, sob o N° de Acesso de Depósito I-1397, em 28 de Janeiro de 1994.

Alternativamente, o anticorpo BAT-1 $\gamma 1/\kappa$ quimérico como produzido a partir do BAT-1 de murino pode ser utilizado para a preparação de um BAT-1 humanizado. O anticorpo BAT-1 quimérico e a sua produção foram descritos no pedido PCT N° WO 00/58363.

(ii) Estratégia de concepção do anticorpo humanizado

A presente invenção divulga processos para humanização do anticorpo BAT-1 através de um processo em que o anticorpo dador, de um modo preferido, anticorpo de murganho, é convertido num anticorpo de tipo humano, por combinação das CDR do anticorpo dador com uma estrutura humana. Em determinadas formas de realização, pode ser desejável produzir variantes das sequências de aminoácidos do anticorpo humanizado, particularmente nos casos em que estas melhoram a afinidade de ligação ou outras propriedades do anticorpo humanizado. Os métodos aplicados para selecionar locais para substituição, inserção ou deleção, a partir do anticorpo BAT-1 dador e do anticorpo aceitador humano selecionado, incluindo a seleção de anticorpos humanos aceitadores, são descritos em detalhe. As extensas análises e diretrizes para humanização de anticorpo, as quais são aqui proporcionadas abaixo, não são divulgadas na técnica anterior e são cruciais para a preparação de um anticorpo alterado ativo.

A concepção de um anticorpo humanizado é iniciada, de um modo preferido, por análise da sequência das cadeias pesadas e leves da região variável de anticorpo não humano, também aqui denominadas adiante V_H e V_L , respetivamente. Tal análise inclui uma comparação entre a sequência de aminoácidos de V_L e V_H do anticorpo não humanizado e de outras regiões variáveis de murganho. Numa forma de realização preferida, a comparação pode ser ainda conduzida com sequências de consenso dos subgrupos em que as regiões variáveis foram subdivididas na base de dados de Kabat (Kabat *et al.*, *ibid*). A classificação dos diferentes elementos da região variável facilita a seleção de regiões variáveis de imunoglobulina que são semelhantes a V_L e V_H do anticorpo não humanizado da presente invenção e estão estruturalmente resolvidas.

A seleção da região variável da cadeia leve humana kapa, também aqui denominada mais à frente V_K , e de V_H que irá servir como a base da região variável do anticorpo humanizado, também denominado um anticorpo aceitador é, de um modo preferido, iniciada através de classificação de V_L e V_H do anticorpo não humano de acordo com sequências de consenso de imunoglobulinas humanas. Particularmente, V_L do anticorpo não humanizado é comparada e conseqüentemente categorizada de acordo com as sequências de consenso dos quatro subgrupos de região variável da cadeia leve humana kapa, como definido por Kabat (Kabat *et al.*, *ibid*). De modo semelhante, V_H do anticorpo não humanizado é comparada e categorizada de acordo com as sequências de consenso dos três subgrupos da região variável da cadeia pesada humana.

A seleção de V_K e V_H humana aceitadora é, de um modo preferido, prosseguida através de condução de uma comparação entre V_L e V_H do anticorpo não humano parental da invenção e todos os exemplos registados das sequências individuais de regiões variáveis humanas publicamente disponíveis. V_K e V_H humanas apropriadas são selecionadas com base no emparelhamento mais próximo ao anticorpo não humano parental.

A análise das sequências dos anticorpos dadores e humanizados e referência a modelos moleculares apropriados, pode ajudar a discernir que resíduos podem estar envolvidos na ligação a antígeno ou na manutenção da estrutura de anticorpo apropriada e que resíduos devem ser removidos ou substituídos de modo a melhorar a estrutura do anticorpo humanizado.

Os modelos moleculares das regiões variáveis de anticorpos não humanos e humanizados são assim preparados para ajudar a

conceção do anticorpo humanizado. A modelação destas estruturas é baseada nas classificações dos elementos da região variável que foram determinados no processo de análise e podem ser obtidos, por exemplo, através da utilização de técnicas *ab initio* e de homologia. As correspondentes estruturas cristalográficas de raio X podem ser obtidas a partir da base de dados Brookhaven.

Os elementos dentro da região variável do anticorpo não humano da invenção, tais como FR, CDR e estruturas de ansa, são modelados em elementos de regiões variáveis de imunoglobulina estruturalmente resolvidas semelhantes. Os impedimentos estéricos são identificados nos modelos e conseqüentemente as cadeias laterais desemparelhadas são selecionadas para substituição. Uma abordagem particularmente preferida para conformação da estrutura inclui a categorização dos elementos estruturais de acordo com classes canónicas baseadas naquelas descritas por Chothia e seus colegas (Chothia *et al.*, 1987, 1989, 1992 *ibid*; Tramontano *et al.*, *ibid*). Uma abordagem preferida para a previsão de estrutura inclui uma pesquisa de base de dados ou pesquisa CONGEN (Brucoleri, R.E. *et al.*, *Biopolymers* 26:137, 1987). As V_k e V_H humanas selecionadas, as quais serviriam como base do anticorpo humanizado, são modeladas de modo semelhante e as suas sequências de aminoácidos são estudadas para determinar se alguns dos seus resíduos podem, provavelmente, influenciar adversamente a especificidade de ligação.

A minimização energética é aplicada, de um modo preferido, após ter-se ajustado os modelos para impedimentos estéricos óbvios. A minimização energética é aqui implementada para aliviar contactos atómicos desfavoráveis e para otimizar a interação de van der Waals e eletrostática.

Como resultado do processo de conceção acima, as variantes de anticorpo humanizado de BAT-1 podem compreender resíduos de aminoácidos conservadores substituídos ou adicionais que não são encontrados no anticorpo recipiente ou no anticorpo dador. A deleção de resíduos de aminoácidos, incluídos nos anticorpos originais aceitadores ou dadores, pode também ser aplicada. Estas modificações são feitas para refinar o desempenho do anticorpo e para não ter substancialmente nenhum efeito na ligação ao antigénio ou noutras funções de imunoglobulina. Os locais de maior interesse para modificações, incluem as ansas hipervariáveis, mas alterações da FR estão também contempladas. Os resíduos da região hipervariável ou os resíduos da FR envolvidos na ligação ao antigénio são geralmente substituídos de um modo relativamente conservador. As substituições conservadoras que podem ser aplicadas na presente invenção compreendem as seguintes opções: Val, Ile; Ser, Thr; Lys, Arg; Phe, Tyr; Trp, Leu; Asp, Ser; Cys, Thr; Gln, Lys; Val, Ala; Asn, Ser; Thr, Asn.

(iii) Construção das variantes de anticorpo humanizado

Geralmente, as variantes de anticorpo BAT-1 são preparadas convencionalmente em cultura de células recombinantes, como descrito em maior detalhe abaixo. Aqui a síntese recombinante é aqui preferida, mas sabe-se como preparar péptidos através de síntese química ou como purificá-los a partir de fontes naturais.

As técnicas de biologia molecular e os protocolos de enxerto de CDR adequados para realizar a invenção, como aqui descritas, são conhecidas dos especialistas na técnica. Os ensinamentos

adequados são descritos em numerosos manuais e publicações originais, incluindo *inter alia*, Sambrook et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989); Ausubel et al., (Protocols In Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nova Iorque 1987, 1988, 1989); Patente U.S. Nº 5225539 e 5585089.

As sequências de aminoácidos das CDR da cadeia leve e pesada de BAT-1 são aqui identificadas e ilustradas na FIG. 5 e 6: CDR_{L1} (SEQ ID Nº 9 e SEQ L1 na FIG. 5): SARSS VSYMH; CDR_{L2} (SEQ ID Nº 10 e SEQ L2 na FIG. 5): RTSNL AS; CDR_{L3} (SEQ ID Nº 11 e SEQ L3 na FIG. 5): QQRSS FPLT; CDR_{H1} (SEQ ID Nº 12 e SEQ H1 na FIG. 6): NYGMN; CDR_{H2} (SEQ ID Nº 13 e SEQ H2 na FIG. 6): WINTD SGEST YAEFF KG; CDR_{H3} (SEQ ID Nº 14 e SEQ H3 na FIG. 6): VGYDA LDY.

Utilizando estas sequências de aminoácidos, os oligonucleótidos que codificam estas CDR podem ser sintetizados para utilização na presente invenção. Além disso, os oligonucleótidos podem conter nucleótidos para além daqueles de CDR de BAT-1, por exemplo, para facilitar a clonagem ou para introduzir locais de restrição. As técnicas de síntese de oligonucleótidos adequadas para este aspeto da invenção são bem conhecidas do especialista na técnica e podem ser realizadas utilizando qualquer de vários sintetizadores automatizados comercialmente disponíveis. Além disso, os ADN que codificam as CDR aqui apresentadas podem ser obtidos através dos serviços de síntese de ADN de vendedores comerciais. Não é assim necessário re-clonar CDR de BAT-1 a partir de uma fonte natural.

As CDR de mBAT-1 são enxertadas num anticorpo humano para produzir as variantes de BAT-1 humanizado. Deverá ser entendido

que o anticorpo humano neste contexto se refere a qualquer anticorpo que ocorre num anticorpo humano ou manipulado que foi concebido, sob alguns aspetos, para ser compatível com o sistema imune humano. São particularmente preferidos para este objetivo os anticorpos que, de um modo geral, não produzem uma resposta imune adversa num doente.

Para construir anticorpos BAT-1 humanizados com CDR enxertadas, os oligonucleótidos que codificam as CDR de BAT-1 podem ser integradas noutros ADN que codifica as cadeias pesadas e leves de anticorpo e seus fragmentos, utilizando técnicas recombinantes bem conhecidas, tais como aquelas descritas nas referências acima. Particularmente, as CDR de BAT-1 podem ser introduzidas em praticamente qualquer conjunto de FR de acordo com a presente invenção. Uma variedade de genes de anticorpo humanos está disponível na forma de depósitos publicamente acessíveis e genes de anticorpo adequados podem ser sintetizados a partir destas sequências, muito como descrito acima. As técnicas preferidas utilizadas neste contexto, para clonagem e manipulação de polinucleótidos, são ilustradas através dos métodos e exemplos apresentados.

As sequências de aminoácidos de mBAT-1 e de FR reformuladas da cadeia leve (FIG. 5) e pesada (FIG. 6) de BAT-1 e FR modificadas são aqui identificadas: FR_{L1} (SEQ ID N° 1): EIVLT QSPSS LSASV GDRVT ITC; FR_{L2} (SEQ ID N° 2): WXaaQQK PGKAP KLXbbI Y, em que Xaa = F, Y e Xbb = W, L; FR_{L3} (SEQ ID N° 3): GVPSR FSGSG SGTXaaXbb XccLTIN SLQPE DFATY YC, em que Xaa = D, S; Xbb = Y, F e Xcc = C, T; FR_{L4} (SEQ ID N° 4): FGGGT KLEIK; FR_{H1} (SEQ ID N° 5): QXaaQLV QSGSE LKKPG ASVKI SCKAS GIXbbFXcc, em que Xaa = I, V; Xbb = T, S; Xcc = T, S; FR_{H2} (SEQ ID N° 6): WVXaaQA PGQGL XbbWMG, em que Xaa = R, K; Xbb = Q, K; FR_{H3} (SEQ ID N° 7): RFXaaFS LDTSV XbbTAYL QITSL XccAEDT GMYFC XddXee, em que

Xaa = V, A; Xbb = N, S; Xcc = T, N; Xdd = V, A; Xee = R, K; FR_{H4}
(SEQ ID N° 8): WGQGT LVTVS S.

Os oligonucleótidos que codificam as CDR de BAT-1 e/ou resíduos de FR específicos originários de anticorpos humanos podem ser utilizados para introduzir codões no ADN que codifica V_K ou V_H das variantes de BAT-1 humanizado. De acordo com este aspeto da invenção, os codões adicionais podem incluir aqueles não derivados de CDR de BAT-1, assim como aqueles que constituem as CDR. Estas bases adicionais podem ser incluídas para facilitar a ligação de CDR a FR de uma fonte heteróloga. Podem compreender locais de restrição ou regiões complementares sobreponíveis para este objetivo. Os ADN molde são tipicamente vetores de ADN de cadeia simples (ss-ADN).

As CDR das cadeias pesadas e leves de BAT-1 podem também ser modificadas, particularmente após a incorporação num anticorpo humanizado utilizando técnicas de ADN recombinante bem conhecidas para suprimir, introduzir e alterar bases num ADN ou ARN clonado ou sintético. As técnicas de mutagénese dirigida adequadas para este fim são bem conhecidas dos especialistas na técnica e são ilustradas nas referências anteriores relativas a técnicas de ADN recombinante. Estes métodos podem ser utilizados para introduzir praticamente qualquer alteração desejada em polinucleótidos que codificam as CDR de BAT-1 ou noutras regiões de um gene de cadeia pesada ou leve fechado.

A síntese de ADN mais longo, de cadeia dupla, a partir de ADN mais curto, sobreponíveis, de cadeia simples, é bem conhecida dos especialistas na técnica. Do mesmo modo, é bem conhecida a ligação de extremidade a extremidade de ADN, incluindo ADN de extremidade romba e aqueles com, pelo menos, parcialmente sobreponíveis terminais complementares. Por

exemplo, estas técnicas são ilustradas nas referências anteriores sobre técnicas de ADN recombinante.

A construção de todas as versões da região variável de BAT-1 humano é realizada, de um modo preferido, como descrito por Stemmer (Stemmer *et al.*, GENE 164:49, 1995). Essencialmente, este método é favorecido para a síntese de longas sequências de ADN a partir de um grande número de oligodesoxirribonucleótidos (oligos). O método baseia-se em ADN polimerase utilizando a técnica de PCR convencional, para construir fragmentos de ADN cada vez mais longos durante o processo de montagem. Uma vez sintetizado o novo gene da região variável, este é subclonado, de um modo preferido, num vetor que é transformado em células competentes, como descrito nas referências acima. Os putativos clones positivos podem ser identificados por rastreio com PCR utilizando iniciadores apropriados e/ou por digestão de restrição. Os clones individuais selecionados dos clones positivos confirmados podem ser sequenciados como ADN de cadeia dupla (ds-ADN). De um modo preferido, os ds-ADN resultantes podem ser novamente verificados para erros induzidos por PCR, através da SEQuenciação, e corrigidos por subclonagem de fragmentos corretos a partir de outros clones.

O ADN de clones selecionados, a partir do clone positivo confirmado, contendo V_k ou V_H humanizado da variante de BAT-1 pode ser introduzido diretamente em vetores de expressão que compreendem as regiões constantes pesadas e leves humanas, respetivamente. Assim que o ADN que codifica a variante de anticorpo completo enxertado com CDR de BAT-1 humanizado, ou as regiões da cadeia pesada ou leve do anticorpo enxertado com CDR de BAT-1 humanizado, foi montado, este pode ser introduzido num vetor para propagação e expressão através de técnicas

convencionais. Deste modo podem ser obtidas quantidades desejadas do anticorpo.

(iv) Expressão das variantes de anticorpo BAT-1 humanizado

A invenção também proporciona sequências de polinucleótidos isolados que codificam o anticorpo BAT-1 humanizado completo, a região variável ou completa da cadeia leve, a sequência da região variável ou completa da cadeia pesada, assim como vetores e células hospedeiras compreendendo o ácido nucleico codificante.

Para a produção recombinante do anticorpo BAT-1, a sequência de polinucleótido que codifica o referido anticorpo ou os seus fragmentos, é isolada e introduzida num vetor replicável para clonagem adicional, amplificação ou para expressão. O ADN que codifica o anticorpo é prontamente isolado e sequenciado utilizando processos convencionais (e. g., utilizando sondas de oligonucleótidos que são capazes de se ligarem especificamente a genes que codificam as cadeias pesadas e leves do anticorpo). Estão disponíveis muitos vetores que incluem geralmente, mas não estão limitados a, um ou mais dos seguintes: uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento intensificador, um promotor e uma sequência de terminação de transcrição.

Para a expressão, o polinucleótido que codifica o anticorpo BAT-1 humanizado ou os seus fragmentos, pode ser clonado num vetor de expressão. Tais vetores são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Uma sequência de controlo de expressão, tais como uma imunoglobulina ou promotor viral, é introduzida a montante do polinucleótido. Marcadores de seleção,

tais como o gene dhfr ou outros marcadores de seleção adequados bem conhecidos dos especialistas na técnica, são incluídos no vetor para permitir a seleção de células hospedeiras que estão a expressar o referido polinucleótido incluído no vetor.

A célula hospedeira pode endogenamente produzir anticorpos, enquanto numa alternativa, a célula é modificada geneticamente para produzir anticorpos. Os exemplos de células que produzem endogenamente anticorpos incluem, mas não estão limitados a, hibridomas, linfomas, plasmacitomas e células transformadas com EBV. Uma célula pode ser modificada geneticamente para produzir anticorpos através de métodos convencionais, tal como por transfeção com um vetor que codifica uma molécula de anticorpo.

Em utilização, o vetor de expressão compreendendo o polinucleótido que codifica o anticorpo BAT-1 humanizado ou os seus fragmentos, é transfetado em células. Os métodos de transfecção são bem conhecidos na técnica e tais métodos são adequados para emprego na presente invenção. As células que expressam o vetor de expressão são selecionadas utilizando o marcador de seleção incorporado o vetor de expressão ou um vetor utilizado para co-transfeção. As células que expressam o anticorpo podem ser rastreadas através de imunoensaios de adsorção ligado à enzima (ELISA) ou outros métodos adequados bem conhecidos dos especialistas na técnica.

As variantes de anticorpo BAT-1 humanizado são introduzidas numa célula hospedeira através transfeção de um vetor compreendendo um polinucleótido codificando o anticorpo completo ou fragmento Fv do anticorpo. As variantes anticorpo BAT-1 humanizado são também introduzidas em células hospedeiras através de co-transfeção de: (i) um vetor compreendendo um polinucleótido que codifica a região de cadeia leve completa ou

variável do anticorpo e (ii) um vetor compreendendo um polinucleótido que codifica a região da cadeia pesada completa ou variável do anticorpo.

O anticorpo da invenção pode ser produzido através de transfeção de um único vetor compreendendo sequências de polinucleótido que codificam as regiões variáveis leves e pesadas do anticorpo. Este vetor pode compreender ainda dois promotores, cada um ligado operativamente à sequência de polinucleótidos que codifica as regiões da cadeia leve e cadeia pesada de BAT-1 reformulado. A expressão resultante do anticorpo BAT-1 é mais alta do que a sua expressão após co-transfeção com dois vetores, cada um codificando as regiões da cadeia leve ou cadeia pesada, do anticorpo, sendo a transfeção e co-transfeção conduzidas numa célula hospedeira semelhante.

As variantes de anticorpo BAT-1 humanizado podem ser expressas em qualquer tipo de célula adequado, incluindo mas não limitado a, células de mamífero, ave, inseto, bacterianas ou de levedura. Os exemplos de células de mamífero incluem, mas não estão limitadas a, células humanas, de coelho, roedor (e. g., murganho, rato) e de bovino. A célula pode ser uma célula de mieloma, uma célula de ovário de hamster Chinês (CHO), célula COS, célula COS7 ou fibroblasto.

As linhas de células produtoras de anticorpos podem ser cultivadas utilizando técnicas bem conhecidas dos especialistas. Tais técnicas são descritas numa variedade de manuais de laboratório e publicações originais. Por exemplo, as técnicas adequadas para utilização na invenção, como descrita abaixo, são descritas em *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., (Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, N.I. 1991).

Os anticorpos monoclonais humanizados da invenção podem ser congelados ou liofilizados para armazenamento e reconstituídos num veículo adequado antes da utilização. Esta técnica mostrou ser eficaz com imunoglobulinas convencionais e podem ser utilizadas técnicas de liofilização e reconstituição conhecidas na técnica. Deve ser entendido pelos especialistas na técnica que a liofilização e reconstituição podem conduzir a vários graus de perda de atividade de anticorpo e os níveis de utilização podem ter que ser ajustados para compensar.

(v) Purificação do anticorpo BAT-1 humanizado

Utilizando técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplásmico ou excretado diretamente no meio. Se o anticorpo for produzido intracelularmente, como um primeiro passo, os detritos particulados, sejam células hospedeiras ou fragmentos lisados, são removidos através, por exemplo, de centrifugação ou ultrafiltração. Carter et al., (Biotechnology 10:163, 1992) descrevem um processo para isolar anticorpos que são excretados para o espaço periplásmico de *E. coli*. Resumidamente, a pasta celular é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA e fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante cerca de 30 minutos. Os detritos celulares podem ser removidos através de centrifugação.

O anticorpo da invenção pode ser excretado no meio, os sobrenadantes de tais sistemas de expressão são geralmente primeiro concentrados utilizando um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração da Amicon ou millipore. Um inibidor de protease

pode ser incluído em qualquer dos passos anteriores para inibir a proteólise e podem ser incluídos antibióticos para prevenir o crescimento de contaminantes acidentais.

A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada utilizando métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, cromatografia de hidroxapatite, eletroforese em gel, diálise e cromatografia de afinidade, sendo a cromatografia de afinidade, particularmente com proteína A, uma técnica de purificação preferida. A matriz à qual o ligando de afinidade está ligado é muito frequentemente agarose, mas estão disponíveis outras matrizes. As matrizes mecanicamente estáveis, tais como vidro de poro controlado ou poli(estireno-divinil)benzeno, permitem caudais mais rápidos e tempos de processamento mais curtos dos que podem ser conseguidos com agarose. Nos casos em que o anticorpo compreende um domínio C_H3, a resina ABX™ da Bakerbond (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) é útil para a purificação. Outras técnicas para purificação de proteína, tais como fracionamento numa coluna de permuta iónica, precipitação com etanol, HPLC da fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina SEPHAROSE™, cromatografia numa resina de permuta aniónica ou catiónica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatografia de focagem, SDS-PAGE e precipitação com sulfato de amónio, estão também disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado.

(vi) Depósito da Linha Celular

Os anticorpos monoclonais BAT humanizados podem ser idênticos na sua função ou atividade àqueles produzidos por células depositadas sob o N.º ATCC (PTA-5189) em 9 de maio de 2003.

III. Farmacologia

(i) Composições farmacêuticas

A invenção também proporciona uma composição compreendendo o anticorpo da invenção.

De acordo com outra forma de realização, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo como um ingrediente ativo o anticorpo da invenção. As referidas composições podem ser em qualquer forma farmacêutica adequada para administração a um doente, incluindo, mas não limitada a, soluções, suspensões, pós liofilizados para reconstituição com um veículo adequado ou diluição antes de utilização, cápsulas e comprimidos. As composições farmacêuticas divulgadas nesta invenção podem compreender ainda qualquer diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável para proporcionar conjugados fisiologicamente aceitáveis, compreendendo os anticorpos com agentes terapêuticos para diagnóstico, prognóstico e terapia, entre outras.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser fabricadas através de processos bem conhecidos na técnica, e. g., através de processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, moagem, pulverização, fabricação de drageias, levigação, emulsionamento, encapsulação, captura ou liofilização.

As composições farmacêuticas para utilização de acordo com a presente invenção podem assim ser formuladas de modo convencional, utilizando um ou mais veículos fisiologicamente aceitáveis, compreendendo excipientes e auxiliares, as quais facilitam o processamento dos compostos ativos em preparações

que podem ser utilizadas farmaceuticamente. A formulação apropriada é dependente da via de administração escolhida.

Para injeção, os compostos da invenção podem ser formulados em soluções aquosas, de um modo preferido, em tampões fisiologicamente compatíveis, tais como solução de Hank, solução de Ringer ou tampão de soro fisiológico. Para administração transmucosal, são utilizados na formulação penetrantes apropriados à barreira a ser permeada. Tais penetrantes, por exemplo, polietilenoglicol, são geralmente conhecidos na técnica. As composições farmacêuticas que podem ser utilizadas oralmente, inclui cápsulas de encaixe rápido.

Para administração por inalação, as moléculas para utilização de acordo com a presente invenção são convenientemente distribuídas na forma de uma apresentação de spray aerossol, tais como uma embalagem pressurizada ou um nebulizador com a utilização de um propulsor adequado, e. g., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano ou dióxido de carbono. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada ao proporcionar uma válvula para distribuir uma quantidade calibrada. As cápsulas e cartuchos, e. g., de gelatina, para utilização num inalador ou insuflador, podem ser formuladas contendo uma mistura pulverizada do polipéptido e uma base em pó adequada, tais como lactose ou amido.

As composições farmacêuticas para administração parentérica incluem soluções aquosas dos ingredientes ativos em forma hidrossolúvel. Adicionalmente, as suspensões dos compostos ativos podem ser preparadas como suspensões oleosas de injeção apropriadas. Veículos naturais ou sintéticos adequados são bem conhecidos na técnica. Opcionalmente, a suspensão pode também

conter estabilizadores ou agentes adequados, os quais aumentam a solubilidade dos compostos, para permitir a preparação de soluções altamente concentradas. Alternativamente, o ingrediente ativo pode estar na forma de pó para reconstituição com um veículo adequado, e. g., água estéril apirógena, antes da utilização.

As composições farmacêuticas adequadas para utilização no contexto da presente invenção incluem composições em que os ingredientes ativos estão contidos numa quantidade eficaz para conseguir o fim pretendido. Todas as formulações para administração devem ser em dosagens adequadas para a via de administração escolhida. Mais especificamente, uma "dose terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade de um composto eficaz para prevenir, aliviar ou melhorar os sintomas de uma doença do indivíduo a ser tratado. A determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz está dentro da capacidade dos especialistas na técnica, especialmente à luz da divulgação detalhada aqui proporcionada.

A toxicidade e a eficácia terapêutica das composições aqui descritas podem ser determinadas por processos farmacêuticos convencionais em culturas de células ou animais experimentais, e. g., através da determinação da IC_{50} (a concentração que proporciona 50% de inibição) e da dose máxima tolerada para um composto em causa. Os dados obtidos a partir destes ensaios de cultura de células e estudos em animais podem ser utilizados na formulação de uma gama de dosagem para utilização humana. A dosagem pode variar dependendo da forma de dosagem utilizada e da via de administração utilizada. A formulação exata, a via de administração e a dosagem podem ser escolhidos pelo médico individual face ao estado do doente. Dependendo da gravidade e da responsividade do estado a ser tratado, a dosagem pode também

ser uma administração única de uma composição de libertação lenta, com curso do tratamento a durar desde diversos dias a diversas semanas ou até a cura ser efetuada ou ser conseguida diminuição do estado de doença. A quantidade de uma composição a ser administrada será, naturalmente, dependente do indivíduo a ser tratado, da gravidade da afeção, do modo de administração, da avaliação do médico que prescreve e todos os outros fatores relevantes.

(ii) Aspetos terapêuticos

Foi verificado que um anticorpo monoclonal de acordo com a invenção induz uma variedade de efeitos antitumorais numa variedade de tumores. Dentro do âmbito da presente invenção, o novo hBAT-1 pode ser utilizado no tratamento tumoral. A expressão "quantidade eficaz" deve ser entendida como significando uma quantidade de um anticorpo requerida para conseguir um efeito terapêutico. A quantidade eficaz requerida para conseguir o resultado final terapêutico pode depender de um número de fatores, incluindo, por exemplo, o tipo de tumor e a gravidade do estado do doente (*i. e.*, o estado cancerígeno), e se o anticorpo é coadministrado em conjunto com outro agente que atua em conjunto com o anticorpo de um modo aditivo ou sinérgico. O anticorpo pode ser administrado após deteção de tumores primários ou secundários no indivíduo ou, como terapia preventiva de um indivíduo que tem um risco elevado de desenvolver cancros, tal como um indivíduo exposto a radiação ou que tem uma predisposição genética.

A administração das referidas composições pode ser realizada tipicamente por administração parentérica, *e. g.*, intravenosamente (*i.v.*) intraperitonealmente (*i.p.*) ou

intramuscularmente (i.m.). Os métodos de tratamento podem compreender composições farmacêuticas dos anticorpos de acordo com a invenção. Alternativamente ou adicionalmente, os métodos de tratamento podem incluir terapia celular, *ex vivo* ou *in vivo*, em que as células são autólogas ou alogeneicas.

De modo a impulsionar a atividade antitumoral do anticorpo, é por vezes vantajoso administrar o anticorpo da invenção conjuntamente, antes ou depois da administração de outros agentes, os quais podem atuar de modo aditivo ou sinérgico com estes. Os exemplos compreendem várias citocinas, incluindo mas não limitadas a IL-1 (Interleucina-1), IL-2, IL-6 e IFN- α (interferão- α), assim como vacinas celulares ou anticorpos adicionais, incluindo mas não limitados a, anticorpos estimuladores de células T ou anticorpos terapêuticos antitumorais.

O anticorpo da invenção pode ser útil na terapia de uma variedade de doenças, à exceção do cancro onde a ativação ou outros efeitos do anticorpo na atividade proliferativa, citolítica ou estimuladora do sistema imune pode ter um efeito terapêutico, tal como, por exemplo, em fases precoces da infeção por HIV ou em doentes cuja contagem sanguínea mostra uma diminuição em células T CD4+ (o vírus causador de SIDA, síndrome da imunodeficiência adquirida), em vários distúrbios autoimunes, ou em alguns casos de imunodeficiências genéticas ou adquiridas. Em doentes de SIDA, o anticorpo pode ser administrado aos indivíduos infetados que não desenvolveram ainda quaisquer sintomas da doença ou em indivíduos em fases precoces do processo de infeção por HIV.

A dose do anticorpo ou composição a ser administrada a um indivíduo deve ser suficiente para efetuar uma resposta

terapêutica benéfica no indivíduo ao longo do tempo ou para inibir o crescimento tumoral. Assim, o anticorpo ou a composição podem ser administrados a um indivíduo numa quantidade suficiente para aliviar, reduzir, curar ou, pelo menos, parar parcialmente a doença.

A dose será determinada pela atividade da composição terapêutica produzida e do estado do indivíduo, assim como do peso corporal ou da área superficial do indivíduo a ser tratado. O tamanho da dose e o regime de dosagem também será determinado pela existência, natureza e extensão de alguns efeitos secundários adversos que acompanham a administração de uma composição terapêutica particular num indivíduo particular. Ao determinar a quantidade eficaz da composição terapêutica a ser administrada, o médico necessita avaliar os níveis plasmáticos circulantes, toxicidade e progressão da doença.

Tendo-se agora descrito genericamente a invenção, a mesma será mais prontamente entendida com referência aos seguintes exemplos, os quais são proporcionados a título ilustrativo e não pretendem ser limitativos da presente invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Análise da SEQuência da região variável da cadeia leve kappa (V κ) de BAT-1 de murganho

As sequências de ADN e de aminoácidos da região V κ de BAT-1 são mostradas na FIG. 1. As sequências de aminoácidos foram

comparadas com outras regiões variáveis de murganho e também com as sequências de consenso dos subgrupos em que as regiões variáveis foram subdivididas na base de dados de Kabat (Kabat *et al.*, *ibid*). A partir desta análise, verificou-se que a região Vk de BAT-1 emparelha mais intimamente com as sequências de consenso do subgrupo IV de kapa de murganho (Identidade = 88,38%; Semelhança = 92,45) e do subgrupo VI de kapa de murganho (Identidade = 87,74%; Semelhança = 89,62). Quando apenas as FR da região variável da cadeia leve kapa de BAT-1 (*i. e.*, sem os aminoácidos nas CDR) foram comparadas com os subgrupos IV e VI de murganho, a percentagem de identidade aumentou até exatamente 90,00% para ambos, enquanto a percentagem de semelhança aumentou para 92,50%, novamente para ambas as sequências de consenso. Contudo, apesar das estreitas semelhanças com ambos os subgrupos de Kabat, foi decidido que a região Vk de BAT-1 de murino deve ser classificada como subgrupo VI de murganho.

A razão para a seleção do subgrupo VI de murganho foi relacionada com as classes canônicas das ansas hipervariáveis da região Vk de BAT-1, como definidas por Chothia e seus colaboradores (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901, 1987; Nature 34:877, 1989; J. Mol. Biol. 227:799, 1992; Tramontano *et al.*, *ibid*). De acordo com Chothia, cada uma das CDR: CDR1 (L1), CDR2 (L2) e CDR3 (L3) eram da classe canônica 1 (FIG. 2). Crucialmente, a ansa hipervariável L1 da classe canônica 1 de 10 aminoácidos foi apenas observada nas regiões Vk de murganho o que se ajustou ao subgrupo VI de Kabat.

As classes canônicas mais restritivas para as estruturas de ansa relacionadas com CDR foram mais recentemente definidas por Martin e Thornton (Martin *et al.*, *ibid*) e também estas são descritas na FIG. 2. A utilidade das novas definições de classes

canônicas deve-se à sua restringência, a qual por sua vez, está relacionada com a presença de um maior número dos denominados resíduos canônicos de estrutura em cada classe. A importância destes resíduos "extra", potencialmente chave, foi posteriormente considerada ao conceber o anticorpo BAT-1 humanizado. As ansas L1 e L2 foram facilmente atribuídas às classes canônicas de Martins 1/10A e 1/7A, respectivamente, contudo, a ansa L3 não emparelhou perfeitamente nenhuma das classes disponíveis. A classe que emparelhou mais estreitamente foi a classe 1/9A, contudo, para ajustar a esta classe teria que existir resíduo na posição 28 na região Vk de BAT-1, que não estava atualmente presente. O gene da linha germinal da região variável da cadeia leve kapa de murganho mais próxima de Vk de BAT-1 foi H4, que também continha uma ansa L1 de 10 aminoácidos (Tabela 1). Apenas 12 desemparelhamentos foram encontrados entre a sequência da linha germinal H4 e a região Vk de BAT-1. A maioria destes desemparelhamentos estava posicionada nas CDR com apenas quatro diferenças localizadas nas FR. A maioria destes desemparelhamentos foram alterações muito conservadoras, à exceção da cisteína na posição 72 (numeração de Kabat) em FR3. A sua posição imediatamente adjacente a um resíduo canônico importante (posição 71) sugeriu que a cisteína poderia ter um papel chave na ligação ao antigénio. Não obstante, tomados em conjunto, o exemplo acima sugeriu claramente que a sequência de BAT-1 era típica de uma região variável Vk de murganho.

Tabela 1

Nome	¹ Id.	² Resíduos 1-50 de Vk de BAT de murino Vs.
Seq.	Res.	Vk da linha germinal de murganho
BAT	106	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSARS-----SVSYMHWQKPGTSPKL
H4	83	S...S.....Y.Y.....S...
H3/Ox	83	M...S.....Y...S.....
1		
R9	83	M...S.....I....Y.....
H13	81	L.....M...S.....Y.Y....RS...
H8	81	L.....M...S.....X.....S...
H1	81	M.....S.....V.S..LY.Y....S...
H9	81	..L.....M...S.....Y.....S...
R2	76	E.L.....IA.....S.....N.Y....S...
T3B	75	---.....A..L....M...S.S....V.S..L..Y...S....
R11	74	EN.....A.....M...S.S....V.S.NL..Y...S...T.
H6/X2	74	E.....TA..L.Q.....S.....Y...S.....
4		
L8	74	EN.....A..L....M...S.S....V.S..L..Y...S....
R1/s1	72	EN.....A..L.Q...M...S.S....V.S..L..Y...S.A...
07b		
R13	72	EN.....L.....MS.R.S.....N..Y.Y...SDA...
H2	67	G.....TT.T.F...N.....S.....IN.I..Y...S.NT...
BAT	106	WIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYCLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFP
H4	83	P.....S...S.....YH.Y.
H3/Ox	83	R...D..K.....S...S.....W..N.
1		
R9	83	R...D..K.....S...S.....H....Y.
H13	81	P...L.....S...S.....W..N.
H8	81	...SI.....S...SVK.....W..S.
H1	81	...S.....S...S.....F....Y.QY.
H9	81	P...D.....F.....S.I..S.....H....Y.
R2	76	I...GI.....FSF..NS....V.....Y.
T3B	75	P...G.....V.....S...S.....W..Y.
R11	74	F.....E...P.....S...SV.....W.GY.
H6/X2	74	P...EI.K.....S...S.....I.....WNYPL
4		
L8	74	...G.....A.I..S...S...ND.....W.GY.
R1/s1	72	PL.H.....S...SV...D.....W.GY.
07b		
R13	72	...Y.....P.....N..S...S..G.....FT.S.
H2	67	QX..K..D.P....TL.....S...SV.....W.GY.

¹ N° de resíduos idênticos à sequência de BAT.

² Um ponto [.] refere-se a um emparelhamento entre Vk de BAT e Vk da linha germinal de murganho e uma linha [-] refere-se à ausência de aminoácido.

Exemplo 2

Análise da SEQuência da região variável da cadeia pesada de BAT-1 de murganho

As sequências de ADN e de aminoácidos da região V_H de BAT-1 são mostradas na FIG. 3. Uma análise semelhante àquela dada no Exemplo 1 foi conduzida para a região V_H de BAT-1 que determinou que esta apresentou o emparelhamento mais próximo às sequências de consenso do subgrupo variado da cadeia pesada de murganho na base de dados de Kabat (Kabat *et al.*, *ibid*). A identidade entre a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada de mBAT-1 de murganho e as sequências de consenso do subgrupo variado foi medida como 60,64%, enquanto a semelhança foi calculada como sendo 69,23%, sendo as sequências de consenso do subgrupo de Kabat seguintes mais próximas o subgrupo IIa (Identidade = 59,83%; Semelhança = 66,67%). Contudo, quando apenas as FR da região V_H de BAT-1 foram comparadas ao subgrupo IIa de murganho, a percentagem de identidade diminuiu para 54,02% enquanto a semelhança caiu para 62,06%. Inversamente, as mesmas comparações realizadas contra o subgrupo variado de murganho verificaram que as FR da região V_H de BAT-1 apresentaram uma identidade de 65,52% e uma semelhança de 74,71%.

Quando as classes canónicas das ansas hipervariáveis da região V_H de BAT-1, como definidas por Chothia e seus colaboradores, foram analisadas (FIG. 4), as ansas de CDR1 e CDR2 (H1) emparelharam com as ansas de classe 1 canónica de Chothia. Contudo, nenhuma classe foi atribuída à estrutura de ansa de CDR3 (H3) devido à vasta gama de tamanho e composição de aminoácidos que as ansas H3 podem apresentar.

Utilizando as classes canônicas mais restritivas para as estruturas de ansa de CDR definidas por Martin e Thornton (Martin *et al.*, *ibid*) foi uma questão simples para determinar que a ansa H1 emparelhou com a classe canônica de Martin 1/10A. Contudo, para a ansa H2 foi mais difícil de atribuir classe, embora a classe canônica de Martin mais próxima fosse a Classe 2/10A. Infelizmente, uma vez que o aminoácido Asp53 na ansa H2 não emparelhou com os resíduos previstos para esta posição (*i. e.*, Ala, Gly, Tyr, Ser, Lys, Thr ou Asn), o emparelhamento também não era perfeito. O gene de linha germinal da região variável da cadeia pesada de murganho a mais próxima de V_H de mBAT-1 identificada foi VMS2/VGK4 (Tabela 2). Assim, o exemplo acima sugeriu claramente que a sequência de mBAT-1 era típica de uma região variável V_H de murganho.

Tabela 2

Nome Seq./	² Resíduos 1-50 de V _H de BAT de murino Vs.
¹ Id. Res.	V _H da linha germinal de murganho
BAT / 117	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMN-WVKQAPGKGLKWMG
VMS2/VGK4/	
92	
VMS9/VGK1A/	
251 / 90	
VGK6 / 89	
VFM11/VGK1	
B / 89	
264 / 88	T...S.....
VFM1/281/VG	D.S.H.....
K7 / 87	
VMS1/141/VG	A.H.....
K3 / 84	
161 / 84	

(continuação)

Nome Seq./	² Resíduos 1-50 de V _H de BAT de murino Vs.	
¹ Id. Res.	V _H da linha germinal de murganho	
VGK5 / 79	--.....	TA..Q....QKM.....I.
VGK2 / 77	---.....	R.....TA..Q....QKM.....I.
V104A/VAR10 4A / 57	.V..Q.....VR..TS.....	LT.W.....XM..Q..E.I.
VH105 / 57	.V..Q.....V...AS.....	S.YIH.....R..Q..E.I.
VAR104 / 56	.V..Q.....VR..TS.....	LT.W.....XR.AQ..E.I.
J558-43y / 56	.V..Q.....V...AS.R.....	S.NIH.....R..Q..E.I.
J558-122B / 55	.V..Q.....VR..TS.....	IT.W.....XR..Q.XE.I.
37A11 / 55	.V..L...A..M...AS.....	T....SS.WIE.....R..H..E.I.
VH104A / 55	.V..Q.....VR..TS.....	LT.W.....XM..Q..E.I.
VAR100 / 54	.V..Q.....VR..LS..L.....	I.IT.W.....R..Q..E.I.
VMS9/VGK1A/ 251 / 90	YT....P...DD.....	S.....K.....A.
VGK6 / 89	ET....P...DD.....	S.....K.....--
VFM11/VGK1 B / 89	YT....P...DD.....	S.....K...M....A.
264 / 88	Y....VP...DD.....	S.....K.....A.
VFM1/281/VG K7 / 87	ET....P...DD.....	S.....K.....A.
VMS1/141/VG K3 / 84	.KY.NT....P...GDD.....	S.....K...M....A.
161 / 84	YT....P...DD.....	C.S.....K.Q....----
VGK5 / 79	H....VPK...D.....	S.....K...M....--
VGK2 / 77	H....VPK...D.....	S.....S..K.....--
V104A/VAR10 4A / 57	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..	SS...M.LSS.TS..S.V...A.
VH105 / 57	Y.YPRD...STN.N.K...KATLTAD..	SS...M.LSS.TS..S.V...A.
VAR104 / 56	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..	SS...M.LSS.TS..S.V...A.
J558-43y / 56	..YPGD...NTK.N.K...KTTLTADK.	SS...M.LSS.TS..S.V...A.
J558-122B / 55	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..	SS...M.LSS.TS..S.VH..A.
37A11 / 55	K.LPG....STN.N.K...KAK.TADI.	S....M.LSS.TS..S.V.Y.A.
VH104A / 55	A.FPAG...STN.NQM...KATLTVD..	SS...M.LSS.TS..S.V...A.
VAR100 / 54	Q.FPA....STN.N.M.E.KATLTVD..	SS...M.LSS.TS..S.V.Y.A.

¹ N° de resíduos idênticos à sequência de BAT.

² Um ponto [.] refere-se a um emparelhamento entre V_H de BAT e V_H da linha germinal de murganho e uma linha [-] refere-se à ausência de aminoácido.

Exemplo 3

Conceção das variantes de anticorpo V_K de BAT-1 humanizado

O primeiro passo na conceção das regiões variáveis humanizadas do anticorpo BAT-1 foi a seleção da região variável da cadeia leve kapa humana que serviria como a base da região V_K de BAT-1 humanizado. Como uma ajuda para este processo, a região V_K de BAT-1 foi inicialmente comparada às sequências de consenso dos quatro subgrupos de região variável da cadeia leve kapa humana como definidos por Kabat e seus colaboradores (Kabat *et al.*, *ibid*).

A região variável da cadeia leve de BAT-1 de murganho foi muito semelhante às sequências de consenso do subgrupo I da cadeia leve kapa humana e do subgrupo III da cadeia leve kapa humana. No caso do subgrupo I da cadeia leve kapa humana, a região V_K de BAT-1 de murganho apresentou uma identidade de 63,21% ao longo de toda a região variável e uma identidade de 70,00% dentro apenas das FR. Quando medidos com respeito à semelhança, estes valores aumentaram para 71,70% globalmente e 80,00% dentro apenas das FR. No caso do subgrupo III da cadeia leve kapa humana, a região V_K de BAT-1 de murganho apresentou uma identidade de 65,09% ao longo de toda a região variável e uma identidade de 68,75% dentro apenas das FR. Quando medidos com respeito à semelhança, estes valores aumentaram para 74,53% globalmente e 80,00% dentro apenas das FR. Consequentemente, em termos gerais, pareceu emparelhar bem numa vasta gama da SEQuências da região variável da cadeia leve kapa humana, contudo, com respeito às FR em particular, foi marginalmente mais idêntico àquelas encontradas dentro do subgrupo I da cadeia leve kapa humana.

A região V_K de BAT-1 de murganho foi depois comparada com todos os exemplos registados das SEQuências individuais de regiões variáveis humanas publicamente disponíveis. A Tabela 3 mostra os quinze melhores emparelhamentos à região V_K de BAT-1 de murganho que foram identificados com esta análise. Globalmente, o algoritmo de pesquisa selecionou a região de V_K humana do anticorpo TEL9 (Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581, 1991) como o emparelhamento mais próximo à região V_K de BAT-1 de murganho (Tabela 4). Esta sequência humana teve uma Identidade global com a região V_K de BAT-1 de 67,93% globalmente e 72,50% dentro apenas das FR. Quando medidos com respeito à semelhança, estes valores aumentaram para 77,36% globalmente e 82,50% dentro apenas das FR. Consequentemente, a região FR variável da cadeia leve kapa TEL9 foi selecionada como a sequência aceitadora humana para a humanização da região variável da cadeia leve kapa do anticorpo BAT-1. Esta tornou-se depois a base da primeira versão humanizada da cadeia leve kapa de BAT-1 (BATR_{K_A}), que compreendeu essencialmente as CDR da região V_K de BAT-1 e as FR da região V_K de TEL9.

O passo seguinte no processo de conceção foi estudar as sequências de aminoácidos da região FR de V_K TEL9 aceitadora humana para determinar se alguns destes resíduos de aminoácidos tinham probabilidade de influenciar adversamente a ligação ao antigénio, diretamente através de interações com o antigénio ou indiretamente através de alteração da conformação ou orientação das ansas de CDR. Isto foi um processo difícil que foi apenas tornado possível com a disponibilidade de um modelo das regiões variáveis de BAT-1, *i. e.*, das regiões V_K e V_H. O processo de modelação será dado em detalhe no Exemplo 5. Não obstante, qualquer aminoácido nas FR de BAT-1 de murganho que pareceu afetar a ligação ao antigénio, foi depois considerado para conservação no anticorpo BAT-1 humanizado. Na decisão de que

resíduos de murino conservar, os seguintes pontos foram considerados:

Tabela 3

Nome	¹ ID	² Vk de BAT de murino vs.	
15 Vk humanas mais homólogas			
		³ SCSCCcccsCccccccsccccCCscsssscscssssccccccC	
Resíduos		1	2
1-36		0123456789012345678901234567	ABCDEF890123456
		⁴ v v	====L1====vv
BAT 100		-QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSARS	-----SVSYMHWF
TEL9 64.8		E.....SSL...V.DR.....R.SQ	_SISN.LN.Y
Vlclone47 63.3		D..M....SSL...V.DR.....R.SQ	_SIS..LN.Y
SiP055 63.3		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	_SVS..LA.Y
039741 63.9		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	_SVS..LA.Y
AC32 63.9		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	_SVS..LA.Y
AC21B 64.5		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	_SVS..LA.Y
B9601(Vg-Jk2) 62.7		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	_SVS..LA.Y
LS1 62.4		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	_SVS..LA.Y
TR1.21 63.0		EL.M....SSL...V.DR.....R.SQ	_SIS..LN.Y
AC18 63.0		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	_SVSG.LA.Y
19.E7 63.6		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	_SVS..LA.Y
STRAb SA-1A 63.0		D.QM....SSL...V.DR.....R.SQ	_SIS..LN.Y
Vlclone49 62.4		D..M....SSL...V.DR.....R.SQ	_SIS..LN.Y
MP6 62.4		D.QM....SSL...V.DR.....R.SQ	_SIS..LN.Y
AC33 63.6		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	_SVG.SLA.Y
		cccscccCsCCCCccccccsSCCScCCCCCSCCSCcccccccs	
Resíduos		4	5
37-80		789012345678901234567890123456789012345678901234567890	
		vvvv==L2==	v v vv v
BAT 100		QQKPGTSPKLWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYCLTISRMEA	
TEL9 64.8		KA...L..AA.T.Q....S.....DFT...NSLQP	
Vlclone47 63.3		KA...L..AA.S.Q....S.....DFT....SLOP	

(continuação)

Nome	¹ ID	² Vk de BAT de murino vs.
15 Vk humanas mais homólogas		
SIP055 63.3	QA.R.L..DA..R.T.I.....	DFT.....SL.P
039741 63.9	QA.R.L..DA..K.T.....	DFT.....SL.P
AC32 63.9	QA.R.L..DA..R.T.I.....	DFT.....SL.P
AC21B 64.5	QA.R.L..DA..R.T.I.....	DFT.....SL.P
B9601(Vg-Jk2) 62.7	QA.R.L..DA..R.T.I.....	DFT.....SL.P
LS1 62.4	..R..QA.R.L..DA..R.T.I.....	DFT.....SL.P
TR1.21 63.0	KA...L..AA...Q...S.....	DFT.....SLQP
AC18 63.0	QA.R.L..D.F.R.T.I.....	DFT.....SL.P
19.E7 63.6	QA.R.L..DA..R.T.I.....	DFT.....SL.P
STRAb SA-1A 63.0	KA...L..AA.S.Q...S.....	DFT.....SLQP
Viclone49 62.4	KA...L..AA.S.Q...S.....	DFT.....SLQP
MP6 62.4	KA...L..AA.S.Q...S.....	DFT.....SLQP
AC33 63.6	OA.R.LV.D...R.T.I.....	DFT.....SL.P
Resíduos	sccccccCcccccc	ccccCcsccccc
81-107	9	10
	123456789012345ABCDEF67890123456A7	
	=====L3=====V	
BAT 100	EDAATYYCQ QRSSFP-----	LTFGSGTKLEI-K
TEL9 64.8	..F.....TN...	G.....
Viclone47 63.3	..F.....SY.T.	G...V...
SIP055 63.3	..F.V.....NW.	R...Q.....
039741 63.9	..F.V.....S.KW.	G...V...
AC32 63.9	..F.V.....NW.P	G...V...
AC21B 64.5	..F.V.....NW.	G...V...
B9601(Vg-Jk2) 62.7	..F.V.....NW.P	Y...Q.....
LS1 62.4	..F.V.....NW.	G...V...
TR1.21 63.0	..F.....SY.T.	F...G...V...
AC18 63.0	..F.V.....Y.W.P	G...V...
19.E7 63.6	..F.V.....NW.	P...VD...
STRAb SA-1A 63.0	..F.....SY.T.	G...V...
Viclone49 62.4	..F.....SY.T.	R...Q...V...
MP6 62.4	..F.....SY.P.PV	Y...Q.....
AC33 63.6	..F.D.....EW.	G...V...

¹ ID - percentagem de identidade das sequências de Vk humana face à região Vk de BAT de murino.

² Um ponto [.] refere-se a um emparelhamento entre Vk de BAT e a Vk da linha germinal de murganho, uma linha [-] refere-se à ausência de aminoácido, resíduos sublinhados nas sequências de Vk humana diferem do seu gene de Vk humana mais próximo.

³ S/C refere-se a aminoácidos posicionados dentro de 5 Å de uma CDR na Superfície ou Núcleo de Fv e s/c refere-se a aminoácidos posicionados a maior distância que 5 Å de uma CDR na superfície ou núcleo de Fv.

³ v refere-se a resíduos de Vernier (Footer *et al.*, J. Mol. Biol. 224:487, 1992) localizados nas FR.

TABELA 4

NOME	¹ ID	² Todos	³ Super- fície	Núcleo	⁴ CDR de Kabat	⁵ FR	³ FR de Super- fície	⁴ FR de Núcleo	⁶ FR perto de CDR
BATVk	100,0	106	23	81	26	80	17	63	32
TEL9	64,8	70	11	59	13	58	10	50	26
V1	63,3	69	11	59	13	57	10	50	26
clone47									
SiP055	63,3	69	11	59	13	57	10	50	26
039741	63,9	69	11	59	13	57	10	50	26
AC32	63,9	69	11	59	13	57	10	50	26
AC21B	64,5	69	11	59	13	57	10	50	26
B9601	62,7	69	11	59	13	57	10	50	26
(Vg-Jk2)									
LS1	62,4	68	11	59	13	57	10	50	26
TR1.21	63,0	68	11	58	13	57	10	50	26
AC18	63,0	68	11	58	13	57	10	50	26
19.E7	63,6	68	11	58	12	57	10	50	26
STRAb	63,0	68	11	58	12	57	10	49	26
SA-1A									
VLclone49	62,4	68	11	58	12	57	10	49	26
MP6	62,4	68	11	58	12	57	10	49	25
AC33	63,6	68	11	58	12	57	10	49	25

(continuação)

NOME	⁷ Vernier	⁸ Vk	⁸ J	Linha Germinal Humana Próxima	⁹ Tamanho L1	Tamanho L2	Tamanho L3	Classe ¹⁰ L1	Classe L2	Classe L3
BATVk	14	94	12		10	7	9	?	1/7A	?
TEL9	12	60	10	DPK8-Vd+	11	Igual	Igual	2/11A	Igual	?
V1	12	60	10	V3b+	11	Igual	Igual	2/11A	Igual	1/9A
clone47										
SiP055	12	60	10	Á7	11	Igual	Igual	2/11A	Igual	1/9A
039741	12	59	10	Á7						
AC32	12	59	10	Á7	11	Igual	10	2/11A	Igual	?
AC21B	12	59	10	Á7	11	Igual	Igual	2/11A	Igual	1/9A
B9601	12	59	10	Á7	11	Igual	10	2/11A	Igual	?
(Vg-Jk2)										
LS1	12	59	10	Á7	11	Igual	Igual	2/11A	Igual	1/9A
TR1.21	12	59	10	V3b+	11	Igual	Igual	?	Igual	1/9A
AC18	12	59	10	Á7	11	Igual	10	2/11A	Igual	?
19.E7	12	59	10	Á7	11	Igual	Igual	2/11A	Igual	1/9A
STRAb	12	59	10	V3b+	11	Igual	Igual	2/11A	Igual	1/9A
SA-1A										
Vlclone49	12	59	10	V3b+	11	Igual	Igual	2/11A	Igual	1/9A
MP6	12	59	10	V3b+	11	Igual		2/11A	Igual	?
AC33	12	59	10	Á7	11	Igual	Igual	2/11A	Igual	1/9A

¹ ID - Percentagem de identidade das sequências Vk humana face à região Vk de BAT de murino

² Todos - número de resíduos idênticos em toda a região Vk humana quando comparado com toda a região de Vk de BAT de murino

³ Superfície (superfície de FR) - número de resíduos (FR) idênticos na superfície

⁴ Núcleo (núcleo de FR) - número de resíduos idênticos dentro do núcleo (FR) do domínio Fv

⁵ CDR/FR - número de resíduos idênticos dentro das CDR ou das FR;

⁶ FR perto de CDR - representa o número de resíduos idênticos entre os aminoácidos de FR dentro de 5Å de uma CDR;

⁷ Vernier - número de resíduos idênticos entre os 14 aminoácidos de vernier (Foote *et al.*, *ibid*);

⁸ V_K (Cadeia J) - número de resíduos idênticos dentro do gene Vk (Cadeia J)

⁹ Tamanho L1 a L3 - número de resíduos em cada CDR

¹⁰ Classe L1 a L3 - classe canónica das CDR de acordo com Martin & Thornton (Martin *et al.*, *ibid*)

- a. Foi muito importante que as estruturas canônicas para as ansas hipervariáveis (Chothia *et al.*, 1987, 1989, 1992 *ibid*; Tramontano *et al.*, *ibid*) fossem conservadas. Consequentemente, foi crucial conservar nas regiões variáveis de BAT-1 humanizado todos os resíduos da FR de murganho que eram parte destas estruturas canônicas.
- b. As sequências das regiões variáveis do anticorpo mBAT-1 foram comparadas com sequências semelhantes de outros anticorpos de murganho para identificar resíduos invulgares ou raros - que podem ter indicado um importante papel na ligação ao antígeno. Isto foi depois investigado utilizando o modelo dos genes da região variável de BAT-1.
- c. Uma análise direta do modelo foi também feita para tentar e prever se algum dos outros resíduos de FR de murganho não presentes nas FR humanizadas podia influenciar, de algum modo, a ligação ao antígeno.
- d. Foram também feitas comparações das sequências aceitadoras humanas individuais para as regiões variáveis da cadeia leve kapa e pesada com as sequências de consenso de subgrupos de regiões variáveis humanas aos quais as sequências aceitadoras pertenciam. A identificação de quaisquer aminoácidos idiossincráticos nas sequências dadoras humanas foi importante uma vez que estas poderiam afetar adversamente a ligação ao antígeno.
- e. Uma vez que as regiões variáveis da cadeia leve e pesada humanas selecionadas seriam derivadas de dois anticorpos humanos diferentes (ver Exemplo 4 para a seleção da sequência aceitadora V_H humana), uma análise cuidadosa dos resíduos de empacotamento interdomínio de ambas as regiões variáveis da cadeia leve kapa dadoras e aceitadoras deve ser realizada. Isto foi porque qualquer falha de empacotamento nesta região poderia ter tido um efeito dramático sobre a

ligação ao antígeno, independentemente da conformação das estruturas de ansa de CDR do anticorpo BAT-1 humanizado.

- f. Por seguimento deste processo de concepção, um número de aminoácidos nas FR de Vk de BAT-1 de murino foi identificado para conservação na segunda versão (BATR_{K_B}) do anticorpo BAT-1 humanizado (Tabela 5). A Tabela 5 proporciona o alinhamento das sequências de aminoácidos que conduzem à concepção da primeira (BATR_{K_A}) e segunda (BATR_{K_B}) versões humanas reformuladas da região variável da cadeia leve kapa do anticorpo BAT-1. Existiam 21 diferenças de aminoácidos entre as FR da região Vk de BAT-1 de murganho dadoras e a região Vk TEL9 humana aceitadora. Contudo, existiam apenas cinco resíduos nas FR humanizadas onde foi considerado necessário mudar o aminoácido presente nas FR humanas para o aminoácido presente nas FR de murganho originais.

Os aminoácidos da região Vk, localizados na interface Vk/V_H como definida por Chothia e colegas (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 186:651, 1985), foram verificados em termos de resíduos invulgares ou raros. A partir desta análise, a única posição de resíduo que levantou algum nível de interesse foi a Phe na posição 36 (Phe36) em FR2. A Tyr (como encontrada em TEL9) foi normalmente vista nesta posição, contudo, em mBAT-1 a Phe estava presente. Além disso, a posição 36 foi uma posição reconhecida para um aminoácido de Vernier (Foote *et al.*, *ibid*). Pensava-se que os resíduos de Vernier eram importantes para a manutenção da conformação da ansa de CDR. Além disso, a Phe não era geralmente vista no subgrupo VI de murganho de Kabat (²¹/₁₅₃), enquanto a Tyr era muito habitualmente vista no subgrupo VI de murganho (¹³¹/₁₅₃) e no subgrupo I humano (⁶⁶/₇₄) (Kabat *et al.*, *ibid*). Consequentemente, pensou-se que uma alteração de Tyr36Phe era apropriada, para mimetizar o empacotamento de interdomínio encontrado em BAT-1, entre as duas regiões variáveis aceitadoras

humanas heterólogas, e também para manter a conformação da ansa de CDR.

TABELA 5

Kabat	Nº	FR ou CDR	V _k de BAT de murga- nho	κ-VI de murganho	κ-I humano	TEL9 aceitador humano	Super- fície ou núcleo	R _{kA} de BAT	R _{kB} de BAT	Comentário
1	1	FR1	Q	Q	D	E	S	<u>E</u>	<u>E</u>	
2	2		I	I	I*	.	C	I	I	Chothia Canónico (L1); Martin Canónico (L1/L3); Vernier
3	3		V	V*	Q	.	S	V	V	Martin Canónico (L3);
4	4		L	L*	M	.	C	L	L	Chothia Canónico (L1/L3); Martin Canónico (L1/L3); Vernier
5	5		T	T	T*	.	C	T	T	
6	6		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	
7	7		S	S*	S*	.	c	S	S	
8	8		P	P*	P*	.	c	P	P	
9	9		A	A*	S*	S	s	S	S	
10	10		I	I*	S	S	C	S	S	
11	11		M	M	L	L	c	<u>L</u>	<u>L</u>	
12	12		S	S	S*	.	c	S	S	
13	13		A	A*	A	.	c	A	A	
14	14		S	S*	S	.	c	S	S	
15	15		P	P	V*	V	s	<u>V</u>	<u>V</u>	
16	16		G	G*	G*	.	c	G	G	
17	17		E	E	D	D	c	<u>D</u>	<u>D</u>	
18	18		K	K*	R	R	s	<u>R</u>	<u>R</u>	
19	19		V	V*	V	.	c	V	V	
20	20		T	T*	T*	.	c	T	T	
21	21		I	M	I*	.	c	I	I	
22	22		T	T*	T	.	C	T	T	
23	23	FR1	C	C*	C*	.	C	C	C	Martin Canónico (L1/L2)
24	24	CD R1	S	s	R	R	s	S	S	

25	25		A	A*	A	.	c	A	A	Chothia Canónico (L1); Martin Canónico (L1)
26	26		R	S*	S	S	s	R	R	
27	27		S	S*	Q	Q	s	S	S	
27A			-	-	S	-	s	-	-	
27B			-	-	L	-	c	-	-	
27C			-	-	V	-	s	-	-	
27D			-	-	x	-	c	-	-	
27E			-	-	x	-	s	-	-	
27F			-	-	-	-	s	-	-	
28			-	-	S	S	s	-	-	Martin Canónico (L3); Não existe aminoácido aqui Em V _k de BAT
29	28		S	S*	I	I	s	S	S	Martin Canónico (L3)
30	29		V	V	S	S	c	V	V	Chothia Canónico (L1); Martin Canónico (L1)
31	30		S	S	N	N	c	S	S	Martin Canónico (L3)
32	31		Y	Y*	Y	.	c	Y	Y	Martin Canónico (L3)
33	32		M	M	L*	L	c	M	M	Chothia Canónico (L1); Martin Canónico (L1/L3)
34	33	CD R1	H	H	A	N	c	H	H	Empacotamento AA
35	34	FR2	W	W*	W*	.	C	W	W	Martin Canónico (L1); Vernier
36	35		F	Y	Y	Y	C	<u>Y</u>	F	Empacotamento AA; Linha Germinal de murganho = Tyr; (Δ1)
37	36		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	
38	37		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	Empacotamento AA
39	38		K	K*	K	.	c	K	K	
40	39		P	S	P*	.	s	P	P	
41	40		G	G	G	.	s	G	G	
42	41		T	T	K	K	c	<u>K</u>	<u>K</u>	Linha Germinal de murganho = Ser
43	42		S	S*	A	A	c	<u>A</u>	<u>A</u>	
44	43		P	P*	P*	.	C	P	P	Empacotamento de núcleo AA
45	<u>44</u>		K	K*	K	.	s	K	K	

46	45		L	R	L	·	C	L	L	Vernier; Empacotamento AA; Linha Germinal de murganho = Pro
47	46		W	W	L*	L	C	<u>L</u>	W	Vernier; (Δ2)
48	47		I	I*	I*	·	C	I	I	Chothia Canónico (L2); Vernier
49	48	FR2	Y	Y*	Y	·	C			Vernier
50	49	CD R2	R	D	A	A	c	R	R	
51	50		T	T	A	A	c	T	T	Chothia Canónico (L2)
52	51		S	S*	S	·	c	S	S	Chothia Canónico (L2)
53	52		N	K	S	T	s	N	N	
54	53		L	L*	L*	·	c	L	L	
55	54		A	A	E	Q	c	A	A	
56	55	CD R2	S	S*	S	·	s	S	S	
57	56	FR3	G	G*	G*	·	S	G	G	
58	57		V	V*	V	·	C	V	V	
59	58		P	P*	P*	·	C	P	P	
60	59		A	A	S*	S	S	<u>S</u>	<u>S</u>	
61	60		R	R*	R*	·	c	R	R	
62	61		F	F*	F*	·	C	F	F	
63	62		S	S*	S	·	C	S	S	
64	63		G	G*	G*	·	C	G	G	Chothia Canónico (L2); Vernier
65	64		S	S*	S	·	C	S	S	
66	65		G	G*	G*	·	C	G	G	Vernier
67	66		S	S*	S	·	S	S	S	
68	67		G	G*	G*	·	C	G	G	Vernier
69	68		T	T	T	·	C	T	T	Vernier
70	69		S	S*	D	D	S	<u>D</u>	<u>D</u>	
71	70		Y	Y	F	F	C	<u>F</u>	Y	Chothia Canónico (L1); Martin Canónico (L2); Vernier; (Δ3)
72	71		C	S*	T	T	C	<u>T</u>	<u>T</u>	Linha Germinal de murganho = Ser
73	72		L	L*	L	·	c	L	L	
74	73		T	T*	T	·	c	T	T	
75	74		I	I*	I	·	c	I	I	
76	75		S	S	S	N	c	<u>N</u>	<u>N</u>	

77	76		R	S	S	S	c	<u>S</u>	<u>S</u>	Linha Germinal de murganho = Ser
78	77		M	M	L*	L	c	<u>L</u>	<u>L</u>	
79	78		E	E*	Q	Q	c	<u>Q</u>	<u>Q</u>	
80	79		A	A*	P	P	s	<u>P</u>	<u>P</u>	
81	80		E	E*	E	•	s	E	E	
82	81		D	D*	D	•	c	D	D	
83	82		A	A	F	F	c	<u>F</u>	<u>F</u>	
84	83		A	A*	A*	•	c	A	A	
85	84		T	T	T	•	c	T	T	
86	85		Y	Y*	Y*	•	c	Y	Y	
87	86		Y	Y*	Y*	•	C	Y	Y	Empacotamento AA
88	87	FR3	C	C*	C*	•	C	C	C	Martin Canónico (L3)
89	88	CD R3	Q	Q	Q	•	c	Q	Q	Martin Canónico (L3); Empacotamento AA
90	89		Q	Q*	Q	•	c	Q	Q	Chothia Canónico (L3); Martin Canónico (L3)
91	90		R	W	I	T	c	R	R	Martin Canónico (L3); Empacotamento AA
92	91		S	S	N	N	c	S	S	Martin Canónico (L3)
93	92		S	S	S	•	c	S	S	Martin Canónico (L3)
94	93		F	N	L	•	c	F	F	Martin Canónico (L3)
95	94		P	P	P	•	c	P	P	Chothia Canónico (L3); Martin Canónico (L3)
95A			–	P	E	–		–	–	
95B			–	M	–	–		–	–	
95C			–	P	–	–		–	–	
95D			–	–	–	–		–	–	
95E			–	–	–	–		–	–	
95F			–	–	E	–		–	–	
96	95		L	L	W	•	c	L	L	Martin Canónico (L3); Empacotamento de núcleo AA
97	96	CD R3	T	T*	T	•	c	T	T	Martin Canónico (L3)

98	97	FR4	F	F*	F*	.	C	F	F	Martin Canónico (L3); Vernier; Empacotamento de núcleo AA.
99	98		G	G*	G*	.	c	G	G	
100	99		S	A	Q	G	s	<u>G</u>	<u>G</u>	
101	100		G	G*	G*	.	c			
102	101		T	T*	T*	.	c			
103	102		K	K*	K	.	c	K	K	
104	103		L	L*	V	.	c	L	L	
105	104		E	E*	E	.	c	E	E	
106	105		I	L	I	.	c	I	I	
106A			-	-	-	-	-	-	-	
107	106	FR4	K	K*	K	.	s	K	K	

Uma segunda alteração foi também decidida na posição 47 em FR2. A Leu muito conservada encontrada na região variável da cadeia leve kapa humana TEL9 foi alterada para uma Trp, como encontrado na região variável da cadeia leve kapa de BAT-1 de murganho. A posição 47 foi outra posição de resíduo de Vernier reconhecida e foi também localizada perto da interface de V_H de acordo com o modelo molecular. Em particular, foi perto de Ala55 em H2 e pode ter estado a interagir com esta. Deste modo, embora a Trp nunca tenha sido vista nesta posição de resíduo de núcleo em sequências de V_H humanas, sentiu-se ser prudente conservá-lo em BATR_{K_B} ao fazer a modificação de Leu47Trp.

A terceira alteração de FR introduzida em BATR_{K_B} foi localizada na posição 71, a qual também foi identificada como uma posição de resíduo de Vernier (Foote *et al.*, o *ibid*), foi também reconhecida como sendo uma das importantes posições de resíduo canónico para a estrutura de ansa L1. Estes resíduos canónicos foram definidos por Chothia e seus colaboradores (Chothia *et al.*, 1987, 1989, 1992 *ibid*; Tramontano *et al.*, *ibid*) como sendo vitais para a conservação da estrutura de ansa de

CDR. Muitos dos aminoácidos canônicos foram localizados dentro das CDR, contudo, um número (tal como 71Tyr) foi também posicionado dentro das FR. Embora a alteração de aminoácido fosse conservadora, a alteração de Phe71Tyr foi considerada crítica para a humanização bem-sucedida da cadeia leve kappa de BAT-1.

Outras versões da região V_K humanizada são:

BAT R_{K_C} : Cys e Ser são semelhantes em tamanho e caráter, e a partir do modelo ambos os aminoácidos na posição 72 em FR3 parecem estar razoavelmente enterrados e apontando para fora a partir da ansa L1. Contudo, no caso do aminoácido Cys, a cadeia lateral de enxofre está exposta, de acordo com o modelo, enquanto de acordo com a base de dados de Kabat (Kabat *et al.*, *ibid*) a presença de Cys nesta posição é um evento único e a Ser é geralmente vista nesta posição (⁴²¹/₁₂₃₄). Consequentemente, BAT R_{K_C} continha as alterações em Tyr36Phe, Leu47Trp e Phe71Tyr (como em BAT R_{K_B}) mais a modificação Ser72Cys aos resíduos das FR de V_K do anticorpo TEL9 aceitador.

BAT R_{K_D} : Evidência a partir do modelo de Fv de BAT-1 de murino sugere que a 70Ser exposta à superfície é um resíduo que pode interagir com a ansa L1. Na cadeia leve kappa TEL9 humana, o aminoácido nesta posição é Asp, que é maior do que Ser e carregado positivamente. A Ser nunca foi vista nesta posição em regiões V_K humanas (sendo o Asp, de longe, o aminoácido mais comum). A proximidade à ansa L1 e a natureza de exposição à superfície de 70Ser sugeriram tentativamente que este possa estar a interagir com L1 ou mesmo com o antigénio diretamente. Consequentemente, foi decidido fazer a alteração de Asp70Ser em BAT R_{K_D} , a qual foi, caso contrário, idêntica à BAT R_{K_C} .

Uma descrição das sequências de aminoácidos de todas as variantes da região V_K do anticorpo BAT-1 humanizado proposta acima é dada na FIG. 5.

Embora tenham sido pesquisados potenciais locais de glicosilação ligados por N, *i. e.*, Asn-Xaa-(Ser/Thr)-Xaa (Gavel *et al.*, Protein Eng. 3:43, 1990) em ambas as regiões V_K humanas aceitadoras e dadoras de murganho, assim como as próprias construções humanizadas, nenhum foi identificado.

Exemplo 4

Conceção das variantes de anticorpo V_H de BAT-1 humanizado

Uma vez mais, o primeiro passo na conceção da região V_H humanizada do anticorpo BAT-1 de murganho foi a seleção da região variável da cadeia pesada humana aceitadora que serviria como a base da região V_H de BAT-1 humanizado. Quando a região V_H de mBAT-1 foi comparada inicialmente com as sequências de consenso dos três subgrupos da região variável da cadeia pesada humana, foi verificado ser a mais semelhante às sequências de consenso para o subgrupo I da cadeia pesada humana, com uma identidade de 61,54% globalmente e uma identidade de 67,82% entre apenas as FR. Quando medidos com respeito à semelhança, estes valores aumentaram também para 70,09% globalmente e 77,01% dentro apenas das FR.

Tabela 6

Nome	ID	V _H de BAT de murino vs.															
15 V _H humanas mais homólogas																	
		scsCccccscScsscccccccCccccCSCCs ccccCCccsss															
Resíduos		1				2				3				4			
1-43		12345678901234567890123456789012345AB67890123															
		v -vvvv===H1==															
BAT	100	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMN--WVKQAPG															
hsighvl295	65.0	.V.....S.....AS.....S.SSHAI. ..R....															
R2C5H	60.3	.V.....S.....AS.....N..ST.AL. .MRR...															
030805	56.8	.V.....A.V....AS..V.....S.DI. ..R...T.															
WIL2	57.7	.V.....A.V....AS..V..E..V...GHY.H ..R....															
21/28	59.7	.V.....A.V....AS..V.....S.A.H ..R....															
UC	57.7	.V.....A.V....AS..V..E.....GHY.H ..R....															
030802	58.2	.V.....A.V....AS..V.....S.A.H ..R....															
039734	57.7	.V.....A.V....AS..V..E.....GHY.H ..G....															
030812	56.3	.V.....A.V....AS..V.....S.Y.H ..R....															
030810	57.9	.V.....A.V....AS..V.....S.Y.H ..R....															
4d275a	71.4	.V.....S.....AS..V.....S.A.. ..G....															
030811	56.0	.V.....A.V....AS..V.....S.Y.H ..R....															
IF10	59.3	.V.....A.V....AS..V.....S.DI. ..R....															
GD9	71.4	.V.....S.....AS..V.....S.A.. ..R....															
039232	59.3	.VH.....S.F....AS..V.....SSVI. ..R....															
		cCCCCccccccsc cscscscscsCCCCCcSccccccccccsc															
Resíduos		5				6				7				8			
44-82		456789012ABC345678901234567890123456789012ABC															
		vvv=====H2=====Kabat- v v v v v															
BAT	100	KGLKWMGWINT- DSGESTYAEFEKGRFAFSLETSANTAYLQINN															
hsighvl295	65.0	Q..Q..... NT.SP...QG.T...V...D..VS.....TS.															
R2C5H	60.3	Q.....L NT.NP...QD.T...V...D..V...F...SS.															
030805	56.8	Q..E....M.P N..NTG..QK.Q..VTMTRN..IS...MELSS.															
WIL2	57.7	Q..E....P N..GTN...K.Q..VTITRD..I...MELSR.															
21/28	59.7	QR.E....A GN.NTK..SQK.Q..VTITRD...S...MELSS.															
UC	57.7	Q..E....P N..GTN..QK.Q..VTITRD..I...MELSR.															
030802	58.2	QR.E....A GN.NTK..SQK.Q..VTITRD...S...MELSS.															
039734	57.7	Q..E....P N..GTN..QK.Q..VTITRD..I...MELSR.															

(continuação)

Nome	ID	V _H de BAT de murino vs.	
15 V _H humanas mais homólogas			
030812	56.3	Q..E...I..P	SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.
030810	57.9	Q..E...I..P	SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.
4d275a	71.4	Q..E.....	NT.NP...QG.T...V...D..VS.....CS.
030811	56.0	Q..E...I..P	SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.
IF10	59.3	Q..E...M.P	N..NTG..QK.Q..VTMTRN..IS...MELSS.
GD9	71.4	Q..E.....	NT.DP...QG.T...V...D..VS.....SS.
039232	59.3	Q..E.....	NT.NP...QG.T...V...D..VT.T.....S.
Resíduos		9	10
83-113		345678901234567890	ABCDEFGHIJK1234567890123
		vv=====H3=====v	
BAT	100	NNEDTATYFCVRVGYDA-----	LDYWGQGTSVTVSS
hsighv1295	65.0	TA...GM...AKESHSSALDL	-.....L.....
R2C5H	60.3	QA....V.Y.AKPKRGTYRRGYYYYP	M.V.....T.....
030805	56.8	RS....V.Y.A.G..VWGSYRYTA	AF.I.....M.....
WIL2	57.7	RSD...V.Y.A.AS.CGYDCYY	FF.....L.....
21/28	59.7	RS....V.Y.A.G..YGS GS	-N.....L.....
UC	57.7	RSD...V.Y.A.AS.CGYDCYY	FF.....L.....
030802	58.2	RS....V.Y.A..KWEQPIDAP	F.....L.....
039734	57.7	RSD...V.Y.A.AS.CGYDCYYF	F.....L.....
030812	56.3	RS....V.Y.A.D..YYDSNGYYSG	YF.....L.....
030810	57.9	RS....V.Y.A..QWLGLTGPN	-.....L.....
4d275a	71.4	KA....V.Y.A.-----	-----
030811	56.0	RS....V.Y.A.D.IVVVPAAI PH	YF.....L.....
IF10	59.3	RS....V.Y.A.NNGSY	YF.....L.....
GD9	71.4	KA....V.Y.A.-----	-----
039232	59.3	KA....V.Y.A.ELRNDHYVWXNYRPPLS-	-----

A região V_H de BAT-1 de murganho foi depois comparada a todos os exemplos registrados da SEQuências individuais de regiões variáveis humanas publicamente disponíveis. As Tabelas 6 e 7 mostram que os quinze melhores emparelhamentos com a região V_H de BAT-1 de murganho que foram identificados através desta análise. Globalmente, o algoritmo de pesquisa selecionou a região de V_H humana do anticorpo hsighv1295 (Fang et al., J. Exp. Med. 179:1445, 1994) como o emparelhamento mais próximo com a região V_H de BAT-1 de murganho. Esta região V_H humana teve uma

identidade global com região V_H de BAT-1 de 69,23% (Tabela 7), um valor que aumentou para 74,71% quando foram comparadas as FR sozinhas. Quando medidos com respeito à semelhança, estes valores aumentaram 75,21% globalmente e 79,31% dentro apenas das FR. Esta FR humana tornou-se assim a base da versão humanizada da cadeia pesada de BAT-1.

TABELA 7

NOME	ID	Todos	Super- fície	Núcleo	CDR de Kabat	FR	FR de Super- fície	FR de Núcleo	FR perto de CDR
BAT V _H	100	117	26	86	30	87	18	68	27
Hsighv12	65,0	78	17	63	17	65	14	51	22
95									
R2C5H	60,3	76	16	59	17	64	14	49	20
030805	56,8	71	16	56	14	59	13	47	19
WIL2	57,7	71	15	56	13	59	13	46	19
21/28	59,7	71	15	55	13	59	13	46	19
UC	57,7	71	15	55	13	59	13	46	19
030802	58,2	71	15	55	13	59	13	46	19
039734	57,7	71	15	55	13	57	13	46	19
030812	56,3	71	15	55	13	58	13	46	18
030810	57,9	70	15	55	13	58	13	46	17
4d275a	71,4	70	15	54	13	58	13	46	18
030811	56,0	70	15	54	13	58	13	46	18
IF10	59,3	70	15	54	13	58	13	46	18
GD9	71,4	70	15	54	11	58	13	46	18
039232	59,3	70	15	54	13	58	13	46	18

(continuação)

NOME	Vernier	V _H	J	Linha Germinal Humana Próxima	Tamanho H1	Tamanho H2	Tamanho H3	Classe H1	Classe H2
BAT V _H	16	98	19		5	17	8	?	?
Hsighv12	13	70	14	VI-4,1b+	Igual	Igual	11	1/10A	2/10A
95									
R2C5H	13	70	14	VI-4.1b+	Igual	Igual	17	Igual	Igual
030805	11	66	14	DP-15-V18+					
WIL2	11	65	14	DP-8+	Igual	Igual	14	1/10A	Igual
21/28	11	64	14	DP-25-VI3b+	Igual	Igual	10	1/10A	Igual
UC	11	62	14	DP-8+	Igual	Igual	14	1/10A	Igual
030802	11	62	14	DP-25-VI3b+					
039734	11	62	14	Dp-8+					
030812	11	60	14	hvlf10t					
030810	11	59	14	hvlf10t					
4d275a	11	59	14	DP-21-4d275a+	Igual	Igual	0	Igual	Igual
030811	11	59	14	hvlf10t					
IF10	11	59	14	DP-15-V18+	Igual	Igual	9	Igual	Igual
GD9	11	58	14	VI-4.1b+	Igual	Igual	0	Igual	2/10A
039232	11	58	14	VI-4.1b+					

¹ ID - Percentagem de identidade das sequências V_H humana face à região V_H de BAT de murino

² Todos - número de resíduos idênticos em toda a região V_H humana quando comparado com toda a região de V_H de BAT de murino

³ Superfície (superfície de FR) - número de resíduos (FR) idênticos na superfície

⁴ Núcleo (núcleo de FR) - número de resíduos idênticos dentro do núcleo (FR) do domínio Fv

⁵ CDR/FR - número de resíduos idênticos dentro das CDR ou das FR;

⁶ FR perto de CDR - representa o número de resíduos idênticos entre os aminoácidos de FR dentro de 5Å de uma CDR;

⁷ Vernier - número de resíduos idênticos entre os 14 aminoácidos de vernier (Foote et al., *ibid*);

⁸ V_H (Cadeia J) - número de resíduos idênticos dentro do gene V_H (Cadeia J)

⁹ Tamanho L1 a L3 - número de resíduos em cada CDR

¹⁰ Classe L1 a L3 - classe canónica das CDR de acordo com Martin & Thornton (Martin et al., *ibid*)

O passo seguinte no processo de concepção foi estudar as sequências de aminoácidos das FR da região V_H de hsighv1295 aceitadora humana para determinar se alguns destes resíduos de aminoácidos tinham probabilidade de influenciar adversamente a ligação ao antigénio. Uma vez mais, os modelos moleculares construídos por OML (ver Exemplo 5) foram cruciais para este processo de concepção, a partir do qual um número de aminoácidos nas FR da região V_H de BAT-1 de murino foi identificado para conservação na primeira (BATRH_A) e subsequentes versões do anticorpo BAT-1 humanizado (Tabela 8). Existiam 22 diferenças de aminoácidos entre as FR do BAT-1 de murganho dadoras e as regiões V_H hsighv1295 humana aceitadoras e até nove resíduos de murino foram considerados para conservação nas FR humanizadas.

BATRH_A consistiu, assim, das CDR da região V_H do anticorpo BAT-1 de murganho introduzidas geneticamente nas FR da região V_H do anticorpo hsighv1295 humano. Isto foi a versão enxertada com CDR da região V_H do anticorpo BAT-1 humanizado e não continha, de modo algum, alterações de aminoácidos de FR.

Em BATRH_B, os aminoácidos nas posições 28 e 30 em FR1 da sequência BAT-1 de murganho (*i. e.*, Thr e Thr, respetivamente) substituíram os correspondentes aminoácidos de hsighv1295 humano (*i. e.*, Ser e Ser, respetivamente) na região variável da cadeia pesada do BAT-1 humanizado. Isto foi feito porque representavam alguns dos resíduos canónicos importantes para a conformação da ansa H1 hipervariável (Chothia *et al.*, *ibid* 1992). Os resíduos canónicos foram considerados críticos para a correta orientação e estrutura de ansas hipervariáveis e foram em termos genéricos sempre conservados numa região variável humanizada. Além disso, as posições de resíduo 27-30 foram consideradas parte da própria ansa H1 e foram assim ainda mais críticas para a correta conformação e orientação desta ansa - justificando a sua

conservação ainda mais fortemente. Assim, estas duas posições de resíduo representaram a soma das alterações feitas às FR da sequência de hsighv1295 humana em BATRH_B.

O passo seguinte no processo de concepção foi estudar as sequências de aminoácidos das FR da região V_H de hsighv1295 aceitadora humana para determinar se alguns destes resíduos de aminoácidos tinham probabilidade de influenciar adversamente a ligação ao antigénio. Uma vez mais, os modelos moleculares construídos por OML (ver Exemplo 5) foram cruciais para este processo de concepção, a partir do qual um número de aminoácidos nas FR da região V_H de BAT-1 de murino foi identificado para conservação na primeira (BATRH_A) e subsequentes versões do anticorpo BAT-1 humanizado (Tabela 8). Existiam 22 diferenças de aminoácidos entre as FR do BAT-1 de murganho dadoras e as regiões V_H hsighv1295 humana aceitadoras e até nove resíduos de murino foram considerados para conservação nas FR humanizadas.

BATRH_A consistiu, assim, das CDR da região V_H do anticorpo BAT-1 de murganho introduzidas geneticamente nas FR da região V_H do anticorpo hsighv1295 humano. Isto foi a versão enxertada com CDR da região V_H do anticorpo BAT-1 humanizado e não continha, de modo algum, alterações de aminoácidos de FR.

Em BATRH_B, os aminoácidos nas posições 28 e 30 em FR1 da sequência BAT-1 de murganho (*i. e.*, Thr e Thr, respetivamente) substituíram os correspondentes aminoácidos de hsighv1295 humano (*i. e.*, Ser e Ser, respetivamente) na região variável da cadeia pesada do BAT-1 humanizado. Isto foi feito porque representavam alguns dos resíduos canónicos importantes para a conformação da ansa H1 hipervariável (Chothia *et al.*, *ibid* 1992). Os resíduos canónicos foram considerados críticos para a correta orientação e estrutura de ansas hipervariáveis e foram em termos genéricos

sempre conservados numa região variável humanizada. Além disso, as posições de resíduo 27-30 foram consideradas parte da própria ansa H1 e foram assim ainda mais críticas para a correta conformação e orientação desta ansa - justificando a sua conservação ainda mais fortemente. Assim, estas duas posições de resíduo representaram a soma das alterações feitas às FR da sequência de hsighv1295 humana em BATRH_B.

TABELA 8

Kabat	Nº	FR ou CDR	V _H de BAT de murgan- ho	Misc. de murgan- ho	I de humano	hsighv 1295 Humano Acei.	Super- fície ou núcleo	RH _A de BAT	RH _B de BAT	RH _C de BAT	Comentário
1	1	FR1	Q	E	Q	•	s	Q	Q	Q	
2	2		I	V*	V	V	c	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	Martin Canónico (H1); Vernier
3	3		Q	Q	Q	•	s	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L*	•	C	L	L	L	Martin Canónico (H1)
5	5		V	Q*	V	•	c	V	V	V	
6	6		Q	Q*	Q	•	c	Q	Q	Q	
7	7		S	S	S*	•	c	S	S	S	
8	8		G	G	G*	•	c	G	G	G	
9	9		P	A*	A	S	S	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	
10	10		E	E	E	•	c	E	E	E	
11	11		L	L*	V	•	S	L	L	L	
12	12		K	V*	K	•	c	K	K	K	
13	13		K	K	K*	•	s	K	K	K	
14	14		P	P*	P*	•	s	P	P	P	
15	15		G	G	G*	•	c	G	G	G	
16	16		E	A	A	A	c	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	
17	17		T	S*	S*	S	c	S	S	S	
18	18		V	V*	V	•	c	V	V	V	
19	19		K	K*	K	•	s	K	K	K	
20	20		I	L	V	•	c	I	I	I	Martin Canónico (H1)
21	21		S	S	s	•	c	S	S	S	
22	22		C	C	C*	•	C	C	C	C	Martin Canónico (H1)
23	23		K	T	K	•	c	K	K	K	

24	24		A	A*	A	.	c	A	A	A	Chothia Canónico (H1); Martin Canónico (H1)
25	25		S	S	S*	.	c	S	S	S	
26	26		G	G	G*	.	c	G	G	G	Chothia Canónico (H1); Martin Canónico (H1)
27	27		Y	P*	Y	.	C	Y	Y	Y	Chothia Canónico (H1); Vernier
28	28		T	N	T	S	S	<u>S</u>	T	T	Vernier; ($\Delta 1$)
29	29		F	I*	F*	.	C	F	F	F	Chothia Canónico (H1); Martin Canónico (H1); Vernier
30	30	FR 1	T	K	T	S	C	<u>S</u>	T	T	Vernier; ($\Delta 2$)
31	31	CDR 1	N	D	S	S	s	N	N	N	
32	32		Y	T	Y	H	c	Y	Y	Y	Martin Canónico (H1)
33	33		G	I*	A	A	c	G	G	G	Martin Canónico (H1/H2)
34	34		M	M	I	I	c	M	M	M	Chothia Canónico (H1) Martin Canónico (H1)
35	35		N	H	S	-	c	N	N	N	Martin Canónico (H1); Empacotamento AA.
35a			-	-	-	-	-	-	-	-	
35b		CDR 1	-	-	-	-	-	-	-	-	
36	36	FR 2	W	W	W*	.	C	W	W	W	Martin Canónico (H1)
37	37		V	V*	V	.	C	V	V	V	Empacotamento AA.
38	38		K	K	R*	R	C	<u>R</u>	<u>R</u>	R	
39	39		Q	Q	Q*	.	c	Q	Q	Q	Empacotamento AA.
40	40		A	R	A	.	c	A	A	A	
41	41		P	P	P	.	s	P	P	P	
42	42		G	E*	G*	.	s	G	G	G	
43	43		K	Q*	Q	Q	s	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	
44	44		G	G*	G	.	c	G	G	G	
45	45		L	L	L*	.	C	L	L	L	Empacotamento do núcleo AA.
46	46		K	E	E*	Q	c	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	

47	47		W	W	W*	.	C	W	W	W	Martin Canónico (H2); Empacotamento AA.
48	48		M	I*	M	.	C	M	M	M	Martin Canónico (H1)
49	49	FR2	G	G*	G*	.	C	G	G	G	
50	50	CDR 2	W	R	W	.	c	W	W	W	Martin Canónico (H2)
51	51		I	I	I	.	c	I	I	I	Martin Canónico (H1/H2)
52	52		N	D*	N	.	c	N	N	N	Martin Canónico (H2)
52a	53		T	P*	P	.	c	T	T	T	Chothia Canónico (H2) Martin Canónico (H2)
52b			-	-	I	-		-	-	-	Martin Canónico (H2)
52c			-	-		-		-	-	-	Martin Canónico (H2)
53	54		D	A	G	N	s	D	D	D	Martin Canónico (H2)
54	55		S	N	N	T	c	S	S	s	Martin Canónico (H2)
55	56		G	G	G	.	c	G	G	G	Chothia Canónico (H2); Martin Canónico (H2)
56	57		E	N	D	S	s	E	E	E	Martin Canónico (H2)
57	58		S	T	T	P	c	S	S	S	
58	59		T	K	N	.	c	T	T	T	Martin Canónico (H2)
59	60		Y	Y	Y	.	c	Y	Y	Y	Martin Canónico (H2)
60	61		A	D	A	.	c	A	A	A	
61	62		E	P*	Q	Q	s	E	E	E	
62	63		E	K*	K	G	s	E	E	E	
63	64		F	F*	F	.	c	F	F	F	
64	65		K	Q*	Q	T	s	K	K	K	
65	66	CDR 2	G	G	G	.	s	G	G	G	
66	67	FR3	R	K	R	.	C	R	R	R	
67	68		F	A	V	.	C	F	F	F	
68	69		A	T*	T	V	C	V	V	V	
69	70		F	I	I	.	C	F	F	F	Martin Canónico (H1/H2)
70	71		S	T*	T	.	C	S	S	S	

71	72		L	A*	A	.	C	L	L	L	Chothia Canónico (H2); Martin Canónico (H2)
72	73		E	D	D	D	c	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	
73	74		T	T*	T	.	S	T	T	T	
74	75		S	S*	S*	.	s	S	S	S	
75	76		A	S*	T	V	c	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	
76	77		N	N*	S	S	c	<u>S</u>	<u>S</u>	N	(Δ3)
77	78		T	T*	T	.	c	T	T	T	
78	79		A	A*	A	.	c	A	A	A	Martin Canónico (H1/H2)
79	80		Y	Y*	Y	.	c	Y	Y	Y	
80	81		L	L	M	.		L	L	L	Martin Canónico (H1)
81	82		Q	Q*	E	.	c	Q	Q	Q	
82	83		I	L*	L	.	c	I	I	I	
82a	84		N	S*	S	T	c	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	
82b	85		N	S*	S	S	s	<u>S</u>	<u>S</u>	s	
82c	86		L	L	L*	.	c	L	L	L	
83	87		N	T*	R	T	c	<u>T</u>	T	<u>T</u>	
84	88		N	S*	S	A	s	A	A	<u>A</u>	
85	89		E	E*	E	.		E	E	E	
86	90		D	D*	D*	.	c	D	D	D	
87	91		T	T*	T	.	c	T	T	T	
88	92		A	A	A	G	c	G	G	G	
89	93		T	V	V	M	c	<u>M</u>	<u>M</u>	<u>M</u>	
90	94		Y	Y	Y*	. .	c	Y	Y	Y	Martin Canónico (H1)
91	95		F	Y*	Y C*	.	C	F	F	F	Empacotamento AA.
92	96		C	C		.	C	C	C	C	Martin Canónico (H1)
93	97		V	A	A*	A	C	<u>V</u>	<u>V</u>	A	Empacotamento AA; (Δ4)
94	98	FR 3	R	R	R	K	C	R	R	K	Chothia Canónico (H1); Martin Canónico (H1); (Δ5)
95	99	CDR 3	V	G	A			V	V	V	Empacotamento AA.
96	100		G	I	P			G	G	G	
97	101		Y	L	G	H	s	Y	Y	Y	
98	102		D	R	I	S	s	D	D	D	
99	103		A	R	G	S	c	A	A	A	
100			-	D	S	A		-	-	-	
100a			-	-	G	L		-	-	-	

100b			-	-	G	D		-	-	-	
100c			-	-	G	-		-	-	-	
100d			-	-	C	-		-	-	-	
100e			-	-	I	-		-	-	-	
100f			-	-	R	-		-	-	-	
100g			.	-	G	-		.	.	.	
100h			.	-	D	-		.	.	.	
100i			.	-	I	-		.	.	.	
100j			.	-	x	-		.	.	.	
100k	104		L	-	F	.	c	L	L	L	Empacotamento de núcleo AA.
101	105		D	D	D	.	c	D	D	D	
102	106	CDR 3	Y	Y	Y	.	c	Y	Y	Y	Martin Canónico (H1)
103	107	FR4	W	W	W*	.	C	W	W	W	Empacotamento de núcleo AA.
104	108		G	G	G	.	c	G	G	G	
105	109		Q		Q	.	s	Q	Q	Q	
106	110		G	G	G*	.	c	G	G	G	
107	111		T	T*	T	.	c	T	T	T	
108	112		S	S	L	L	c	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	
109	113		V	V	V*	.	c	V	V	V	
110	114		T	T	T	.	c	T	T	T	
111	115		V	V*	V*	.		V	V	V	
112	116		S	S	S*	.		S	S	S	
113	117	FR4	S	S	S*	.		S	S	S	

A terceira versão da região V_H de BAT-1 humanizado (BATRH_C) incorporou todas as substituições feitas em BATRH_B e, além disso, continha três aminoácidos adicionais de murino, que foram introduzidos nas FR humanas em lugar dos resíduos humanos correspondentes. O primeiro destes foi o aminoácido Asn localizado na posição 76 em FR3. De acordo com o modelo molecular da região Fv de BAT-1, o resíduo de Asn estava perto de H1 de CDR e pode ter vindo a suportar a estrutura de ansa. Além disso, na região V_H de BAT-1 de murganho, a Asn estava exposta à superfície e é maior do que a Ser nas FR do hsinh1295

humano. Consequentemente, uma substituição de Ser76Asn foi feita na FR.

Uma alteração adicional foi feita ao aminoácido na posição 94 em FR3 da região V_H , uma posição de resíduo que tinha sido previamente identificada por Chothia *et al.* (Chothia *et al.*, *ibid* 1992), assim como por Martin e Thornton (Martin *et al.*, *ibid*), como importante para a conformação da ansa H3. Além disso, o modelo molecular indicou que a Arg94 poderia formar uma ponte salina com Asp101 em H3 de CDR, estabilizando a estrutura da ansa. Consequentemente, a Arg no murganho substituiu a Lys no humano nesta posição de resíduo. Uma modificação final foi também feita na posição 93 em FR3 onde a Ala humana foi substituída pelo aminoácido Val de murino. Este resíduo foi considerado um resíduo de empacotamento, como definido por Chothia (Chothia *et al.*, 1985 *ibid*), importante para o correto empacotamento das regiões V_K e V_H . Além disso, esta foi identificado como uma posição de resíduo de Vernier e, deste modo, importante para manter a conformação de ansa de CDR, uma classificação confirmada por uma análise do modelo molecular. Tomados em conjunto, todos os dados e a análise molecular sugeriram que era apropriado conservar estes três resíduos de murino na região V_H humanizada de BATRH_C, *i. e.*, Ser76Asn, Ala93Val e Lis94Arg.

A construção das seguintes duas variantes humanizadas da região V_H de BAT-1 dependeu da afinidade de ligação destas três primeiras versões humanizadas, *i. e.*, BATRH_A, BATRH_A e BATRH_C. Se todas as três falhassem em apresentar um nível adequado de ligação, então as versões BATRH_D e BATRH_E seriam sintetizadas e testadas.

A versão D da região V_H de BAT-1 humanizado (BATRH_D) incorporou todas as substituições feitas em BATRH_C e, além disso, continha um aminoácido de murganho adicional localizado na posição 2 em FR1. Esta posição foi definida como uma posição de resíduo canônico (Martin *et al.*, *ibid*) e de Vernier (Foote *et al.*, *ibid*). Além disso, a partir do modelo da região variável de BAT-1, o aminoácido Ile de murino estava perto de Tyr27 em FR1, o que é ela própria parte da estrutura da ansa H1. Inversamente, a Ile de murino e os aminoácidos Val de humano, nesta posição nas FR de murganho e humanas, foram semelhantes em caráter e apenas ligeiramente diferentes em tamanho, *i. e.*, a Ile tem um grupo metilo extra. Deste modo, foi decidido fazer a alteração Val2Ile apenas nesta fase do processo de humanização e incorporar a mutação na versão BATRH_D.

A versão final da região variável da cadeia pesada de BAT-1 humanizado (BATRH_E) incorporou todas as substituições de FR de murganho feitas em BATRH_D juntamente com três alterações de aminoácidos adicionais nas posições 38 (FR2), 46 (FR2) e 68 (FR3).

A modificação Arg38Lys foi feita porque o modelo sugeriu que a Arg, enterrada profundamente no núcleo da região V_H , estava perto de Phe63 na H2 de CDR. Contudo, esta não era uma posição de resíduo canônico ou de Vernier previamente identificada. Além disso, a Arg e a Lys são relativamente semelhantes em estrutura, embora a Arg seja mais volumosa, e assim o significado de qualquer alteração de aminoácido foi difícil de julgar. Consequentemente, isto foi considerado como apenas uma possibilidade experimental e a substituição foi apenas feita se fosse encontrado que a afinidade de ligação do anticorpo BAT-1 humanizado era fraca. A mesma fundamentação estava também atrás da seleção da modificação Gln46Lys. O aminoácido Lys estava

metade enterrado, de acordo com o modelo molecular, mas perto de Glu62 e de Phe63 na H2 de CDR. Existia uma fraca possibilidade que o resíduo maior, carregado, Lys46 poderia interagir com o antigénio diretamente, deste modo foi conservado em BATRH_E. O caso para preservar o aminoácido 68Ala de murino foi relacionado com a sua proximidade a H2 de CDR, particularmente ao resíduo Tyr59 na ansa H2 e à possibilidade dela influenciar assim a estrutura da ansa. A Ala era improvável de ser importante devido ao seu pequeno tamanho, contudo a Val maior, encontrada nas FR de h5ighv1295 humano, poderia afetar adversamente a estrutura da ansa H2 e, assim, foi substituída com o resíduo Ala de murino.

Uma descrição das sequências de aminoácidos de todas as variantes da região V_H humanizada propostas acima é dada na FIG. 6.

Embora tenham sido pesquisados potenciais locais de glicosilação ligados a N, *i. e.*, Asn-Xaa-(Ser/Tr)-Xaa (Gavel *et al.*, *ibid*) em ambas as regiões V_H humana aceitadora e dadora de murganho, assim como as próprias construções humanizadas, nenhuma foi identificada.

Exemplo 5

Modelação molecular do domínio Fv de BAT-1 de murino e humanizado

Para ajudar a conceção das regiões variáveis humanizadas do anticorpo BAT-1, foi construído um modelo molecular das regiões variáveis dos anticorpos de murino e humanizados. A modelação destas estruturas foi conseguida utilizando os métodos estabelecidos para modelação por homologia e técnicas *ab initio*.

Isto foi feito utilizando o pacote de modelação molecular da *AbM*, que foi fornecido e utilizado pela Oxford Molecular Limited (OML). As estruturas cristalográficas de raio X de anticorpo da base de dados Brookhaven disponíveis foram formatadas para permitir que sejam utilizadas para modelar com *AbM*.

As FR das regiões variáveis de BAT-1 foram modeladas em FR de regiões variáveis de imunoglobulina semelhantes, estruturalmente resolvidas. Enquanto as cadeias laterais de aminoácidos idênticos foram mantidas na sua orientação original, as cadeias laterais desemparelhadas foram substituídas como na região Fv de BAT-1 original. Os átomos estruturais da região Vk de FAB17-IA foram utilizados para o modelo da região Vk de BAT-1, enquanto as FR da região V_H de 409,5,3 foram utilizadas para modelar a região V_H de BAT-1 (códigos PDB Brookhaven 1for e liai, respetivamente). Estas sequências representaram ambos bons emparelhamentos para as sequências da região variável do anticorpo BAT-1 de murino e as suas variantes humanizadas. As identidades para as sequências de mBAT-1 e humanizadas variaram desde 73% a 92% para as sequências da região Vk e entre 65% e 79% para sequências da região V_H. O teste de *AbM* com estruturas conhecidas mostrou que a homologia da estrutura da FR é um fator importante na qualidade de qualquer modelo, uma vez que a utilização de estruturas FR que emparelham mal com uma sequência a ser modelada pode afetar significativamente e adversamente a posição e orientação da estrutura de ansa de CDR.

Para a estrutura central da ansa L1, as conformações de ansa da região Vk de BAT-1 de murino e da sequência de BATRk_B humanizado (FIG. 5) foram tomadas a partir de classes canónicas utilizadas por *AbM*. Estas classes canónicas são baseadas naquelas descritas por Chothia e seus colegas, mas foram

modificadas para tomar em consideração estruturas que se tornaram disponíveis desde que os artigos originais foram publicados (Chothia *et al.*, 1987, 1989, 1992 *ibid*; Tramontano *et al.*, *ibid*). O teste do desempenho de previsões de *AbM* para estruturas de ansa conhecidas mostrou que as ansas de CDR que são criadas deste modo são geralmente modeladas com muito rigor, *i. e.*, dentro do desvio de 1-1,5Å RMS. Para a sequência de região V_K de $BATrK_A$, a substituição da Phe para Tyr na posição 71 (em FR3) significou que não se ajustava mais a classe canônica (classe 1) observada na região V_K de murino e na região V_K de $BATrK_B$ humanizado. A Tyr71 teve um papel importante na conformação da ansa L1, contudo, análise das estruturas modeladas sugeriu que foi o empacotamento da ansa L1 contra o anel aromático de Tyr que era a característica chave do resíduo. Assim, havia razão para acreditar que a Phe poderia também desempenhar esta função. Além disso, a partir dos modelos parecia não existir fortes interações com o grupo hidroxilo de Tyr71. Consequentemente, existia uma possibilidade de que a substituição de Tyr com Phe poderia muito bem não afetar a conformação real da ansa L1.

Para as estruturas centrais das CDR L2, L3, H1 e H2, as conformações para todos os modelos foram tomados a partir de classes canônicas definidas por *AbM* sem modificação.

A ansa H3 na região V_H de BAT-1 tinha oito resíduos de comprimento, desta forma foram utilizados dois métodos para prever a estrutura da ansa H3. Foi utilizada uma pesquisa à base de dados para as conformações de estrutura para ambos os métodos, mas além disso, a conformação dos cinco resíduos centrais no modelo foram pesquisados mais exaustivamente utilizando uma pesquisa CONGEN (Bruccoleri, *ibid*). Embora isto tenha demorado mais tempo a ser computado, produziu

tranquilizadamente uma conformação que foi muito semelhante às aquelas identificadas a partir da pesquisa de bases de dados.

Após ajustar a totalidade do modelo para impedimentos estéricos óbvios, foi finalmente sujeito a minimização energética, como implementada em MACROMODEL, para aliviar contatos atômicos desfavoráveis e para otimizar interações de van der Waals e eletrostáticas.

Exemplo 6

Construção de variantes da cadeia leve de BAT-1 humanizado

Como com todos os exemplos, foi seguido um protocolo estrito de clonagem por PCR e sequenciação. Isto foi feito para minimizar a possibilidade de introduzir erros nas versões humanizadas. A construção dos genes da região variável da cadeia leve kapa de BAT-1 humanizado (*i. e.*, BATR_{K_A}, BATR_{K_B} e BATR_{K_D}) produziu um produto de aproximadamente 425 pb que foi depois subclonado em pCR2.1™. As reações de PCR foram estabelecidas utilizando os iniciadores descritos nas Tabelas 9 e 10.

TABELA 9

Nome do Iniciador	SEQ ID Nº	Oligonucleótido utilizado na construção das várias versões humanizadas do gene da região variável da cadeia leve kapa do anticorpo BAT-1 (5'→3')
BATR _{K.1}	30	CCCAAGCTTGCCGCCACCATG GACATGAGGGTCCCCGCTCAG C
BATR _{K.2}	31	TCCTGGGGCTCCTGCTGCTCT GGCTCCCAGGTGCCAAATG
BATR _{K.3}	32	TGAAATTGTGTTGACGCAGTC TCCATCCTCCCTGTCTGCA
BATR _{K.4}	33	TCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGCAGTGCCAGGT
BATR _{K.5}	34	CAAGTGTAAGTTACATGCACT GGTATCAGCAGAAACCAGG
BATR _{K.6}	35	GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGAT CTATAGGACATCCAACCTG
BATR _{K.7}	36	GCTTCTGGGGTCCCATCTAGA TTCAGCGGCAGTGGATCTG
BATR _{K.8}	37	GGACAGATTTCACCTCTACCA TCAACAGCCTGCAGCCTGA
BATR _{K.9}	38	AGATTTTGCAACTTACTATTG CCAGCAAAGGAGTAGTTTC

(continuação)

BATR κ .10	39	CCACTCACGTTTCGGCGGAGGG ACCAAGCTGGAGATCAAACGT GAGTGGATCCGCG
BATR κ .11	40	GAGCAGCAGGAGCCCCAGGAG CTGAGCGGGGACCCTCATG
BATR κ .12	41	ACTGCGTCAACACAATTTAC ATTTGGCACCTGGGAGCCA
BATR κ .13	42	GTGACTCTGTCTCCTACAGAT GCAGACAGGGAGGATGGAG
BATR κ .14	43	GTGCATGTAACCTTACACTTGACCTGGCACTGCAAGTGATG
BATR κ .15	44	TCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCTGCTGATACCA
BATR κ .16	45	CTAGATGGGACCCCAGAAGCCAGGTTGGATGTCCTATAGA
BATR κ .17	46	GGTGAGAGTGAAATCTGTCCCAGATCCACTGCCGCTGAAT
BATR κ .18	47	AATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGTTGAT
BATR κ .19	48	CCTCCGCCGAACGTGAGTGGGAACTACTCCTTTGCTGGC
BATR κ .20	49	CGCGGATCCACTCACGTTTGATCTCCAGCTTGGTC
BATR κ .5B	50	CAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTTCCAGCAGAAACCAGG
BATR κ .6B	51	GAAAGCCCCCTAAGCTCTGGATCTATAGGACATCCAACCTG
BATR κ .8B	52	GGACAGATTACACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGA
BATR κ .15B	53	TCCAGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCTGCTGGAACCA
BATR κ .17B	54	GGTGAGAGTGTAATCTGTCCCAGATCCACTGCCGCTGAAC
BATR κ .17D	55	GGTGAGACAGTAAGATGTCCCAGATCCACTGCCGCTGAAC
BATR κ .8D	56	GGACATCTTACTGTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGA

TABELA 10

Variante de BAT-1 humanizado	Combinações de iniciador oligonucleotídico ¹ utilizadas para a construção da cadeia leve kapa de cada variante ²				
BATRκ_A	BATR κ .1	BATR κ .2	BATR κ .3	BATR κ .4	BATR κ .5
	BATR κ .6	BATR κ .7	BATR κ .8	BATR κ .9	BATR κ .10
	BATR κ .11	BATR κ .12	BATR κ .13	BATR κ .14	BATR κ .15
	BATR κ .16	BATR κ .17	BATR κ .18	BATR κ .19	BATR κ .20
BATRκ_B	BATR κ .1	BATR κ .2	BATR κ .3	BATR κ .4	BATR κ .5B
	BATR κ .6B	BATR κ .7	BATR κ .8B	BATR κ .9	BATR κ .10
	BATR κ .11	BATR κ .12	BATR κ .13	BATR κ .14	BATR κ .15B
	BATR κ .16	BATR κ .17B	BATR κ .18	BATR κ .19	BATR κ .20
BATRκ_D	BATR κ .1	BATR κ .2	BATR κ .3	BATR κ .4	BATR κ .5B
	BATR κ .6B	BATR κ .7	BATR κ .8D	BATR κ .9	BATR κ .10
	BATR κ .11	BATR κ .12	BATR κ .13	BATR κ .14	BATR κ .15B
	BATR κ .16	BATR κ .17D	BATR κ .18	BATR κ .19	BATR κ .20

¹ As sequências de oligonucleótido são dadas na Tabela 9.

² Os iniciadores oligonucleotídicos BATR κ .1 e BATR κ .20 foram também utilizados como os iniciadores de amplificação externa.

Os putativos transformantes positivos foram identificados utilizando o ensaio de rastreamento por PCR, digestão de restrição e depois sequenciação de ds-ADN. Os genes Vk humanizados (FIGS. 7-9; SEQ ID Nº 15, 16 e 18) foram depois subclonados em plasmídeos de expressão.

A construção de cadeia leve pKN110 incluiu genes de resistência à Ampicilina e Neomicina. As variantes do gene Vk humanizado de BAT-1 (*i. e.*, BATR_{kA}, BATR_{kB} e BATR_{kD}) foram introduzidas entre o Promotor Imediatamente Precoce de HCMV e a região constante kapa humana genômica, resultando nos seguintes vetores de expressão: pKN110-BATR_{kA}, pKN110-BATR_{kB} e pKN110-BATR_{kD}, respectivamente (ver FIG. 10 para um vetor pKN110-BATR_{kD} representativo).

A cassete de expressão da cadeia leve de BAT-1 introduzida num vetor de expressão incluiu um fragmento de ADN que codifica uma sequência de péptido de sinal de imunoglobulina de murganho, uma sequência de Kozak e um intrão da Sequência de sinal que foi adicionado a ambos os lados das variantes do gene Vk humanizado de BAT-1 (FIG. 11). Esta cassete foi introduzida entre o Promotor Imediatamente Precoce de HCMV e a região constante kapa humana genômica. O vetor de expressão completo da cadeia leve incluiu também um terminador de transcrição poliA de BGH e um marcador de seleção Neo/G418. Todas as construções foram digeridas com enzimas de restrição e sequenciados os ds-ADN para confirmar a presença da inserção correta.

Exemplo 7

Construção de variantes da cadeia pesada de BAT-1 humanizado

A construção das várias versões dos genes da região variável da cadeia pesada de BAT-1 humano reformulados (*i. e.*, BATRH_A, BATRH_B, BATRH_C) produziu um produto de aproximadamente 450 pb que foi depois subclonado em pCR2.1™. As reacções de PCR foram estabelecidas utilizando os iniciadores descritos nas Tabelas 11 e 12.

Os putativos transformantes positivos foram novamente identificados num rastreio de PCR e depois sequenciados os ds-ADN. Os genes V_H humanizados (SEQ ID Nº 20-22) foram depois subclonados em vetores de expressão.

A construção da cadeia pesada pG1D110 incluiu genes de resistência à Ampicilina e o dhfr de hamster como o marcador de seleção. As variantes do gene V_H humanizado de BAT-1 foram introduzidas entre o Promotor Imediatamente Precoce de HCMV e a região constante de IgG1 humana genómica, resultando nos seguintes vetores de expressão: pG1D110-BATRH_A, pG1D110-BATRH_B, pG1D110-BATRH_C (ver FIG. 15 para um vetor pG1D110.BAT-1.RH_C representativo).

A cassette de expressão da cadeia pesada de BAT-1 foi introduzida num vetor de expressão que incluiu um fragmento de ADN que codifica uma sequência de péptido de sinal de imunoglobulina de murganho, uma sequência de Kozak e um intrão da SEQuência de sinal que foi adicionado a ambos os lados das variantes do gene de V_k humanizado de BAT-1 (FIG. 16). Esta cassette foi introduzida entre o Promotor Imediatamente Precoce de HCMV e a região constante de IgG1 humana genómica. O vetor de

expressão da cadeia leve completo também incluiu um terminador de transcrição poliA de BGH e um marcador de seleção dhfr.

Os vetores de expressão resultantes foram digeridos com enzimas de restrição para confirmar a presença da inserção correta.

TABELA 11

Nome do Iniciador	SEQ ID Nº	Oligonucleótido utilizado na construção das várias versões humanizadas do gene da região variável da cadeia pesada do anticorpo BAT-1 (5'→3')
BATRH.1	57	CCCAAGCTTGCCGCCACCATG GACTGGACCTGGAGGATCC
BATRH.2	58	TCTTCTTGGTGGCAGCAGCAA CAGGTGCCCACT
BATRH.3	59	CCCAGGTGCAGCTGGTGCAAT CTGGGTCTGAGCTTAAGAA
BATRH.4	60	GCCTGGGGCCTCAGTGAAGAT CTCCTGCAAGGCTTCTGGA
BATRH.5	61	TATAGCTTCAGTAACTATGGA ATGAACTGGGTGCGACAGG
BATRH.6	62	CCCCTGGACAAGGGCTTCAGT GGATGGGATGGATAAACAC
BATRH.7	63	CGACAGTGGAGAGTCAACATA TGCTGAAGAGTTCAAGGGA
BATRH.8	64	CGGTTTGCTTCTCCTTGGAC ACCTCTGTCAGCACGGCAT
BATRH.9	65	ATCTGCAGATCACCAGCCTCA CGGCTGAGGACACTGGCAT
BATRH.10	66	GTATTTCTGTGCGAAAGTCGG CTACGATGCTTTGG
BATRH.11	67	ACTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAGGTG AGTGGATCCGCG
BATRH.12	68	TGCTGCCACCAAGAAGAGGAT CCTTCCAGGTGGAGTCCATGG TGG
BATRH.13	69	TTGCACCAGCTGCACCTGGGA GTGGGCACCTGTTGC
BATRH.14	70	TCTTCACTGAGGCCCCAGGCT TCTTAAGCTCAGACCCAGA
BATRH.15	71	CCATAGTTACTGAAGCTATAT CCAGAAGCTTGCAGGAGA
BATRH.16	72	CTGAAGCCCTTGTCAGGGGC CTGTGCGACCCAGTTCATT
BATRH.17	73	ATGTTGACTCTCCACTGTCGG TGTTTATCCATCCCATCCA
BATRH.18	74	TCCAAGGAGAAGACAAACCGT CCCTTGAACCTTTCAGCAT
BATRH.19	75	GAGGCTGGTGATCTGCAGATA TGCCGTGCTGACAGAGGTG
BATRH.20	76	CGACTTTCGCACAGAAATACA TGCCAGTGTCCTCAGCCGT
BATRH.21	77	TTCCCTGGCCCCAGTAGTCCA AAGCATCGTAGC
BATRH.22	78	CGCGGATCCACTCACCTGAGG AGACGGTGACCAGGG
BATRH.5B	79	TATACTTTCACAACTATGGA ATGAACTGGGTGCGACAGG

(continuação)

BATRH.15B	80	CCATAGTTTGTGAAAGTATAT CCAGAAGCCTTGCAGGAGA
BATRH.8C	81	CGGTTTGTCTTCTCCTTGGAC ACCTCTGTCAACACGGCAT
BATRH.10C	82	GTATTTCTGTGTGAGAGTCGG CTACGATGCTTTGG
BATRH.20C	83	CGACTCTCACACAGAAATACATG CCAGTGTCTCAGCCGT
BATRH.9C	84	ATCTGCAGATCACCAGCC TC AACGCTGAGGACACTGGCAT
BATRH.19C	85	GAGGCTGGTGATCTGCAGAT ATGCCGTGTTGACAGAGGTG
BATRH.5C	86	TATACTTTCACAAACTATGG AATGAACTGGGTGAAGCAGG

TABELA 12

Variante de BAT-1 humanizado	Combinações de iniciador oligonucleotídico ¹ utilizadas para a construção da cadeia pesada de cada variante ²				
BATRH_A	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5
	BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8	BATRH.9	BATRH.10
	BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15
	BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
	BATRH.21	BATRH.22			
BATRH_B	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5B
	BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8	BATRH.9	BATRH.10
	BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15B
	BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
BATRH_C	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5C
	BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8C	BATRH.9	BATRH.10
	BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15C
	BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
	BATRH.21	BATRH.22			

¹ As sequências de oligonucleótido são dadas na Tabela 11.

² Os iniciadores oligonucleotídicos BATRH.1 e BATRH.22 foram também utilizados como os iniciadores de amplificação externa.

Exemplo 8

A construção do anticorpo completo $\gamma 1$ RH_C/R_{KD} BAT-1 num único vetor de expressão

De modo a maximizar os níveis de expressão atingíveis para o anticorpo $\gamma 1$ BAT-1, foi decidido remover o intrão da construção pG1D110.BAT-1.RH_C (descrita no Exemplo 7, ver FIG. 15) antes de fazer a construção de vetor único $\gamma 1$ BAT-1. Este processo foi realizado como se segue.

pG1D200 é outro vetor de expressão de mamífero de cadeia pesada de imunoglobulina $\gamma 1$ (AERES Biomedical; FIG. 17). Este vetor é uma versão sem o intrão $\gamma 1$ V_H:C_H do vetor pG1D110 (*i. e.*, não tem o intrão de 71 pb na junção V_H:C_H).

De modo a converter a construção pG1D110.BAT-1.RH_C numa construção, um fragmento *Bst* EII (219 pb) foi excisado do vetor pG1D200 e purificado do gel utilizando um kit de extração/purificação de gel da Qiagen. Este fragmento continha a junção V_H:C_H sem intrão.

A construção pG1D110.BAT-1.RH_C (FIG. 15) foi também digerida por restrição com *Bst*EII, libertando um fragmento de 290 pb que continha o intrão mais a junção V_H:C_H. O fragmento de vetor restante (~7207 pb) foi purificado do gel utilizando um kit de extração/purificação de gel da Qiagen.

O fragmento *Bst*EII sem intrão (219 pb) da digestão do vetor pG1D200 foi depois ligado no vetor pG1D110.BAT-1.RH_C digerido com *Bst*EII de ~7207 pb. 2 μ L de ADN ligado foram transformados em células DH5 α (Stratagene) de acordo com as instruções dos

fabricantes. O ADN plasmídico foi preparado a partir de 10 colónias e cada ADN plasmídico foi analisado para a presença do correto fragmento *BstEII* por análise da SEQuência de ADN.

Após identificação de um clone perfeito, a nova construção sem intrão (pG1D210.BAT-1.RH_C) e a construção da cadeia leve pKN110.BAT.Rk_D (ver FIG. 10) foram utilizadas para construir o vetor de expressão único pG1KD210.BAT-1.RH_C/Rk_D (SEQ ID N° 93).

Os componentes deste vetor de expressão único pG1KD210.BAT-1.RH_C/Rk_D dentro da SEQ ID N° 93 estão localizados como se segue:

1. Gama de nucleótidos: 1 a 2502 - pBR322 (sequência baseada em pBR322 incluindo o gene de resistência à Amp e a origem *ColEI* mais a origem de SV40 e o promotor precoce de SV40 alterado)
2. Gama de nucleótidos: 206 a 1067 - Amp (gene de resistência à Ampicilina)
3. Posição: 1824 - *ColEI*
4. Gama de nucleótidos: 2502 a 3227 - DHFR (gene de Di-hidrofolato redutase)
5. Gama de nucleótidos: 3233 a 4074 - poliA de SV40 (sequência poli A de SV40, etc.)
6. Gama de nucleótidos: 4109 a 5649 - HCMVi (promotor HCMVi)
7. Gama de nucleótidos: 5662 a 6067 - rKd de BAT

Região variável da cadeia leve kapa de BAT reformulada.

8. Gama de nucleótidos: 6073 a 6720 - gene HuK (cópia de ADNc do gene da região constante kapa humana (Km(3)))

9. Gama de nucleótidos: 6726 a 6943 - sequências spaC2 artificial e spaC2 de terminação
10. Gama de nucleótidos: 6949 a 8489- HCMVi (promotor HCMVi)
11. 12. Gama de nucleótidos: 8502 a 8923 - rHc de BAT

Região variável da cadeia pesada de BAT reformulada

13. Gama de nucleótidos: 8924 a 10297 - HG1 (regiões constantes gama-1 humanas precedidas por um intrão de 60 pb e seguidas pela sequência de terminação 'Arnie')

A cassette de expressão da cadeia leve kapa de BAT-1 que continha o promotor HCMVi, o gene da região variável da cadeia leve kapa de BAT-1 e o gene da região constante da cadeia leve kapa, foi digerida com enzimas de restrição (*EcoRI*/*SpeI*) para fora da construção pKN110.BAT-1.Rk_D e, subsequentemente, ligada na construção pG1D210.BAT-1.RH_C, através dos locais de restrição únicos *EcoRI* e *SpeI*. Esta ligação resultou na construção de vetor de expressão único pG1KD210.BAT-1.RH_C/RK_D, contendo as cadeias pesadas e leves kapa do anticorpo BAT-1 humanizado RH_C/RK_D (FIG. 18). 2 µL do ADN ligado foram transformados em células DH5α (Stratagene) de acordo com as instruções dos fabricantes. O ADN de miniprep foi preparado a partir de dez colônias e cada ADN plasmídico foi analisado para a presença da correta construção de expressão único por análise de digestão por restrição. Um clone de uma construção de expressão único correta foi escolhido para a expressão transiente do anticorpo gama-1 BAT-1 em células COS como será ilustrado no Exemplo 11.

Exemplo 9

Construção da variante de anticorpo completo BAT-1.RH_C/RK_D gama-1 (γ1) num vetor de expressão único

A região variável da cadeia pesada BATRH_C foi transferida para o vetor de expressão combinado (único) como um fragmento *Xho*I a *Hind*III. A região variável da cadeia leve BATRK_D foi transferida para o vetor de expressão combinado (único) como um fragmento *Xba*I a *Bam*HI. O local *Xba*I interno no gene da cadeia leve foi removido sem mudar a sequência de aminoácidos. As sequências das regiões variáveis da cadeia pesada e leve BAT-1.RK_D/BAT-1.RH_C neste vetor foram confirmadas. O vetor inclui as regiões constantes Kapa e IgG1 humana genómicas. Ambos os genes da cadeia pesada e leve foram colocados sob controlo do promotor Imediatamente Precoce de HCMV. O vetor inclui um gene *dhfr* de murganho como o marcador de seleção (ver FIG. 19). A mesma sequência de Kozak, sequência de péptido de sinal e intrão foram adicionadas como para o sistema de expressão de dois vetores (ver Exemplos 6 e 7).

Exemplo 10

Construção de PG4KD110.BAT-1.RH_C/RK_D de BAT-1 gama-4 (γ4) num vetor único

O primeiro passo na construção da construção de vetor de expressão único de BAT-1 γ4 foi a clonagem do gene BAT-1.RH_C modificado para fora da construção pG1D110.BAT-1.RH_C (FIG. 14) por digestão de restrição com *Bam*HI e *Hind*III, e ligação deste fragmento de 430 pb no vetor de expressão de cadeia pesada de

imunoglobulina gama-4 pG4D110, novamente através locais de restrição *Bam*HI e *Hind*III.

2 µL de ADN ligado foram transformados em células DH5α (Stratagene) de acordo com as instruções dos fabricantes. O ADN plasmídico foi preparado a partir de 10 colónias e cada ADN plasmídico foi analisado para a presença do fragmento *Bam*HI/*Hind*III de BAT-1.RH_C correto por análise da SEQuência de ADN.

Após identificação de um clone perfeito, a nova construção gama-4 (pG4D110.BAT-1.RH_C) e a construção de cadeia leve pKN110.BAT-1.RK_D (FIG. 10) foram utilizadas para construir o vetor de expressão único pG4KD110.BAT-1.HR_C/RK_D do seguinte modo.

A cassette de expressão da cadeia leve kapa de BAT-1 que continha o promotor HCMVi, o gene da região variável da cadeia leve kapa de BAT-1 e o gene da região constante da cadeia leve kapa, foi digerida com enzimas de restrição (*Eco*RI/*Spe*I) para fora da construção pKN110.BAT-1.RK_D e subsequentemente ligada na construção pG4D110.BAT-1.RH_C através dos locais de restrição únicos *Eco*RI e *Spe*I. Esta ligação resultou na construção de uma construção de vetor de expressão único pG4KD110.BAT-1.RH_C/RK_D, contendo ambas as cadeias pesadas e leves kapa da variante RH_C/RK_D do anticorpo humanizado BAT-1. 2 µL de ADN ligado foram transformados em células DH5α (Stratagene) de acordo com as instruções dos fabricantes. O ADN de miniprep foi preparado a partir de dez colónias e cada ADN plasmídico foi analisado para a presença da construção do vetor de expressão único correto por análise de digestão de restrição. A construção do vetor de expressão único correta digerida com *Bam*HI e *Hind*III libertou um fragmento de 2864 pb e a digestão com *Hind*III libertou um

fragmento de 2840 pb. Um clone foi escolhido para a expressão transiente do anticorpo gama-4 BAT-1 em células COS.

Exemplo 11

Co-transfecção de vetores da cadeia leve e pesada de BAT-1 humanizado e expressão transiente das variantes de BAT-1 humanizado em células COS7

Os vetores de expressão da cadeia pesada (pG1D110) e leve (pKN110; Exemplo 7) de BAT-1 humanizado foram co-transfetados, em várias combinações, em células COS7 e após uma incubação de 72 horas, o meio foi recolhido, centrifugado para remover restos celulares, filtrado e analisado por ELISA para a produção de anticorpo humanizado. A concentração do anticorpo humanizado nos sobrenadantes de células COS7 variou com cada combinação de construções de anticorpo BAT-1 humano reformulado que foi testada (Tabela 13). Por exemplo, a versão BATRH_B/BATRK_A expressou os níveis mais elevados de anticorpo (4800 ng/mL), enquanto a versão BATRH_B BATRK_D foi aquela com mais baixa expressão (357 ng/mL).

Exemplo 12

Purificação das variantes de BAT-1 humanizado a partir de células COS7

Recolhendo aproximadamente 8 mL por co-transfecção (ver Exemplo 11), uma série de transfeções foi realizada até ser recolhido um excesso de 200 mL de sobrenadante de COS7. O volume

deste sobrenadante foi reduzido até 10 mL por passagem do sobrenadante através de uma célula agitada de ultra-filtração com uma membrana de filtro PM30 - que tinha um limite de corte de peso molecular de 30 kDa.

O kit de purificação de IgG Imunopure®(A) é essencialmente compreendido de uma coluna de 2 mL contendo Sepharose de proteína A imobilizada. O anticorpo foi eluído da coluna com 5 mL de tampão de eluição, cujo eluato foi recolhido em frações de 1 mL. A concentração do anticorpo BAT-1 humanizado em cada fração foi depois ensaiada utilizando métodos de ELISA. A Tabela 13 descreve as concentrações finais das construções de anticorpo purificadas com Proteína A recolhidas. Em média o passo de purificação aumentou a concentração de anticorpo em aproximadamente 150 vezes.

TABELA 13

Cadeia de anticorpo		Concentrações de anticorpo quimérico e hBAT-1 em sobrenadantes de células COS7 (experiências de expressão transiente)	
Pesada	Leve Kapa	Sobrenadantes em bruto (µg/mL)	Após Purificação por Proteína A (µg/mL)
BATCH	BATR _K	0,358	50
BATRH _A	BATR _{K_A}	2,350	110
BATRH _B	BATR _{K_A}	4,800	211
BATRH _B	BATR _{K_B}	0,757	149
BATRH _C	BATR _{K_B}	1,250	137
BATRH _B	BATR _{K_D}	0,357	112
BATRH _C	BATR _{K_D}	0,718	122

Exemplo 13

A análise da ligação de célula Daudi às variantes de BAT-1 humanizado produzidas em células COS7

Utilizando ELISA de célula Daudi foi claro que as diferentes versões do anticorpo BAT-1 humanizado purificado com proteína A se ligaram a células Daudi em vários graus. As Figs. 20-23 mostram exemplos típicos destas experiências de ligação. Curvas sigmoidais de resposta à dose de ligação das células Daudi pelos anticorpos recombinantes foram também representadas graficamente e os declives destas curvas de ligação foram calculados. A combinação dos dados de declive e das posições de resposta à dose, relativas às curvas de resposta à dose do anticorpo quimérico, sugeriu uma hierarquia qualitativa com respeito à ligação de células Daudi entre as várias construções testadas de anticorpo BAT-1 humanizado (Tabela 14). No topo desta hierarquia estava claramente a construção $BATRH_C/BATRK_D$, que apresentou um declive (*i. e.*, $0,8818 \pm 0,1107$) muito semelhante ao seu anticorpo BAT-1 quimérico de controlo (*i. e.*, $0,8248 \pm 0,1210$) e apresentou uma curva de resposta à dose muito parecida com a do controlo quimérico. Embora a construção $BATRH_C/BATRK_B$ apresentasse um declive mais íngreme (*i. e.*, $0,6408 \pm 0,1622$) que o mesmo anticorpo BAT-1 quimérico de controlo (*i. e.*, $0,8248 \pm 0,1210$), como calculado a partir dos dados de ligação disponíveis, a diferença não foi estatisticamente significativa. Além disso, é claro a partir da FIG. 22 que a curva de resposta à dose para esta construção não é tão boa como para a construção $BATRH_C/BATRK_D$ e foi assim classificada em segundo na hierarquia de ligação.

Inversamente, a construção $BATRH_A/BATRk_A$ tem claramente as características mais fracas de ligação de todas as construções testadas de anticorpo BAT-1 humanizado (Tabela 14) e foi assim classificada em sexto na hierarquia de ligação. Embora o declive calculado para esta versão (*i. e.*, $1,2730 \pm 0,2688$) seja aparentemente melhor do que a construção humanizada muito semelhante $BATRH_B/BATRk_A$ (*i. e.*, $1,7710 \pm 0,6461$), esta diferença é novamente não estatisticamente significativa. Além disso, é claro a partir da FIG. 21 que o anticorpo BAT-1 $BATRH_A/BATRk_A$ com CDR enxertadas está a alcançar a sua resposta de ligação máxima a um nível muito mais baixo do que a construção $BATRH_B/BATRk_A$ humanizada - que foi classificada em quinto na hierarquia de ligação.

As construções $BATRH_B/BATRk_B$ (Fig. 20; classificada em quarto) e $BATRH_B/BATRk_D$ (FIG. 23; classificada em terceiro) apresentam níveis intermediários de ligação entre estes dois conjuntos de extremos. Uma vez mais estas classificações foram principalmente baseadas numa interpretação subjetiva dos dados de ligação disponíveis e de experiência anterior.

TABELA 14

Afinidades de ligação relativas de construções de anticorpos BAT-1 quimérico versus humanizado, purificados com proteína A, recolhidos após expressão transiente em células COS				
Número de Experiência	Cadeia pesada	Cadeia Leve Kapa	Declive $\pm$SEM^a	Hierarquia de ligação da análise de declive
1	BATRH	BATRK	0,5422 $\pm$ 0,2911	–
	BATRH _A	BATRK _A	1,273 $\pm$ 0,2688	6
	BATRH _B	BATRK _A	1,771 $\pm$ 0,6461	5
2	BATRH	BATRK	0,8057 $\pm$ 0,0849	–
	BATRH _B	BATRK _D	0,6555 $\pm$ 0,1252	3
3	BATRH	BATRK	0,8248 $\pm$ 0,1210	–
	BATRH _C	BATRK _B	0,6408 $\pm$ 0,1622	2
	BATRH _C	BATRK _D	0,8818 $\pm$ 0,1107	1
4	BATRH	BATRK	0,7090 $\pm$ 0,2768	–
	BATRH _B	BATRK _B	0,7796 $\pm$ 0,3420	4

^a Erro padrão da média de 3 duplicados de ELISA de células Daudi calculado após se ter ajustado os dados de ELISA numa curva de resposta à dose sigmóide.

Exemplo 14

Expressão transiente da variante Rk_D/RH_C de BAT-1 por co-transfecção ou por transfecção simples de células COS

O método de Kettleborough (Kettleborough *et al.*, Eur. J. Immunol. 23:206, 1993) foi seguido para transfetar as construções de expressão de mamífero em células COS. Resumidamente, o ADN (10 µg cada da construção de expressão da cadeia leve kapa pKN110.BAT-1.Rk_D e construção de expressão da

cadeia pesada pG1D210.BAT-1.RH_C, ou 13 µg da construção de vetor único pG1KD210.BAT-1.RH_C/RkD) foi adicionado a uma fração de 0,7 mL de 10⁷ células/mL em PBS e pulsadas a 1900 V, com capacitância de 25 µF utilizando um dispositivo Bio-Rad Gene Pulser. Após uma recuperação de 10 minutos à temperatura ambiente, as células eletroporadas foram transferidas para placas de Petri contendo 8 mL de DMEM contendo 10% FCS e incubadas durante 72 horas em 5% de CO₂ a 37 °C. Após 72 horas de incubação, o meio foi recolhido, centrifugado para remover restos celulares e analisado por ELISA de captura para a produção de anticorpos. As co-transfeções, com vetor de expressão da cadeia leve e vetor de expressão de cadeia pesada, e as transfeções com vector único expressando ambas as cadeias leves e pesadas, foram realizadas em triplicado. Os resultados são apresentados na Tabela 15. Os resultados indicam que os níveis de expressão a partir do vetor único são 6 vezes superiores que os níveis de expressão observados para as co-transfeções.

TABELA 15

Transfeção Nº	Construção transfetada	Níveis de expressão transiente de células COS para o anticorpo γ1 BAT-1 (µg/mL) *
1	Vetor único	55,451
2	"	49,009
3	"	66,018
1	Vectores de cadeia leve e pesada	9,06
2	"	10,232
3	"	9,536

* Os níveis de transfeção de variante de BAT-1 humanizado RH_C/Rk_D, a partir de co-transfeção utilizando os vetores pG1D110 e pKN110, foram 0,718 µg/mL

Exemplo 15

Transfecção estável de células de mamífero CHOdhfr- com o vetor único pG1KD210.BAT-1.RH_C/Rk_D e produção de linhas celulares estáveis

As células CHOdhfr- foram propagadas num meio não seletivo consistindo de α -MEM com ribonucleósidos e desoxirribonucleósidos, suplementado com 10% de Fetal Clone II e 50 μ g/mL de gentamicina. Uma fração, 0,7 mL, de 10^7 células/mL em PBS foi transfetada com 13 μ g de pG1.KD210.BAT-1.RH_C/Rk_D a 1900 V, capacitância de 25 μ F, utilizando um Bio-Rad Gene Pulser. As células foram deixadas a recuperar durante 10 minutos à t.a., antes de serem transferidas para placas de Petri de 10 cm em 8 mL de meio não seletivo e depois incubadas em 5% de CO₂ a 37 °C durante 48 horas.

Dois dias após a transfecção, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 150 mL de meio seletivo pré-aquecido (α -MEM sem ribonucleósidos e desoxirribonucleósidos, suplementado com 10% de FBS dializado e 50 μ g/mL de gentamicina, e contendo 10 nM, 50 nM, 100 nM ou 500 nM de Metotrexato), antes de ser igualmente dividido entre quinze placas de Petri de 10 cm. Estas foram depois incubadas em 5% de CO₂ a 37 °C durante 20-30 dias, sendo o meio seletivo mudado cada 3-4 dias até serem claramente vistos clones. Após 2 semanas da transfecção inicial, começaram-se a desenvolver clones em placas de 10 nM. Oito dias mais tarde, desenvolveu-se um clone nas placas de 50 nM. Nenhum outro clone se desenvolveu após 35 dias nas placas de 50 nM e não se desenvolveu qualquer clone nas placas de 100 nM ou 500 nM.

Para "apanhar" os clones, quadrados de 1 mm de papel de filtro Whatman 1MM foram primeiro imersos em 0,05% de tripsina, 0,02% de solução de EDTA. O meio seletivo foi cuidadosamente removido a partir das placas de cultura, que foram depois cuidadosamente lavadas com 5 mL de PBS. O PBS foi depois removido e, utilizando pinças estéreis, os quadrados de papel de filtro pré-embebidos foram colocados com cuidado sobre clones de células individuais. Os quadrados foram deixados sobre os clones durante 15 segundos antes de serem transferidos para poços individuais de uma placa de cultura de tecidos de 24 poços contendo 1 mL do meio seletivo apropriado.

Um total de 31 clones gama-1 foram escolhidos, 30 foram das placas com 10 nM de MTX e uma foi das placas de 50 nM. Estas células foram deixadas a crescer em meio seletivo até quase à confluência e o meio de poços individuais foram testados para a produção de anticorpo. Aqueles clones que produzem anticorpo humano foram depois selecionados para expansão e análise de produção específica. Os resultados dos ensaios de produção específica são apresentados na Tabela 16.

TABELA 16

Clone	Níveis de produção de células CHO específicas para a variante de anticorpo completo $\gamma 1$ BAT-1 RH _C /RK _D (ng/10 ⁶ células/dia)		
	Ensaio Nº 1	Ensaio Nº 2	Ensaio Nº 3
$\gamma 1$ B9	3284,7	2921,5	1227,1
$\gamma 1$ B10	297	1288	268,3
$\gamma 1$ B13	12443	5425,2	7731,53
$\gamma 1$ B18	6,5	10,4	4,9
$\gamma 1$ B19	199,7	26,9	43
$\gamma 1$ B15	5978,6	1657,1	3015,43
$\gamma 1$ D6	2539,2	1605,5	2072,40

As três linhas celulares (B9, B13 e B15) que mostraram os melhores níveis de produtividade específica foram adicionalmente analisados e monitorizados por tempos de duplicação rigorosos. (ver Tabela 17).

TABELA 17

Linha celular	Níveis de produção das melhores linhas celulares CHO γ1 ($\mu\text{g}/10^6$ células/dia)	Tempos de duplicação das melhores linhas celulares CHO γ1 (horas)
B9	3,5	22,5
B13	7,7	31,5
B15	3	21

Com base em níveis de produtividade específica e tempos de duplicação, foi decidido começar a produção da quantidade de 500 μg do anticorpo γ 1 BAT-1 utilizando a linha celular B15.

Exemplo 16

A expressão transiente da variante RH_C/R_{KD} de BAT-1 γ 4 em células COS por transfeções simples e co-transfeções

O método de Kettleborough *et al.* foi seguido para transfetar as construções de expressão de mamífero em células COS. Resumidamente, o ADN (10 μg cada da construção de expressão da cadeia leve kapa pKN110.BAT-1.R_{KD} e da construção de expressão da cadeia pesada pG4D110.BAT-1.RH_C ou 13 μg da construção de supervector pG4D110.BAT-1.RH_C/R_{KD}) foi adicionado a uma fração de 0,7 mL em 10^7 células/mL em PBS e pulsadas a 1900 V, capacitância de 25 μF , utilizando um dispositivo Bio-Rad Gene Pulser. Depois

de uma recuperação de 10 minutos à t.a., as células eletroporadas foram transferidas para placas de Petri contendo 8 mL de DMEM contendo 10% de FCS e incubadas durante 72 horas em 5% de CO₂ a 37 °C. Após 72 horas de incubação, o meio foi recolhido, centrifugado para remover restos celulares e analisado por ELISA de captura para produção de anticorpos.

Ambas as co-transfeções e transfeções simples foram realizadas em triplicado. Os resultados são apresentados na Tabela 18. Os resultados indicam que os níveis de expressão deste vetor de expressão único são ~4 vezes superiores aos níveis de expressão observados para as co-transfeções.

TABELA 18

Transfeção Nº	Construção transfetada	Níveis de expressão transiente de células COS para o anticorpo γ4 BAT-1 (ng/mL)
1	Vetor único	519,3
2	"	522
3	"	567,2
1	Vectores de cadeia leve e pesada	65,6
2	"	152,3
3	"	129,9

Exemplo 17

Transfecção estável de células de mamífero CHOdhfr- com o vetor único pG4KD210.BAT-1.RH_C/Rk_D e produção de linhas celulares estáveis

As células CHOdhfr- foram propagadas num meio não seletivo consistindo de α -MEM com ribonucleósidos e desoxirribonucleósidos, suplementado com 10% de Fetal Clone II e 50 μ g/mL de gentamicina. Uma fração, 0,7 mL, de 10^7 células/mL em PBS foi transfetada com 13 μ g de pG4KD110.BAT-1.RH_C/Rk_D a 1900 V, capacitância de 25 μ F, utilizando um Bio-Rad Gene Pulser. As células foram deixadas a recuperar à temperatura ambiente durante 10 minutos, antes de serem transferidas para placas de Petri de 10 cm em 8 mL de meio não seletivo e depois incubadas em 5% de CO₂ a 37 °C durante 48 horas. Dois dias após esta incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 150 mL de meio seletivo pré-aquecido (α -MEM sem ribonucleósidos e desoxirribonucleósidos, suplementado com 10% de FBS dializado e 50 μ g/mL de gentamicina e contendo 10 nM, 50 nM, 100 nM ou 500 nM de Metotrexato) antes de ser dividido igualmente entre quinze placas de Petri de 10 cm. Estas foram depois incubadas em 5% de CO₂ a 37 °C durante 20-30 dias, sendo o meio seletivo mudado cada 3-4 dias até serem claramente visíveis clones.

Após 2 semanas, começaram-se a clones nas placas de 10 nM. Nenhum clone se desenvolveu após 35 dias em placas de 50 nM e nas placas de 100 nM ou 500 nM. Os clones foram apanhados como descrito anteriormente (Exemplo 15) e aqueles clones selecionados que produziam anticorpo humano foram depois selecionados para expansão e análise de produção específica. Os

resultados dos ensaios de produção específica são apresentados na Tabela 19.

TABELA 19

Clone	Níveis de produção de células CHO para o anticorpo completo $\gamma 4$ (ng/ 10^6 células/dia)		
	Ensaio Nº 1	Ensaio Nº 2	Ensaio Nº 3
$\gamma 4$ A9	4,8	6,08	5,7
$\gamma 4$ A13	48,5	14,8	68,8
$\gamma 4$ A12	60,7	77,0	52,7
$\gamma 4$ C4	66,0	141,7	104,4
$\gamma 4$ C8	41,7	52,4	77,6
$\gamma 4$ C9	30,7	30,6	32,2
$\gamma 4$ F2	40,7	17,9	29,30

Exemplo 18

Co-transfecção de células NSO com vetores de amplificação da cadeia pesada BATRH_C e da cadeia leve BATR_{K_D} e seleção das linhas celulares produtoras de anticorpo

Os vetores de expressão contendo a cassete da cadeia pesada BATRH_C (FIG. 16) e a cassete da cadeia leve BATR_{K_D} (FIG. 11) foram misturados e transfectados na linha celular hospedeira NSO por eletroporação.

As células transfectadas foram distribuídas em 10 placas de 96 poços em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1 mg/mL de

meio G418 (gentamicina). Após 10 a 14 dias, quando as colónias de células transfetadas se desenvolveram, amostras de meio condicionado dos poços foram ensaiadas para o anticorpo BAT-1 humanizado. As células dos poços mais produtores foram apanhadas e expandidas em meio incluindo G418.

A transfeção foi repetida após uma semana por segurança e para proporcionar mais clones de células transfetadas para seleção. Após 10 dias, tinham-se desenvolvido colónias visíveis de células transfetadas e o meio condicionado dos poços foi rastreado para produção de anticorpos. As placas de ELISA foram revestidas com anticorpo κ anti-humano de ovelha. Amostras de 25 μ L de meio dos poços foram transferidas para a placa de ELISA e diluídas até 100 μ L em PBS Tween (PBST). O anticorpo secundário foi IgG anti-humana de ovelha conjugada com HRP (específica para a cadeia γ) e a cor foi desenvolvida com o-Fenilenodiamina (OPD). Os poços positivos foram examinados microscopicamente e as células dos poços que mais produzem foram recolhidas em 1,5 mL de DMEM suplementado com 10% de FBS e 1 mg/mL de G418 em placas de 24 poços. Um total de 15 colónias de produção elevada foi escolhido a partir das duas transfeções (Tabela 20). Duas linhas celulares independentes deram níveis de produção de anticorpos em torno de 40 μ g/mL ou mais.

Para a amplificação utilizando o gene *dhfr* no vetor da cadeia pesada, duas linhas celulares de elevada produção iniciais foram transferidas para meio (DMEM com 10% de FCS e 1 mg/mL de G418) com 0,02 μ M de Metotrexato adicionado.

Exemplo 19

Transfecção da linha celular hospedeira NSO com um vetor de amplificação único contendo o gene $\gamma 1$ BAT-1.RH_C/R_{KD} e seleção de linhas celulares produtoras de anticorpos

O vetor de expressão de anticorpo combinado (único) descrito no Exemplo 9, foi transfetado nas linha celular hospedeira NSO por eletroporação.

As células transfectadas foram distribuídas em 10 placas de 96 poços em DMEM com 10% de FBS. Após 2 dias, foi adicionada uma quantidade igual de meio com 0,1 μ M de Metotrexato. Metade do meio foi mudada com o mesmo volume de 0,1 μ M de meio contendo MTX, todos os 2 dias até ao 8º dia após transfecção. A transfecção foi repetida após uma semana como segurança e para proporcionar mais clones de células transfetadas para seleção. Após 14-21 dias, desenvolveram-se colónias visíveis de células transfetadas e o meio condicionado dos poços foi rastreado para a produção de anticorpos, como descrito no Exemplo acima. Os poços positivos foram examinados microscopicamente e as células dos poços de maior produção foram recolhidos em 1,5 mL de DMEM suplementado com 10% de FBS e 0,1 μ M de Metotrexato em placas de 24 poços. Um total de 13 colónias de produção elevada foi escolhido das duas transfecções e mantidas congeladas em azoto líquido (Tabela 20). Seis linhas celulares independentes deram níveis de produção de anticorpos acima de 40 μ g/mL. Devido à diferente seleção, as linhas celulares contendo o vetor único foram mais lentas para se desenvolverem do que aquelas contendo os genes de anticorpo em 2 vetores diferentes.

TABELA 20

Sistema de Dois Vectores		Sistema de Vector Único	
Linha celular	Nível de produção (µg/mL)	Linha celular	Nível de produção (µg/mL)
31E1	43	1B7	48
33E5	15	3E3	45
33B10	40	3H5	35
34F1	8	8H7	26
35C12	12,5	9D7	41
36G4	4	24B7	26
37H5	20	26A6	24
38E8	15	26D6	33
39A3	38	26E3	43
42G7	12	27B2	23
44F4	7	27C4	45
45C2	10	23E10	45
45H12	13	29E3	22
46H10	7		
49H2	15		

Um exemplo representativo das células produtoras de BAT humanizado após transfeção de uma linha celular hospedeira NS0 com um vetor de amplificação único contendo o gene γ 1 BAT-1.RH_C/Rk_D e seleção de linhas produtoras de anticorpos, *i. e.*, linha celular clonada 1B7, foi depositado no ATCC Cell Bank utilizando o formulário de Depósito do Tratado de Budapeste, em 9 de Maio de 2003 sob o número de acesso ATCC N^o (PTA-5189).

Exemplo 20

Inibição de BAT-1 de murganho por variante $\gamma 1$ BAT-1.RH_C/Rk_D humanizado

Para assegurar que a variante $\gamma 1$ BAT-1.RH_C/Rk_D humanizada reconhece o mesmo epítipo que o original BAT-1 de murino, foi conduzido um ensaio de competição de ligação a células Daudi que expressam o epítipo de ligação a BAT-1.

As células Daudi foram incubadas com quantidades crescentes do BAT-1 humanizado ou BAT-1 de murganho como controlo (0-80 $\mu\text{g/mL}$). O anticorpo não ligado foi rejeitado e BAT-1 de murino biotinilado (20 $\mu\text{g/mL}$) adicionado às células e corado com estreptavidina-FITC. A Figura 24 apresenta a ligação diminuída de BAT-1 de murino na presença de concentrações crescentes do mAb humanizado e de murganho original, suportando o reconhecimento do mesmo epítipo como esperado. Ambos os anticorpos mostram uma dependência de dose semelhante, com uma IC₅₀ de aproximadamente 10 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo uma afinidade semelhante de ligação ao antigénio.

Exemplo 21

Efeito *in vivo* de BAT-1 humanizado num modelo de tumor de murino

Como mostrado no Exemplo 20, o enxerto de CDR que resulta da formação do mAb $\gamma 1$ BAT-1.RH_C/Rk_D humanizado reteve o reconhecimento do antigénio de BAT-1. Para examinar se esta ligação pode transmitir os efeitos biológicos característicos de

BAT-1 de murino, a eficácia do BAT-1 humanizado foi estudada *in vivo*. Isto tem particular importância face à diferença de isotipo entre os mAbs de murganho e humanos.

Murganhos C57BL foram inoculados com células de melanoma B16 para induzir metástases pulmonares. Quantidades crescentes (1, 10 e 20 µg) de mAb humanizado foram injetadas no dia 12 após a inoculação do tumor e comparadas a uma dose ótima de 10 µg de BAT-1 de murino. O peso pulmonar medido no dia 24, após inoculação do tumor, é descrito na FIG. 25 e corresponde ao estabelecimento de um tumor. Ambos os murganhos não tratados e os murganhos tratados com uma IgG1 humana irrelevante do mesmo isotipo, tiveram um peso pulmonar médio de 0,9 g. O BAT-1 humanizado apresentou uma inibição dependente da dose de crescimento de metástases, ocorrendo a mais elevada inibição a uma dose baixa de 1 µg/murganho. Isto resultou numa diminuição de 67% na massa tumoral e foi semelhante àquela conseguida por uma dose ótima de BAT-1 de murino (62%). Importante, este efeito máximo foi conseguido por uma dose dez vezes mais baixa do mAb humanizado, sugerindo uma eficácia terapêutica mais elevada deste anticorpo em comparação com o mAb BAT-1 de murino original.

Exemplo 22

Inibição do melanoma humano (SK-28) em murganhos SCID por hBAT-1

Foi demonstrado que o mAb BAT-1 de murganho inibe a formação de metástases de tumor humano na presença de linfócitos de sangue periférico humano (hPBL). Para estimar a eficácia de mAb

γ 1 BAT-1.RH_C/Rk_D humanizado na inibição de cancro humano, o anticorpo humanizado foi estudado num modelo que combina ambos os tumores e os linfócitos de origem humana. Vários murganhos imunodeficientes combinados graves (SCID) foram enxertados com hPBL para restaurar a imuno-competência. Os murganhos foram desafiados com células de melanoma humano (SK-28) e tratadas com concentrações crescentes do anticorpo humanizado, administrado numa única dose i.v. no dia 11 após inoculação do tumor. A Fig. 26 apresenta o peso pulmonar que se correlaciona com o número de metástases observadas, como medido no dia 23. Ambas as concentrações do anticorpo humanizado induziram inibição tumoral na presença de hPBL. Como observado no modelo de tumor de murganho descrito acima, o anticorpo humanizado podia inibir mais eficientemente o crescimento tumoral *in vivo*, em comparação com BAT-1 de murganho. Uma única dose de 1 μ g deste anticorpo humanizado inibiu o crescimento tumoral em 68%, mostrando uma maior eficácia do que 10 μ g do anticorpo BAT-1 de murganho (30%).

Exemplo 23

Imunoterapia de metástases hepáticas de cancro colorretal humano por anticorpo monoclonal hBAT-1 em murganhos nude

LIM6 e HM7 são dois subclones da linha celular CRC humana LS174T que foram selecionadas pela sua elevada síntese de mucina e potencial metastático. As células tumorais foram injetadas no baço exposto de murganhos nude anestesiados. Após 1 minuto, os baços foram removidos e as excisões fechadas. Baixas doses de anticorpo BAT-1 de murino e humanizado foram administradas 12 dias mais tarde e os murganhos foram sacrificados 35 dias

após inoculação do tumor. Os fígados foram pesados, o número de nódulos metastáticos foi contado e o tecido hepático foi processado para estudo histológico e imuno-histoquímico.

O tratamento com BAT-1, anticorpos de murino e humanizados, mostrou ser eficiente na inibição do estabelecimento das metástases hepáticas no modelo de murino. O tratamento com anticorpo BAT-1 de murganho preveniu o desenvolvimento de xenoenxertos LIM-6. O peso médio dos xenoenxertos de murganhos tratados com BAT-1 e dos controlos foi $0,14 \pm 0,17$ g e $0,98 \pm 1,12$ g, respetivamente ($P=0,004$). As células HM7 injetadas aos murganhos nude, resultaram num grande número de lesões metastáticas volumosas no fígado que foram prevenidas pela administração única de BAT-1 de murino e BAT-1 humanizado (Fig. 27). Uma importante diminuição (mais de 40%) foi observada no número de nódulos metastáticos, nomeadamente de $134,5 \pm 34$ nos murganhos de controlo para $8,36 \pm 3$ e $4,88 \pm 2$ nos murganhos tratados com BAT-1 de murino ou BAT-1 humanizado, respetivamente. O tratamento com BAT-1 preveniu a acumulação de linfócitos na orla tumoral. O papel da infiltração de linfócitos em torno do nódulo metastático pode estar relacionado com o resultado do cancro e pode sugerir um mecanismo para a terapia com BAT-1.

Exemplo 24

Co-localização de hBAT com CD4 e CD8

Foi mostrado que o BAT-1 de murganho se liga a linfócitos humanos, reconhecendo os subconjuntos CD4+ e CD8+. Para estabelecer a especificidade de ligação do mAb $\gamma 1$ BATRH_C/BATRK_D

humanizado (hBAT), linfócitos humanos de sangue periférico (PBL) foram isolados a partir do sangue de doadores normais, como aqui descrito abaixo e analisados para co-localização de hBAT com marcadores de linfócito conhecidos.

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas em ficoll e incubadas em placas de cultura de tecidos para remover células aderentes. PBL isolados foram circunscritos em linfócitos por tamanho e granularidade e em células vivas por exclusão de iodeto de propídio (PI). A ligação foi realizada a 4 °C durante 1 hora e determinado por citometria de fluxo em linfócitos circunscritos.

Em todas as amostras examinadas, pelo menos 20% de PBL apresentaram ligação a hBAT. A Figura 28 apresenta um exemplo de ligação a linfócitos de um dador selecionado em que 50% dos PBL isolados foram positivos para hBAT, incluindo as células CD4+ (25%) e as células CD8+ (15%). Dentro destas subpopulações, a maioria das células CD4+, assim como CD8+, ligaram-se ao mAb hBAT (58% e 71%, respectivamente).

Exemplo 25

Ligação de hBAT a linfócitos B

O mAb $\gamma 1$ BATRH_C/BATRK_D humanizado (hBAT) foi produzido contra as membranas de células Daudi, uma linha celular de linfoma B humano. Os PBL de doadores normais foram isolados em ficoll, como descrito acima, seguido por aderência a placas de cultura de tecidos. As células não aderentes foram examinadas para a co-localização de hBAT com marcadores de células B, incluindo CD19 e CD20. A ligação foi realizada a 4 °C durante 1 hora e

determinada por citometria de fluxo em linfócitos circunscritos. A Figura 29 apresenta a avaliação da ligação a células de um dador normal representativo.

25-29% dos linfócitos na amostra foram positivos para mAb BAT humanizado. Estas células incluíam a maioria das células B (70-75%) como demonstrado por ambos os marcadores independentes. 70% de CD20+ foram positivas para mAb BAT humanizado (circunscritas em R1 e PI negativas; Fig. 29A) e 75% de CDR19+ foram positivas para mAb BAT humanizado (circunscritas em R1 e PI negativas). Os resultados sugerem que a unidade de ligação a BAT na superfície celular poderia ser comum às células periféricas B.

Exemplo 26

A ligação de hBAT a células T CD4+ aumenta após ativação das células

A ligação do anticorpo BAT de murganho foi anteriormente correlacionada com a ativação dos linfócitos. Esta atividade de ligação foi adicionalmente estudada para o mAb humano e foi examinado o nível de ligação do mAb BAT humano a células T CD4+ humanas, sujeita à ativação. As células foram isoladas a partir de um dador normal por seleção negativa e estimuladas com esferas conjugadas a anti-CD3 e anti-CD28 (5 µL/mL). Este tratamento foi selecionado de modo a exercer ativação policlonal através do recetor de células T e moléculas co-estimuladoras.

As células foram examinadas para ligação do mAb $\gamma 1$ BATRH_C/BATRK_D humanizado (hBAT) e anti-CD4 (4 °C, 1 hora) no dia

0, 2 e 5 após ativação (Fig. 30A, B e D). A análise foi realizada por citometria de fluxo nas células negativas para a coloração de PI. Os quadrantes foram determinados por controles de isotipo.

A ligação do mAb $\gamma 1$ BATRH_C/BATRK_D humanizado às células CD4⁺ aumentou dramaticamente após ativação (Fig. 30). Enquanto as células não ativadas, no dia 0 (Fig. 30A) e no dia 5 (Fig. 30C), apresentaram 17-20% de ligação positiva a hBAT, 52% e 77% das células CD4⁺ ligaram-se a hBAT no dia 2 (Fig. 30B) e dia 5 (Fig. 30D) da ativação, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos com amostras múltiplas e pode também ser demonstrado para células CD8⁺. Isto demonstra que a ligação de hBAT a células T é aumentada após ativação de TCR.

A dependência da dose desta ativação foi demonstrada por co-localização de hBAT com CD69. A ativação de células T é caracterizada por expressão à superfície celular de várias moléculas, algumas das quais foi demonstrado estarem envolvidas no processo de ativação. hBAT foi estudado pela sua co-expressão com diferentes marcadores, incluindo moléculas de ativação precoce e tardia. CD69, um marcador de ativação precoce, é regulado positivamente em células T após ativação. Quatro dias após ativação, as células foram examinadas para ligação a hBAT e anti-CD69 (4 °C, 1 hora). A análise foi realizada por citometria de fluxo em células negativas para coloração de PI. Os quadrantes foram determinados por controles de isotipo.

Uma ativação dependente da dose de células T CD4⁺ a partir de um dador normal é demonstrada na figura 31. Após forte ativação (5 μ L/mL de esferas conjugadas a anti-CD3 e anti-CD28; Fig. 31B) a maioria das células que foram capazes de ligação a hBAT (93%), foram células ativadas e foram identificadas por

expressão de CD69. O tempo aumentado de ativação resultou também em ligação aumentada para hBAT, começando no dia um da ativação. A dependência temporal da ativação pode também ser demonstrada e resultou num aumento na ligação de hBAT, começando no dia um da ativação. Interessante, a ligação de hBAT a células CD4+ e CD8+ permaneceu alta mesmo após diminuição de CD69 (dia 5), sugerindo uma correlação de ligação com fases múltiplas de ativação de linfócito. A ligação de hBAT a células CD69+ sugere que a expressão da proteína de ligação a hBAT está correlacionada com a ativação precoce.

Exemplo 27

Ligação de hBAT a células T ativadas que expressam CD25 e ligando de CD40

CD25, o recetor de elevada afinidade para IL2, é vital para a expansão de células T e está tipicamente aumentado na superfície de células ativadas. Cronologicamente segue o aparecimento de CD69 e a sua expressão é estendida diversos dias após a regulação negativa de CD69.

As células T CD4+ foram isoladas a partir de um dador normal por seleção negativa e estimuladas por diversos dias com esferas conjugadas a anti-CD3 e anti-CD28 (5 µL/mL). As células foram examinadas para ligação de hBAT e anti-CD25 (4 °C, 1 hora) no dia 0 (Fig. 32A), dia 1 (Fig. 32B) e dia 5 (Fig. 32D) da ativação relativamente aos controlos (dia 0, fig. 32A e dia 5 de não ativação, fig. 32C). A análise foi realizada por citometria de fluxo em células negativas para a coloração de PI. Os quadrantes foram determinados por controlos de isotipo.

As células T CD4⁺ e CD8⁺ mostraram um aumento dependente do tempo na expressão de CD25, após estimulação com anti-CD3 e anti-CD28, começando no dia 1 da estimulação. hBAT co-localizou-se com CD25 nestas células ativadas (Fig. 32).

A expressão de CD25 aumentou desde 55% das células no dia 1 (Fig. 32B) a 93% no dia 5 (Fig. 32D) após ativação. Em ambos os pontos de tempo, a maioria das células de ligação a hBAT foram CD25⁺ (85% e 98%, respetivamente).

A correlação com marcadores de ativação foi adicionalmente estendida ao marcador de ativação tardia ligando-de-CD40 (Fig. 33). A ligação de hBAT correlacionou-se positivamente com a expressão do ligando-de-CD40 em células T CD4⁺ (Fig. 33) e CD8⁺ de um modo dependente do tempo. Os resultados culminaram sugerindo que a ativação de células T induz a expressão da proteína de ligação a hBAT de um modo que se correlaciona com diferentes fases de ativação.

Exemplo 28

hBAT aumenta a sobrevivência de células CD4⁺ ativadas

Para examinar se as células T ativadas podem ser adicionalmente estimuladas pelo hBAT, células CD4⁺ humanas foram isoladas de dadores normais por seleção negativa e ativadas com uma concentração subótima (0,25 μ mL) de esferas anti-CD3/CD28 (Fig. 34). O hBAT (0,5 μ g/mL) foi adicionado 2 dias após ativação e o seu efeito foi avaliado através de determinação do número de células viáveis. Os resultados indicam que hBAT induziu um aumento significativo no número de células CD4⁺

viáveis isoladas a partir de dois dadores separados (Fig. 34A e B). Células não estimuladas de controlo morreram dentro de oito dias do isolamento, enquanto as células ativadas se expandiram de um modo que é típico de linfócitos, começando com proliferação celular, seguida por uma fase de número celular estável que conduz a uma fase dominada pela morte celular. A adição de hBAT aumentou a expansão de células CD4+ e aumentou o número de células em 1,5 vezes, relativamente às células na ausência do mAb.

O facto da eficácia do anticorpo BAT *in vivo* ser aumentada na presença de tumor, conjuntamente com os resultados aqui apresentados, sugere que a eficácia aumentada pode depender da presença de células alvo ativadas por BAT. Linfócitos dirigidos contra antigénios tumorais foram observados em doentes cancerígenos, embora ineficientes na inibição do crescimento tumoral, e podem servir como células alvo para a atividade de BAT. Assim, face aos resultados, pode ser implicado que o hBAT ativa as células CD4+ por estimulação da proliferação celular e/ou por inibição da morte celular.

Exemplo 29

Ligação de hBAT a linhas celulares Daudi e Jurkat

O BAT-1 de murganho foi produzido contra membranas da linha celular Daudi B e foi demonstrado que se liga a células T humanas. Para verificar a especificidade do anticorpo humanizado, o hBAT foi examinado para a sua ligação a duas linhas celulares humanas da origem mieloide: células Daudi - uma linha humana de linfoma de células B e células Jurkat - uma linha humana de leucemia de células T. o hBAT conjugado com FITC

foi incubado com células Daudi e Jurkat a uma concentração de 150 ug/mL (4 °C durante hora). A ligação foi determinada por citometria de fluxo.

Ambas as linhas celulares, Daudi (Fig. 35A) e Jurkat (Fig. 35B) ligam-se ao anticorpo humanizado. Além disso, a maioria das células em cultura de ambas as linhas foram capazes de se ligarem ao anticorpo. Uma IgG1 humana de isotipo condizente serviu como um controlo negativo (Fig. 35; controlo de isotipo) e estabeleceu o limite de leitura. Ambas as linhas celulares demonstraram uma intensidade semelhante de coloração de anticorpo sugerindo que expressam um número semelhante de moléculas de ligação a hBAT.

Exemplo 30

Ligação de hBAT a PBL de doentes cancerígenos

Após a observação que hBAT é capaz de ligação a células T humanas de dadores normais, comparou-se a sua capacidade para ligar linfócitos recolhidos de doentes de cancro. Os PBL foram isolados do sangue de um doente de cancro da próstata através de ficoll, seguido por aderência a placas de tecidos de cultura. As células não aderentes foram examinadas para ligação de marcadores de hBAT e de linfócitos. A ligação foi realizada a 4 °C durante 1 hora e determinada por citometria em linfócitos circunscritos. Controlos de isotipo foram utilizados para determinar os quadrantes. Estes doentes submeteram-se anteriormente a terapia que frequentemente afeta a presença e o fenótipo dos linfócitos. A ligação de hBAT a estas células é um pré-requisito para a sua atividade e como apresentado na figura 36, assemelha-se à ligação aos linfócitos de dadores

normais. Embora os números de linfócitos totais fossem baixos, o hBAT poderia ainda ligar uma grande proporção das subpopulações de linfócitos que se examinaram, incluindo 39% de células CD4+, 60% de células CD8+ e 68% de células B.

Exemplo 31

Reatividade cruzada de hBAT com tecidos humanos, de primata e de murino

O objetivo deste estudo foi examinar a reatividade cruzada do anticorpo monoclonal hBAT-1 com uma gama de tecido humano normal. Este estudo envolveu teste imuno-histoquímico do anticorpo monoclonal contra uma gama de tecidos humanos. Uma comparação de reatividade cruzada *in vitro* em tecidos de macacos cinomólogos e murganhos CD-1 foi também realizada.

(i) Fonte de tecido

Os tecidos utilizados neste estudo foram, cada um, obtidos a partir de três dadores não relacionados para minimizar as possibilidades de fatores específicos de dador que afetam a ligação do anticorpo. O tecido humano foi proporcionado por uma fonte ética. Os tecidos de primata e murino utilizados neste estudo foram obtidos a partir de dois animais de cada espécie, por uma fonte ética. O murino e o primata são potenciais sistemas de teste que podem ser avaliados em estudos de toxicologia pré-clínica. Os tecidos selecionados foram aqueles especificados nos Pontos da FDA para Considerar no Fabrico e Teste de Produtos de Anticorpo Monoclonal para Utilização Humana

(Office of Biologies Research and Review. Center for Biologies Evaluation and Research FDA. 1997) e as Regras que Governam Produtos Medicinais na Comunidade Europeia Vol. 3a (Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies, Dez. 1994, 3AB4a). Todos os tecidos utilizados nesta investigação foram instantaneamente congelados em azoto líquido e armazenados a -70 °C ou abaixo, até requerido. As secções criostáticas foram preparadas a uma espessura nominal de 5 µm a 8 µm. O controlo positivo foi células E6 Jurkat. As amostras de sangue fresco foram recolhidas a partir de 3 dadores e os esfregaços preparados no dia da utilização.

(ii) Conjugação de FITC

O anticorpo monoclonal hBAT-1 humanizado foi conjugado com FITC pela Custom Antibody Services Division da Serotec Ltd (ISO 9001, certificação) antes do estudo ser iniciado. A concentração final do anticorpo conjugado foi 1,99 mg/mL.

A validação inicial da metodologia foi realizada em tecido de controlo (linha celular E6 Jurkat) para determinar a concentração do título da ligação anticorpo-tecido com secções congeladas e outras condições relevantes para o desempenho apropriado da ligação anticorpo-tecido. As lâminas foram examinadas microscopicamente e classificadas subjetivamente contra a especificidade de anticorpo (Tabela 21). Com base nestes dados, as concentrações de hBAT-1 que foram utilizadas ao longo do estudo foram 1:100, 1:250 e 1:500.

TABELA 21

Diluição de hBAT-1	¹ Especificidade	Força do Sinal	<u>Fundo</u>
1:25	3	+++	3
1:50	3	+++	2
1:100	3	+++	1
1:250	3	+++	0
1:500	2	++	0
1:1000	1	+	0
1:2000	0	0	0
1:4000	0	0	0
1:8000	0	0	0
Negativo	0	0	0

¹ **Chave:** 3 refere-se a forte coloração positiva, 2 refere-se a coloração positiva, 1 refere-se a fraca coloração positiva e 0 refere-se a nenhuma coloração/sinal. +++ refere-se a forte sinal visual, ++ refere-se a bom sinal visual e + refere-se a fraco sinal visual.

(iii) Controlos.

As reacções de controlo negativo, em que o anticorpo foi substituído com um tampão, foram realizadas para cada tecido. Cada reacção de deteção incluiu células de controlo positivo, Jurkat E6, feitas reagir nas três diluições predeterminadas do anticorpo. Isto permitiu que a consistência da reacção fosse monitorizada. Foram incluídas em cada ensaio secções de tiroide, incubadas com anticorpo anti-actina, como controlo para o sistema de deteção.

(iv) Avaliação da reatividade cruzada

As secções de cada tecido foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para confirmar a sua identidade e adequabilidade para o estudo. As secções foram também incubadas com soro anti-actina de músculo liso (SMA; Tabela 22) ou soro de controlo anti-transferrina humana de coelho, que mostraram que os tecidos eram adequados para imuno-histoquímica. Três secções de cada um dos tecidos foram preparadas e incubadas com o anticorpo, que tinha sido conjugado com FITC, a concentrações de 1:100, 1:250 e 1:500, como determinado durante a fase de validação. Após lavagem em tampão e bloqueamento com soro normal, as secções foram incubadas com os apropriados anticorpos secundários e terciários para deteção da fosfatase alcalina, e contra-coradas com hematoxilina antes de examinação microscópica para determinar locais de ligação.

O método de coloração conjugado com FITC, com deteção por fosfatase alcalina continha os seguintes passos:

1. Secar ao ar secções criostáticas.
2. Fixar por imersão em acetona, 10 minutos à temperatura ambiente
3. Secar ao ar.
4. Lavar com tampão.
5. Soro normal 1:5, pelo menos, 20 minutos.
6. Lavar com tampão
7. Anticorpo de teste conjugado com FITC 1022292 a 1:100, 1:250 e 1:500, de um dia para o outro, a 2-8 °C.
8. Lavar com tampão.
9. Anticorpo monoclonal anti-FITC, 1:50, 30 minutos.
10. Lavar com tampão.

11. Anticorpo conjugado com fosfatase alcalina, 1:200, 2 horas.
12. Lavar com tampão.
13. Vector Red e levamisole, 20 minutos.
14. Lavar com tampão.
15. Contra-corar e montagem.

A fosfatase alcalina endógena foi minimizada através da utilização de Levamisole incorporado no cromogénio. Em tecidos onde a atividade endógena da fosfatase alcalina não podia ser suprimida (cólon, íleo, placenta e endotélio humano; cólon e pâncreas de murino; estômago, íleo e próstata de primata), foi utilizado o anticorpo conjugado com peroxidase de rábano a 1:200 durante 2 horas, seguido por reagente de Diaminobenzideno (DAB) durante 20 minutos.

(v) Resultados

As amostras de tecidos individuais corados com H&E foram examinadas para a qualidade do tecido, presença de características histológicas normais e adequação de preservação. Todas as amostras que foram testadas foram consideradas adequadas para os objetivos deste estudo. Coloração positiva foi conseguida na linha celular E6 Jurkat para hBAT-1 e nas secções de tiroide tratadas com actina de músculo liso. Como os controlos deram os resultados previstos, o teste foi considerado válido.

Os resultados individuais de reatividade cruzada para hBAT-1 e tecidos humanos são mostrados na Tabela 22. A coloração positiva foi detectada em endotélio humano de vasos sanguíneos numa diluição de 1:100 e foi provavelmente resultado da ligação

de hBAT-1 a linfócitos. A coloração positiva indica ligação ao tecido provável do anticorpo hBAT-1 monoclonal humanizado. Nenhuma coloração, *i. e.*, reatividade cruzada com hBAT-1, foi observada em secções de baço, esfregaços de sangue ou outros tecidos humanos (exceto endotélio humano - vasos sanguíneos). Nenhum dos tecidos de murino e de primata mostraram evidência de reatividade cruzada com hBAT-1.

TABELA 22

Tecido	SMA	Anticorpo hBAT-1			
		1:100	1:250	1:500	1:100
Adrenal	+	–	–	–	–
Bexiga	+	–	–	–	–
Células Sanguíneas	¹ N/A	–	–	–	–
Vasos Sanguíneos (endotélio)	+	+	–	–	–
Medula Óssea	N/A	–	–	–	–
Mama	+	–	–	–	–
Cerebelo	+	–	–		
Cortex Cerebral	+	–	–	–	–
Cólon	+	–	–	–	–
Olho (Retina)	+	–	–	–	–
Trompas de falópio	+	–	–	–	–
Coração	+	–	–	–	–

Íleo (trato GI)	+	-	-	-	-
Rim	+	-	-	-	-
Fígado	+	-	-	-	-
Pulmão	+	-	-	-	-
Nódulo linfático	+	-	-	-	-
Ovário	+	-	-	-	-
Pâncreas	+	-	-	-	-
Paratiroide	+	-	-	-	-
Parótida	+	-	-	-	-
Pituitária	+	-	-	-	-
Placenta	+	-	-	-	-
Próstata	+	-	-	-	-
Pele	+	-	-	-	-
Espinal medula	+	-	-	-	-
Baço	+	-	-	-	-
Estômago	+	-	-	-	-
Músculo estriado	+	-	-	-	-
Testículos	+	-	-	-	-
Timo	+	-	-	-	-
Tiroide	+	-	-	-	-
Amígdalas	+	-	-	-	-
Uréter	+	-	-	-	-
Colo do útero	+	-	-	-	-
Endométrio do útero	+	-	-	-	-

¹ N/A - resultado não aplicável

A descrição anterior das formas de realização específicas revelará assim inteiramente a natureza geral da invenção que outros podem, ao aplicar o conhecimento atual, prontamente modificar e/ou adaptar para várias aplicações tais formas de realização específicas sem experimentação supérflua e sem se afastarem do conceito genérico, e, deste modo, tais adaptações e modificações deverão/pretendem ser compreendidas dentro do significado e gama de equivalentes das formas de realização divulgadas. É para ser entendido que a fraseologia ou a terminologia aqui utilizada é para o objetivo de descrição e não de limitação. Os meios, materiais e passos para realizar várias funções divulgados podem tomar uma variedade de formas alternativas sem se afastarem da invenção. Assim as expressões "meios de..." e "meios para...", ou qualquer linguagem de passo de método, como podem ser encontradas na descrição acima e/ou nas reivindicações abaixo, seguidas por uma indicação funcional, pretendem definir e cobrir qualquer estrutura ou elemento estrutural, físico, químico ou elétrico, ou qualquer passo de método, que possa existir agora ou no futuro que realiza a referida função, sendo ou não precisamente equivalente à forma ou formas de realização divulgadas na descrição acima, *i. e.*, outros meios ou passos para realizar as mesmas funções podem ser utilizados; e é pretendido que tais expressões sejam dadas na sua interpretação mais ampla.

LISTAGEM DA SEQUÊNCIAS

<110> CURETECH LTD.

MOR - RESEARCH APPLICATIONS LTD.

<120> Anticorpos monoclonais imunomoduladores humanizados para o tratamento de doença neoplásica ou imunodeficiência

<130> CT/004 PCT

<140> PCT/IL03/00425

<141> 2003-05-22

<150> IL 149820

<151> 2002-05-23

<160> 93

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 1

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
			20			

<210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa = Phe ou Tyr

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (13) .. (13)
 <223> Xaa = Trp ou leu

<400> 2
Trp Xaa Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Xaa Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 3
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (14) .. (14)

<223> Xaa = Asp ou Ser

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (15)..(15)

<223> Xaa = Tyr ou Phe

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (16)..(16)

<223> Xaa = Cys ou Thr

<400> 3

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

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 4

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

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Ile ou Val

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (28)..(28)

<223> Xaa = Thr ou Ser

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (30)..(30)

<223> Xaa = Thr ou Ser

<400> 5

Gln	Xaa	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5					10					15		
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Xaa	Phe	Xaa		
		20					25						30		

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = Arg ou Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (11)..(11)

<223> Xaa = Gln ou Lys

<400> 6

Trp val xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu xaa Trp Met Gly
1 5 10

<210> 7

<211> 32

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = Val ou Ala

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (11)..(11)

<223> Xaa = Asn ou Ser

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (21) .. (21)

<223> Xaa = Thr ou Asn

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (31) .. (31)

<223> Xaa = Val ou Ala

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (32) .. (32)

<223> Xaa = Arg ou Lys

<400> 7

Arg	Phe	Xaa	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Xaa	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln
1			5						10					15	
Ile	Thr	Ser	Leu	Xaa	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Met	Tyr	Phe	Cys	Xaa	Xaa
			20					25					30		

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 8

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 9
Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 10
Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 11
Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 12

Asn	Tyr	Gly	Met	Asn
1				5

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 13

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

Gly

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 14

Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 15

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 15

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

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 16

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

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 17

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

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

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 18

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

<210> 19

<211> 129

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 19

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

<210> 20

<211> 117

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 20

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

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 21

<211> 117

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 21

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

<210> 22

<211> 117

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 22

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

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 23

Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	
		20						25					30			

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

<210> 24

<211> 117

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 24

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

<210> 25
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 25

atggatttac aggtgcagat ttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc	60
agaggacaaa ttgttctcac ccagttctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag	120
gtcaccataa cctgcagtgc cagggtcaagt gtaagttaca tgcactgggt ccagcagaag	180
ccaggcactt ctccaaact ctggatttat aggacatcca acctggcttc tggagtccct	240
gctcgcttca gtggcagtgg atctgggacc tcttactgtc tcacaatcag ccgaatggag	300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gtttccact cacgttcggc	360
tcggggacaa agttggaaat aaaa	384

<210> 26
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 26

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

Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Asp	Ser	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala
65					70					75					80
Glu	Glu	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Asn
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Asn	Asn	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr
			100					105					110		
Tyr	Phe	Cys	Val	Arg	Val	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
		115					120					125			
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
130						135									

<210> 27

<211> 408

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 27

atggcttggg	tgtggacctt	gctattcctg	atggcagctg	cccaaagtat	ccaagcacag	60
atccagttgg	tgcagtctgg	acctgagttg	aagaagcctg	gagagacagt	caagatctcc	120
tgcaaggcctt	ctggatatac	tttcacaaac	tatggaatga	actgggtgaa	gcaggctcca	180
ggaaagggtt	taaagtggat	gggctggata	aacaccgaca	gtggagagtc	aacatatgct	240
gaagagttca	agggacgggt	tgccttctct	ttggaaacct	ctgccaacac	tgcctatttg	300
cagatcaaca	acctcaacaa	tgaggacacg	gctacatatt	tctgtgtgag	agtcggctac	360
gatgcttttg	actactgggg	tcaaggaacc	tcagtcaccg	tctcctca		408

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 28

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

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 29

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

Leu	Gln	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Met	Tyr	Phe	Cys
				85					90					95	
Ala	Lys	Glu	Ser	His	Ser	Ser	Ala	Leu	Asp	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

<210> 30

<211> 43

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 30

cccaagcttg ccgccaccat ggacatgagg gtcccgctc agc

43

<210> 31

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 31

tcctggggct cctgctgctc tggctcccag gtgccaaatg

40

<210> 32

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 32

tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca

40 |

<210> 33

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 33

tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt

40 |

<210> 34

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 34

caagtgtgaag ttacatgcac tggatcagc agaaaccagg

40 |

<210> 35

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 35

gaaagcccct aagctcctga tctataggac atccaacctg

40

<210> 36

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 36

gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg

40

<210> 37

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 37

ggacagattt cactctcacc atcaacagcc tgcagcctga

40

<210> 38

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 38

agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc	40
--	-----------

<210> 39

<211> 55

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 39

ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat ccgcg	55
---	-----------

<210> 40

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 40

gagcagcagg agccccagga gctgagcggg gaccctcatg	40
--	-----------

<210> 41

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 41

actgcgtcaa cacaatttca catttggcac ctgggagcca

40

<210> 42

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 42

gtgactctgt ctctacaga tgcagacagg gaggatggag

40

<210> 43

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 43

gtgcatgtaa cttacacttg acctggcact gcaagtgatg

40

<210> 44

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 44

tcaggagctt aggggctttc cctggtttct gctgatacca

40

<210> 45

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 45

ctagatggga ccccagaagc caggttgat gtcctataga

40

<210> 46

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 46

ggtgagagtg aaatctgtcc cagatccact gccgctgaat

40

<210> 47

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 47

aatagtaagt tgcaaaatct tcaggctgca ggctgttgat

40

<210> 48

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 48

cctccgccga acgtgagtgg gaaactactc ctttgctggc

40

<210> 49

<211> 35

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 49

cgcggatcca ctcacgtttg atctccagct tggtc

35

<210> 50

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 50

caagtgtaag ttacatgcac tggttccagc agaaaccagg

40

<210> 51

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 51

gaaagcccct aagctctgga tctataggac atccaacctg

40

<210> 52

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 52

ggacagatta cactctcacc atcaacagcc tgcagcctga

40

<210> 53

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 53

tccagagctt aggggctttc cctggtttct gctggaacca

40

<210> 54

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 54

ggtgagagtg taatctgtcc cagatccact gccgctgaac

40

<210> 55

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 55

ggtgagacag taagatgtcc cagatccact gccgctgaac

40

<210> 56

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 56

ggacatctta ctgtctcacc atcaacagcc tgcagcctga

40

<210> 57

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 57

cccaagcttg ccgccaccat ggactggacc tggaggatcc

40

<210> 58

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 58

tcttcttggt ggcagcagca acaggtgccc act

33

<210> 59

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 59

cccagggtgca gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa

40

<210> 60

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 60

gcctgggggcc tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga

40

<210> 61

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 61

tatagcttca gtaactatgg aatgaactgg gtgcgacagg

40

<210> 62
<211> 40
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<400> 62

cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac

40

<210> 63
<211> 40
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<400> 63

cgacagtgga gagtcaacat atgctgaaga gttcaaggga

40

<210> 64
<211> 40
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<400> 64

cggtttgtct tctccttgga cacctctgtc agcacggcat 40

<210> 65

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 65

atctgcagat caccagcctc acggctgagg acactggcat 40

<210> 66

<211> 35

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 66

gtattttctgt gcgaaagtcg gctacgatgc tttgg 35

<210> 67

<211> 54

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 67

actactgggg ccaggaacc ctggtcaccg tctcctcagg tgagtggatc cgcg

54

<210> 68

<211> 45

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 68

tgctgccacc aagaagagga tccttcagg tggagtccat ggtgg

45

<210> 69

<211> 36

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 69

ttgcaccagc tgcacctggg agtgggcacc tgttgc

36

<210> 70

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 70

tcttcactga ggccccaggc ttcttaagct cagacccaga

40

<210> 71

<211> 39

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 71

ccatagttac tgaagctata tccagaagct tgcaggaga

39

<210> 72

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 72

ctgaagccct tgtccagggg cctgtcgcac ccagttcatt

40

<210> 73

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 73

atgttgactc tccactgtcg gtgtttatcc atcccatcca

40

<210> 74

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 74

tccaaggaga agacaaaccg tcccttgaac tcttcagcat

40

<210> 75

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 75

gaggctggtg atctgcagat atgccgtgct gacagaggtg

40

<210> 76

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 76

cgactttcgc acagaaatac atgccagtgt cctcagccgt

40

<210> 77

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 77

ttccctggcc ccagtagtcc aaagcatcgt agc

33

<210> 78

<211> 36

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 78

cgcggatcca ctcacctgag gagacggtga ccaggg

36

<210> 79

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 79

tatactttca caaactatgg aatgaactgg gtgcgacagg

40

<210> 80

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 80

ccatagtttg tgaaagtata tccagaagcc ttgcaggaga

40

<210> 81

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 81

cggtttgtct tctccttgga cacctctgtc aacacggcat

40

<210> 82

<211> 35

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 82

gtatttctgt gtgagagtcg gctacgatgc tttgg

35

<210> 83

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 83

cgactctcac acagaaatac atgccagtgt cctcagccgt

40

<210> 84

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 84

atctgcagat caccagcctc aacgctgagg acactggcat

40

<210> 85

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 85

gaggctggtg atctgcagat atgccgtgtt gacagaggtg

40

<210> 86

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 86

tatactttca caaactatgg aatgaactgg gtgaagcagg

40

<210> 87

<211> 412

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 87

aagcttgccg ccaccatgga catgaggggc cccgctcagc tcctggggct cctgctgctc	60
tggtctcccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca	120
tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt caagtgtgtaag ttacatgcac	180

tggtatcagc agaaaccagg gaaagcccct aagctcctga tctataggac atccaacctg	240
gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	300
atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc	360
ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat cc	412

<210> 88

<211> 412

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 88

aagcttgccg ccaccatgga catgagggtc cccgctcagc tcctggggct cctgctgctc	60
tggtccccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca	120
tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggc caagtgtgtaag ttacatgcac	180
tggttccagc agaaaccagg gaaagcccct aagctctgga tctataggac atccaacctg	240
gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg ggacagatta cactctcacc	300
atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc	360
ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat cc	412

<210> 89

<211> 412

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 89

aagcttgccg ccaccatgga catgagggtc cccgctcagc tcctggggct cctgctgctc	60
tggtccccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca	120
tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggc caagtgtgtaag ttacatgcac	180

tggttccagc	agaaaccagg	gaaagcccct	aagctctgga	tctataggac	atccaacctg	240
gcttctgggg	tcccatctag	attcagcggc	agtggatctg	ggacatctta	ctgtctcacc	300
atcaacagcc	tgcagcctga	agattttgca	acttactatt	gccagcaaag	gagtagtttc	360
ccactcacgt	tcggcggagg	gaccaagctg	gagatcaaac	gtgagtggat	cc	412

<210> 90

<211> 436

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 90

aagcttgccg	ccaccatgga	ctggacctgg	aggatcctct	tcttgggtggc	agcagcaaca	60
ggtgcccact	cccaggtgca	gctggtgcaa	tctgggtctg	agcttaagaa	gcctggggcc	120
tcagtgaaga	tctcctgcaa	ggcttctgga	tatactttca	caaactatgg	aatgaactgg	180
gtgcgacagg	cccctggaca	agggcttcag	tggatgggat	ggataaacac	cgacagtgga	240
gagtcaacat	atgctgaaga	gttcaaggga	cggtttgtct	tctccttggg	cacctctgtc	300
aacacggcat	atctgcagat	caccagcctc	acggctgagg	acactggcat	gtatttctgt	360
gtgagagtcg	gctacgatgc	tttggactac	tggggccagg	gaaccctggg	caccgtctcc	420
tcaggtgagt	ggatcc					436

<210> 91

<211> 436

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 91

aagcttgccg	ccaccatgga	ctggacctgg	aggatcctct	tcttgggtggc	agcagcaaca	60
ggtgcccact	cccaggtgca	gctggtgcaa	tctgggtctg	agcttaagaa	gcctggggcc	120

tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg	180
gtgcgacagg cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga	240
gagtcaacat atgctgaaga gttcaaggga cggtttgtct tctccttggga cacctctgtc	300
agcacggcat atctgcagat caccagcctc acggctgagg acactggcat gtatttctgt	360
gcgaaagtcg gctacgatgc tttggactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc	420
tcaggtgagt ggatcc	436

<210> 92

<211> 436

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 92

aagcttgccg ccaccatgga ctggacctgg aggatcctct tcttgggtggc agcagcaaca	60
ggtgccact cccaggtgca gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc	120
tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg	180
gtgcgacagg cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga	240
gagtcaacat atgctgaaga gttcaaggga cggtttgtct tctccttggga cacctctgtc	300
agcacggcat atctgcagat caccagcctc acggctgagg acactggcat gtatttctgt	360
gcgaaagtcg gctacgatgc tttggactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc	420
tcaggtgagt ggatcc	436

<210> 93

<211> 10259

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> vetor de expressão único pG1KD210.BAT-1.RH_C/RkD

<400> 93

ttgaagacga	aagggcctcg	tgatacgctt	atTTTTatag	gttaatgtca	tgataataat	60
ggtttcttag	acgtcagggtg	gcacttttctg	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatttgttt	120
atTTTTctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	180
tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	240
ctTTTTtgcg	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	300
agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	360
taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgtttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	420
tctgctatgt	ggcgcggtat	tatcccgtgt	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgccg	480
catacactat	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	540
ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataaactgac	600
ggccaactta	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	660
catgggggat	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccataacc	720
aaacgacgag	cgtgacacca	cgatgcctgc	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	780
aactggcgaa	ctacttactc	tagcttcccg	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	840
taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctgggtta	ttgctgataa	900
atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	960
gcccctcccgt	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	1020
tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	cagaccaagt	1080
ttactcatat	atactttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	1140
gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	1200
agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gacctttttt	ttctgcgcgt	1260
aatctgctgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttggt	tgccggatca	1320
agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggtctcagc	agagcgcaga	taccaaatac	1380
tgctcttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	1440
atacctcgct	ctgctaattc	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	1500
taccggggtg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	1560
gggttcgtgc	acacagccca	gcttgagcgc	aacgacctac	accgaactga	gataacctaca	1620
gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	1680
aagcggcagg	gtcgggaacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	1740
tctttatagt	cctgtcgggt	ttcggcacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgtct	1800
gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	1860
cttttgctgg	ccttttgctc	acatgttctt	tctgcgtta	tcccctgatt	ctgtggataa	1920
ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgcgcg	agccgaacga	ccgagcgcag	1980
cgagtcagtg	agcggaggag	cgggaagagcg	cctgatgcgg	tattttctcc	ttacgcattct	2040
gtgcggtatt	tcacaccgca	tatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	2100

gttaagccag	tatacaactcc	gctatcgcta	cgtagactggg	tcatggctgc	gccccgacac	2160
ccgccaacac	ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcatc	cgcttacaga	2220
caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	2280
cgcgcgaggc	agcatgcatc	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccgcccc	taactccgcc	2340
catcccgccc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	ccccatggct	gactaatttt	2400
ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	2460
aggctttttt	ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctagct	tacagctcag	ggctgcgatt	2520
tcgcgccaaa	cttgacggca	atcctagcgt	gaaggctggt	aggattttat	ccccgctgcc	2580
atcatgggtc	gaccattgaa	ctgcatcgtc	gccgtgtccc	aaaatatggg	gattggcaag	2640
aacggagacc	taccctggcc	tccgctcagg	aacgagttca	agtacttcca	aagaatgacc	2700
acaacctctt	cagtgaagg	taaacagaat	ctggtgatta	tgggtaggaa	aacctggttc	2760
tccattcctg	agaagaatcg	acctttaaag	gacagaatta	atatagttct	cagtagagaa	2820
ctcaaagaac	caccacgagg	agctcatttt	cttgccaaaa	gtttggatga	tgccttaaga	2880
cttattgaac	aaccggaatt	ggcaagtaaa	gtagacatgg	tttggatagt	cggaggcagt	2940
tctgtttacc	aggaagccat	gaatcaacca	ggccacctca	gactctttgt	gacaaggatc	3000
atgcaggaat	ttgaaagtga	cacgtttttc	ccagaaattg	atttggggaa	atataaactt	3060
ctcccagaat	acccaggcgt	cctctctgag	gtccaggagg	aaaaaggcat	caagtataag	3120
tttgaagtct	acgagaagaa	agactaacag	gaagatgctt	tcaagttctc	tgctccccctc	3180
ctaaagctat	gcatttttat	aagaccatgg	gacttttgct	ggcttttagat	ctttgtgaag	3240
gaaccttact	tctgtggtgt	gacataattg	gacaaactac	ctacagagat	ttaaagctct	3300
aaggtaaata	taaaattttt	aagtgtataa	tgtgttaaac	tactgattct	aattgtttgt	3360
gtattttaga	ttccaacctt	tggaaactgat	gaatgggagc	agtgggtggaa	tgcctttaat	3420
gaggaaaacc	tgttttgctc	agaagaaatg	ccatctagtg	atgatgaggc	tactgctgac	3480
tctcaacatt	ctactcctcc	aaaaaagaag	agaaaggtag	aagaccccaa	ggactttcct	3540
tcagaattgc	taagtttttt	gagtcatgct	gtgttttagta	atagaactct	tgcttgcttt	3600
gctatttaca	ccacaaagga	aaaagctgca	ctgctataca	agaaaattat	ggaaaaatat	3660
tctgtaacct	ttataagtag	gcataacagt	tataatcata	acatactggt	ttttcttact	3720
ccacacaggc	atagagtgtc	tgctattaat	aactatgctc	aaaaattgtg	tacctttagc	3780
tttttaattt	gtaaaggggt	taataaggaa	tatttgatgt	atagtgcctt	gactagagat	3840
cataatcagc	cataccacat	ttgtagaggt	tttacttgct	ttaaaaaacc	tcccacacct	3900
ccccctgaac	ctgaaacata	aaatgaatgc	aattgttgtt	gttaacttgt	ttattgcagc	3960
ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	catttttttc	4020
actgcatctt	agttgtggtt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	tctactagtg	4080
gccggccggg	gcgatcgctc	gagatatcta	ttaatagtaa	tcaattacgg	ggtcattagt	4140
tcatagccca	tatatggagt	tccgcgttac	ataacttacg	gtaaatggcc	cgcttggtcg	4200
accgccaac	gacccccgcc	cattgacgtc	aataatgacg	tatgttccca	tagtaacgcc	4260

aatagggact	ttccattgac	gtcaatgggt	ggagtattta	cggtaaactg	cccacttggc	4320
agtacatcaa	gtgtatcata	tgccaagtac	gccccctatt	gacgtcaatg	acggtaaattg	4380
gccccgctgg	cattatgccc	agtacatgac	cttatgggac	tttctactt	ggcagtacat	4440
ctacgtatta	gtcatcgcta	ttaccatggg	gatgcgggtt	tggcagtaca	tcaatgggag	4500
tggatagcgg	tttgactcac	ggggatttcc	aagtctccac	cccattgacg	tcaatgggag	4560
tttgtttttg	cacaaaaatc	aacgggactt	tccaaaatgt	cgtaacaact	ccgccccatt	4620
gacgcaaattg	ggcggtaggc	gtgtacggg	ggagggtctat	ataagcagag	ctcgttttagt	4680
gaaccgtcag	atcgccctga	gacgccatcc	acgctgtttt	gacctccata	gaagacaccg	4740
ggaccgatcc	agcctccgag	gccgggaacg	gtgcattgga	acgcggattc	cccgtgcaa	4800
gagtgacgta	agtaccgcct	atagagtcta	taggcccacc	cccttggtt	cttatgcatg	4860
ctatactgtt	tttggttgg	ggtctataca	ccccgcctt	ctcatgttat	aggtgatggt	4920
atagcttagc	ctataggtgt	gggttattga	ccattattga	ccactcccct	attggtgacg	4980
atactttcca	ttactaatcc	ataacatggc	tctttgccac	aactctcttt	attggctata	5040
tgccaataca	ctgtccttca	gagactgaca	cggactctgt	atttttacag	gatggggtct	5100
catttattat	ttacaaattc	acataataca	caccaccgtc	cccagtgtcc	gcagttttta	5160
ttaaacataa	cggtggatct	ccacgcgaat	ctcgggtacg	tgttccggac	atgggctctt	5220
ctccggtagc	ggcggagctt	ctacatccga	gccctgctcc	catgcctcca	gcgactcatg	5280
gtcgctcggc	agctccttgc	tcctaacagt	ggaggccaga	cttaggcaca	gcacgatgcc	5340
caccaccacc	agtgtgccgc	acaaggccgt	ggcggtaggg	tatgtgtctg	aaaatgagct	5400
cggggagcgg	gcttgaccgc	ctgacgcatt	tgggaagactt	aaggcagcgg	cagaagaaga	5460
tgcaggcagc	tgagttgttg	tgttctgata	agagtcagag	gtaactcccg	ttgcggtgct	5520
gttaacgggtg	gagggcagtg	tagtctgagc	agtaactcgt	gctgccgcgc	gcgccaccag	5580
acataatagc	tgacagacta	acagactgtt	cctttccatg	ggtcttttct	gcagtcaccg	5640
tccttgacac	gcgtctcggg	aagcttgccg	ccaccatgga	catgagggtc	cccgtctagc	5700
tcctggggct	cctgctgctc	tggctcccag	gtgccaaatg	tgaaattgtg	ttgacgcagt	5760
ctccatcctc	cctgtctgca	tctgtaggag	acagagtcac	catcacttgc	agtgccaggt	5820
caagtgtaat	ttacatgcac	tggttccagc	agaaaccagg	gaaagcccct	aagctctgga	5880
tctataggac	atccaacctg	gcttctgggg	tcccatctag	attcagcggc	agtggatctg	5940
ggacatctta	ctgtctcacc	atcaacagcc	tgcagcctga	agattttgca	acttactatt	6000
gccagcaaag	gagtagtttc	ccactcacgt	tccgaggagg	gaccaagctg	gagatcaaac	6060
gtgagtggat	ccatctggga	taagcatgct	gttttctgtc	tgtccctaac	atgccctgtg	6120
attatgcgca	aacaacacac	ccaagggcag	aactttgtta	cttaaaccac	atcctgtttg	6180
cttctttcct	caggaactgt	ggctgcacca	tctgtcttca	tcttcccgcc	atctgatgag	6240

cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcctgctga ataacttcta tcccagagag	6300
gccaaagtac agtgggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc	6360
acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa	6420
gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg	6480
cccgtcacia agagcttcaa caggggagag tgttagaggg agaagtgcc ccacctgctc	6540
ctcagttcca gcctgacccc ctcccatcct ttggcctctg accctttttc cacaggggac	6600
ctacccttat tgcggtctc cagctcatct ttcacctcac cccctctctc ctctttggt	6660
ttaattatgc taatgttga ggagaatgaa taaataaagt gaatctttgc acctgtggtg	6720
gatctaataa aagatattta ttttcattag atatgtgtgt tggttttttg tgtgcagtgc	6780
ctctatctgg aggccaggta gggctggcct tgggggaggg ggaggccaga atgactccaa	6840
gagctacagg aaggcaggtc agagacccca ctggacaaac agtggctgga ctctgcacca	6900
taacacacaa tcaacagggg agtgagctgg aaatttgcta gcgaattcta ttaatagtaa	6960
tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg	7020
gtaaatggcc cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg	7080
tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta	7140
cggtaaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt	7200
gacgtcaatg acggtaaatg gcccgctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac	7260
tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt	7320
tggcagtaca tcaatgggag tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac	7380
cccattgacg tcaatgggag ttgtttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt	7440
cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat	7500
ataagcagag ctctgttagt gaaccgtcag atcgccctgga gatgccatcc acgtgtttt	7560
gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcattgga	7620
acgcggattc cccgtgccaa gagtgcgta agtaccgcct atagagtcta taggcccacc	7680
cccttggttt cttatgcatg ctatactgtt ttggccttg ggtctataca cccccgcttc	7740
ctcatgttat aggtgatggt atagcttagc ctataggtgt gggttattga ccattattga	7800
ccactcccct attggtgacg atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac	7860
aactctcttt attggtata tgccaataca ctgtccttca gagactgaca cggactctgt	7920
atttttacag gatggggtct cathttattt ttacaaattc acatatacaa caccaccgtc	7980
cccagtggcc gcagttttta ttaaacataa cgtgggatct ccacgcgaat ctcggttacg	8040
tgttccggac atgggctctt ctccggtagc ggcggagctt ctacatccga gccctgctcc	8100
catgcctcca gcgactcatg gtcgctcggc agctccttgc tccaaacagt ggaggccaga	8160
cttaggcaca gcacgatgcc caccaccacc agtgtgcccgc acaaggccgt ggcggtaggg	8220
tatgtgtctg aaaatgagct cggggagcgg gcttgaccg ctgacgcatt tgggaagactt	8280
aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc tgagttgttg tgttctgata agagtcagag	8340
gtaactcccc ttgcggtgct gttaacggtg gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt	8400

gctgccgcgc	gcgccaccag	acataatagc	tgacagacta	acagactggt	cctttccatg	8460
ggctctttct	gcagtcaccg	tccttgacac	gcgtctcggg	aagcttgccg	ccaccatgga	8520
ctggacctgg	aggatcctct	tcttggtggc	agcagcaaca	ggtgccctact	cccaggtgca	8580
gctggtgcaa	tctgggtctg	agcttaagaa	gcctggggcc	tcagtgaaga	tctcctgcaa	8640
ggcttctgga	tatactttca	caaactatgg	aatgaactgg	gtgcgacagg	ccccctggaca	8700
agggcttcag	tggatgggat	ggataaacac	cgacagtgga	gagtcaacat	atgctgaaga	8760
gttcaaggga	cggtttgtct	tctccttggg	cacctctgtc	aacacggcat	atctgcagat	8820
caccagcctc	acggctgagg	acactggcat	gtatttctgt	gtgagagtcg	gctacgatgc	8880
tttggaactac	tgggggccagg	gaaccttggg	caccgtctcg	agcgccctca	ccaaggggccc	8940
atcggtcttc	cccctggcac	cctcctccaa	gagcacctct	gggggcacag	cggccctggg	9000
ctgcctggtc	aaggactact	tccccgaacc	ggtgacggtg	tcgtggaact	caggcgccct	9060
gaccagcggc	gtgcacacct	tcccggtgtg	cctacagtcc	tcaggactct	actcccctcag	9120
cagcgtggtg	accgtgccct	ccagcagctt	gggcacccag	acctacatct	gcaacgtgaa	9180
tcacaagccc	agcaacacca	aggtggacaa	gaaagttagg	cccaaattct	gtgacaaaac	9240
tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	ggaccgtcag	tcttctcttt	9300
ccccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccgacc	cctgaggtca	catgctggtt	9360
ggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	caagttcaac	tggtagctgg	acggcgtgga	9420
ggtgcataat	gccaaagaca	agccgcggga	ggagcagtac	aacagcacgt	accgggtggt	9480
cagcgtcctc	accgtcctgc	accaggactg	gctgaatggc	aaggagtaca	agtgcagggt	9540
ctccaacaaa	gccctcccag	cccccatcga	gaaaaccatc	tccaaagcca	aagggcagcc	9600
ccgagaacca	caggtgtaca	ccctgcccc	atcccgagg	gagatgacca	agaaccaggt	9660
cagcctgacc	tgcctggtca	aaggcttcta	tcccagcgac	atcgccgtgg	agtgggagag	9720
caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	cacgcctccc	gtgctggact	ccgacggctc	9780
cttcttctct	tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	tggcagcagg	ggaacgtctt	9840
ctcatgctcc	gtgatgcatg	aggctctgca	caaccactac	acgcagaaga	gcctctccct	9900
gtctccgggt	aaatgagtgc	gacggccggc	aagccccgct	ccccgggctc	tcgcggtcgc	9960
acgaggatgc	ttggcacgta	ccccctgtac	atacttccc	ggcgcccagc	atggaaataa	10020
agcaccggat	ctaataaaag	atatttatct	tcattagata	tgtgtgttgg	ttttttgtgt	10080
gcagtgcctc	tatctggagg	ccaggtaggg	ctggccttgg	gggaggggga	ggccagaatg	10140
actccaagag	ctacaggaag	gcaggtcaga	gacccactg	gacaaacagt	ggctggactc	10200
tgcaccataa	cacacaatca	acaggggagt	gagctggaaa	tttgctagcg	aattaattc	10259

Lisboa, 7 de outubro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humanizado tendo, pelo menos, uma região determinante de complementaridade (CDR) do anticorpo monoclonal BAT-1 de murino (mBAT-1) e uma região de estrutura (FR) derivada de uma imunoglobulina humana aceitadora, em que o anticorpo humanizado retém a atividade antitumoral do anticorpo monoclonal mBAT-1 e é menos imunogénico num indivíduo humano do que o referido anticorpo de murino.
2. Anticorpo monoclonal humanizado da reivindicação 1, em que o anticorpo humanizado induz um maior efeito antitumoral do que aquele induzido pelo anticorpo BAT-1 de murino parental.
3. Anticorpo humanizado da reivindicação 1, compreendendo as regiões determinantes de complementaridade (CDR) do anticorpo monoclonal BAT-1 de murino (mBAT-1), em que o referido anticorpo humanizado compreende:
 - a. regiões variáveis da cadeia leve da fórmula: $FR_{L1}-CDR_{L1}-FR_{L2}-CDR_{L2}-FR_{L3}-CDR_{L3}-FR_{L4}$, em que cada FR é independentemente uma região de estrutura de um anticorpo humano e cada CDR é uma região determinante de complementaridade, derivada de BAT-1;
 - b. as regiões variáveis da cadeia pesada da fórmula: $FR_{H1}-CDR_{H1}-FR_{H2}-CDR_{H2}-FR_{H3}-CDR_{H3}-FR_{H4}$, em que cada FR é separadamente uma região de estrutura de um anticorpo humano e cada CDR é uma região determinante de complementaridade de mBAT-1.

4. Anticorpo monoclonal humanizado tendo uma região Fab geneticamente modificada compreendendo as regiões determinantes de complementaridade (CDR) do anticorpo monoclonal BAT-1 de murino (mBAT-1), em que o anticorpo geneticamente modificado retém a atividade biológica do referido mBAT-1 e em que o referido anticorpo monoclonal geneticamente modificado compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de:

(i) uma região variável da cadeia pesada compreendendo as sequências de aminoácidos de: CDR_{H1} (SEQ ID N°: 12); CDR_{H2} (SEQ ID N°: 13); CDR_{H3} (SEQ ID N°: 14); e uma região variável da cadeia leve compreendendo as sequências de aminoácidos de CDR_{L1} (SEQ ID N°: 9); CDR_{L2} (SEQ ID N°: 10); CDR_{L3} (SEQ ID N°: 11);

(ii) regiões variáveis da cadeia pesada e cadeia leve compreendendo as sequências de aminoácidos que têm mais do que cerca de 80 por cento de semelhança com toda ou parte das sequências de: CDR_{H1} (SEQ ID N°: 12); CDR_{H2} (SEQ ID N°: 13); CDR_{H3} (SEQ ID N°: 14); CDR_{L1} (SEQ ID N°: 9); CDR_{L2} (SEQ ID N°: 10); CDR_{L3} (SEQ ID N°: 11);

(iii) um anticorpo de (i) ou (ii) em que um ou mais resíduos de aminoácidos foi adicionado, suprimido, substituído ou modificado quimicamente, sem afetar substancialmente a atividade biológica ou a especificidade de ligação do anticorpo.

5. Anticorpo monoclonal humanizado da reivindicação 4, em que as regiões de estrutura (FR) são derivadas de um anticorpo humano.

6. Anticorpo monoclonal humanizado da reivindicação 3 compreendendo regiões determinantes de complementaridade (CDR) do anticorpo monoclonal BAT-1 de murino (mBAT-1), em que o referido anticorpo humanizado compreende:

a. regiões variáveis da cadeia leve da fórmula: FR_{L1} - CDR_{L1} - FR_{L2} - CDR_{L2} - FR_{L3} - CDR_{L3} - FR_{L4} , em que cada FR é independentemente uma região de estrutura de um anticorpo humano e cada CDR é uma região determinante de complementaridade, em que a sequência de aminoácidos de CDR_{L1} é SARSSVSYMH (SEQ ID N°: 9); CDR_{L2} é RTSNLAS (SEQ ID N°: 10); CDR_{L3} é QQRSSFPLT (SEQ ID N°: 11);

b. as regiões variáveis da cadeia pesada da fórmula: FR_{H1} - CDR_{H1} - FR_{H2} - CDR_{H2} - FR_{H3} - CDR_{H3} - FR_{H4} , em que cada FR é separadamente uma região de estrutura de um anticorpo humano e cada CDR é uma região determinante de complementaridade, em que a sequência de aminoácidos de: CDR_{H1} é NYGMN (SEQ ID N°: 12); CDR_{H2} é WINTDSGESTYAEFFKG (SEQ ID N°: 13); CDR_{H3} é VGYDALDY (SEQ ID N°: 14).

7. Anticorpo humanizado da reivindicação 6,

em que o referido anticorpo humanizado induz um maior efeito antitumor do que o anticorpo monoclonal BAT-1 de murino; ou

em que o referido anticorpo humanizado induz um maior efeito antimetastático do que o anticorpo monoclonal BAT-1 de murino; ou

em que as FR da região variável da cadeia pesada são derivadas das FR da região variável da cadeia pesada do anticorpo humano hsighv1295; ou

em que as FR da região variável da cadeia leve kapa são baseadas nas FR da região variável da cadeia leve kapa do anticorpo TEL9 humano; ou

têm uma região constante kapa humana; ou

em que o anticorpo é ainda marcado com um marcador de detecção, imobilizado numa fase sólida ou conjugado a um heterólogo composto; ou

em que as referidas regiões variáveis da cadeia leve do anticorpo monoclonal humanizado são selecionadas do grupo consistindo de: BATRK_A (SEQ ID N°: 15), BATRK_B (SEQ ID N°: 16), BATRK_C (SEQ ID N°: 17), BATRK_D (SEQ ID N°: 18), e as regiões variáveis da cadeia pesada são selecionadas do grupo consistindo de: BATRH_A (SEQ ID N°: 20), BATRH_B (SEQ ID N°: 21), BATRH_C (SEQ ID N°: 22), BATRH_D (SEQ ID N°: 23) ou BATRH_E (SEQ ID N°: 24); ou

em que as referidas regiões variáveis do anticorpo monoclonal humanizado são selecionadas do grupo consistindo de:

	BATRH _A /BATRK _A
(SEQ ID N°: 20/SEQ ID N°: 15),	BATRH _B /BATRK _A
(SEQ ID N°: 21/SEQ ID N°: 15),	BATRH _B /BATRK _B
(SEQ ID N°: 21/SEQ ID N°: 16),	BATRH _C /BATRK _B
(SEQ ID N°: 22/SEQ ID N°: 16),	BATRH _B /BATRK _D
(SEQ ID N°: 21/SEQ ID N°: 18) ou	BATRH _C /BATRK _D
(SEQ ID N°: 22/SEQ ID N°: 18).	

8. Anticorpo humanizado da reivindicação 6, em que a referida região variável da cadeia leve é BATRK_D (SEQ ID N°: 18) e em que a referida região variável da cadeia pesada é BATRH_C (SEQ ID N°: 22).
9. Anticorpo humanizado da reivindicação 6, em que o anticorpo é um anticorpo de tamanho total.

10. Anticorpo humanizado da Reivindicação 9, em que o anticorpo é do isotipo IgG; de um modo preferido em que a referida subclasse de isotipo é selecionada de IgG₁ ou IgG₄.
11. Fragmento de anticorpo derivado do anticorpo humanizado da reivindicação 6, em que o fragmento de anticorpo é selecionado do grupo consistindo de: Fv, F(ab'), F(ab')₂, um anticorpo de cadeia simples.
12. Anticorpo humanizado da reivindicação 6 produzido por tecnologia de ADN recombinante, utilizando enxerto de CDR.
13. Construção polinucleotídica isolada que codifica qualquer dos anticorpos monoclonais das reivindicações 1-12 ou os seus fragmentos.
14. Construção polinucleotídica isolada de acordo com a reivindicação 13 que codifica uma região variável da cadeia leve kapa selecionada do grupo consistindo de: SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18; de um modo preferido, em que a construção polinucleotídica isolada é selecionada do grupo consistindo de: SEQ ID N°: 87, SEQ ID N°: 88, SEQ ID N°: 89.
15. Construção polinucleotídica isolada de acordo com a reivindicação 13 que codifica uma região variável da cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24; de um modo preferido, em que a construção polinucleotídica isolada é selecionada do grupo consistindo de: SEQ ID N°: 90, SEQ ID N°: 91, SEQ ID N°: 92.

16. Vetor compreendendo qualquer dos polinucleótidos da reivindicação 13 a 15.
17. Vetor da reivindicação 16, compreendendo ainda, pelo menos, uma sequência de polinucleótido que codifica um componente selecionado do grupo consistindo de: um promotor ligado operativamente ao polinucleótido que codifica o anticorpo, um ou mais genes de resistência, uma sequência Kozak, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores de seleção, um elemento intensificador, terminador de transcrição, um péptido de sinal, região constante do kapa humana genômica, região constante de IgG humana genômica.
18. Vetor da reivindicação 17, em que o vetor é um plasmídeo ou um vírus;; de um modo preferido, em que o vetor é selecionado do grupo compreendendo: pKN110, pG1D200, pG1KD210, pUC ou pBR322.
19. Vetor da reivindicação 16, compreendendo a sequência de polinucleótidos da SEQ ID Nº: 93.
20. Célula hospedeira compreendendo o vetor de qualquer das reivindicações 16-19.
21. Célula hospedeira da reivindicação 20, capaz de expressar um anticorpo ou os seus fragmentos; ou em que a célula é selecionada de eucariótica e procariótica; ou seleccionada do grupo consistindo de: células CHO, CHO*dhfr*, NS0, COS ou COS7.
22. Composição farmacêutica compreendendo como um ingrediente ativo um anticorpo ou fragmentos de anticorpo de qualquer

das reivindicações 1-12; de um modo preferido, compreendendo ainda um veículo, diluente ou estabilizador fisiologicamente aceitável.

23. Utilização de um anticorpo ou fragmentos de anticorpo de qualquer das reivindicações 1-12 para a preparação de um medicamento para o tratamento do cancro; de um modo preferido, em que o cancro é selecionado de melanoma, tumores pulmonares, cancro colorretal ou metástases hepáticas.
24. Utilização de um anticorpo monoclonal humanizado ou fragmentos de anticorpo de qualquer das reivindicações 1-12 para a preparação de uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz do referido anticorpo ou fragmentos de anticorpo para induzir atividade proliferativa, citolítica ou estimuladora de células T CD4+.
25. Utilização de um anticorpo monoclonal humanizado ou fragmentos do anticorpo de qualquer das reivindicações 1-12 para a preparação de uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz do referido anticorpo ou fragmentos de anticorpo, para aumentar a sobrevivência de células T CD4+ ativadas.
26. Utilização de acordo com a reivindicação 24 ou 25,

em que a composição farmacêutica é dirigida ao tratamento de uma imunodeficiência adquirida ou genética; ou

em que a composição farmacêutica é dirigida ao tratamento das fases iniciais da infeção com HIV; ou

em que a composição farmacêutica é dirigida ao tratamento da SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida); ou

em que a composição farmacêutica é dirigida ao tratamento de doentes tendo uma contagem sanguínea que mostra uma diminuição em células T CD4+.

27. Método para produzir o anticorpo de qualquer das reivindicações 1-12, compreendendo:

(i) transfetar uma célula hospedeira com um vetor compreendendo uma sequência de polinucleótidos que codifica o referido anticorpo, ou co-transfetar a célula hospedeira com 2 vetores, cada, compreendendo uma sequência de polinucleótidos que codifica as regiões da cadeia pesada ou leve do referido anticorpo;

(ii) cultivar a célula hospedeira de (i) de modo que o referido anticorpo seja expresso; e

(iii) recuperar o anticorpo a partir do hospedeiro.

Lisboa, 7 de outubro de 2015

ATGGATTACAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCC
 1 - - - -+ - - - -+- - - - -+ - - - -+ - - - - 60
 TACCTAAATGTCCACGTCTAATAGTCGAAGGACGATTAGTCACGGAGTCAGTATTACAGG
 M D L Q V Q I I S F L L I S A S V I M S

AGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAG
 61 - - - + - - - -+- - - - -+- - - - -+ - - - - 120
 TCTCCTGTTTAACAAGAGTGGGTCAGAGGTCGTTAGTACAGACGTAGAGGTCCCCTCTTC
 R G Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K

GTCACCATAACCTGCAGTGCCAGGTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAG
 121 - - - -+ - - - -+- - - - -+- - - - -+- - - - - 180
 CAGTGGTATTGGACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAATGTACGTGACCAAGGTCGTCTTC
 V T I T C S A R S S V S Y M H W F Q Q K

CCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAGGACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT
 181 - - - -+ - - - -+- - - - -+- - - - -+- - - - - 240
 GGTCCGTGAAGAGGGTTTGAGACCTAAATATCCTGTAGGTTGGACCGAAGACCTCAGGGA
 P G T S P K L W I Y R T S N L A S G V P

GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTGTCTCACAATCAGCCGAATGGAG
 241 - - - -+ - - - -+- - - - -+- - - - -+- - - - - 300
 CGAGCGAAGTCACCGTCACCTAGACCCTGGAGAATGACAGAGTGTTAGTCGGCTTACCTC
 A R F S G S G S G T S Y C L T I S R M E

GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTTCCCACTCACGTTTCGGC
 301 - - - -+ - - - -+- - - - -+- - - - -+- - - - - 360
 CGACTTCTACGACGGTGAATAATGACGGTCGTTTCCTCATCAAAGGGTGAGTGCAAGCCG
 A E D A A T Y Y C Q Q R S S F P L T F G

TCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA
 361 - - - -+ - - - -+- - 384
 AGCCCCTGTTTCAACCTTTATTTT
 S G T K L E I K

FIGURA 1

Classes Canônicas de Chothia

- L1 (10 aminoácidos) = Classe 1 *
Resíduos Chave: **2(I)**; 25(**A**); 29(**VIL**);
33(**LM**); 71(**YF**)
- L2 (7 aminoácidos) = Classe 1
Resíduos Chave: **48(IV)**; 51(**AT**); 52(**ST**);
64(G)
- L3 (9 aminoácidos) = Classe 1
Resíduos Chave: 90(**QNH**); 95 (**P**)

Classes Canônicas de Martin

- L1 (10 aminoácidos) = Classe indefinida (embora muito semelhante à Classe 1/10A*)
Resíduos Chave: **2(I)**; **4(L)**; **23(C)**; 25(**A**);
30(**V**); 33(**LM**); **35(W)**; 71(**Y**);
88(C); 90(**Q**); 93(**SYR**)
- L2 (7 aminoácidos) = Class 1/7A
Resíduos Chave: **23(C)**
- L3 (9 aminoácidos) = Classe indefinida (embora muito semelhante à Classe 1/9A)
Resíduos Chave: **2(ILV)**; **3(VQLE)**; **4(ML)**;
28(**SNDTE**) ✕;
30(DLYVISNFHGT);
31(SNTKG); 32(FYNAHSR);
33(**MLVIF**); **88(C)**;
89(**QSGFL**); 90(**QNH**);
91(NFGSRDHTYV);
92(NYWTSRQHAD);
93(ENGHTSRAQHAD);
94(DYTVLHNIWPS) ✧;
95(**P**);
96(**PLYRIWF**); 97(**I**); 98(**F**)

* Esta classe é vista apenas no subgrupo VI de kapa de murganho de Kabat.

✕ Uma vez que a ansa L1 tem apenas 10 aminoácidos de comprimento, não existe resíduo nesta posição na região BAT V_K.

✧ O aminoácido Phe (F) é encontrado nesta posição na região BAT V_K.

FIGURA 2

```

ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCCAAAGTATCCAAGCACAG
1  - - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+ - - - 60
TACCGAACCCACACCTGGAACGATAAGGACTACCGTCGACGGGTTTCATAGGTTTCGTGTC
M A W V W T L L F L M A A A Q S I Q A Q

ATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGTTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCC
61 - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+- - - -120
TAGGTCAACCACGTCAGACCTGGACTCAACTTCTTCGGACCTCTCTGTCAGTTCTAGAGG
I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S

TGCAAGGCTTCTGGATATACTTTACAAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCA
121 - - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+- - - -180
ACGTTCCGAAGACCTATATGAAAGTGTTTGATACCTTACTTGACCCACTTCGTCCGAGGT
C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P

GGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCGACAGTGGAGAGTCAACATATGCT
181- - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+- - - -240
CCTTTCCCAAATTTACCTACCCGACCTATTTGTGGCTGTACCTCTCAGTTGTATACGA
G K G L K W M G W I N T D S G E S T Y A

GAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAACACTGCCTATTTG
241- - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+- - - -300
CTTCTCAAGTTCCCTGCCAAACGGAAGAGAAACCTTTGGAGACGGTTGTGACGGATAAAC
E E F K G R F A F S L E T S A N T A Y L

CAGATCAACAACCTCAACAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGTGAGAGTCGGCTAC
301 - - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+- - - -360
GTCTAGTTGTTGGAGTTGTTACTCCTGTGCCGATGTATAAAGACACACTCTCAGCCGATG
Q I N N L N N E D T A T Y F C V R V G Y

GATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
361- - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+- - - -408
CTACGAAACCTGATGACCCCAGTTCCTTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGT
D A L D Y W G Q G T S V T V S S

```

FIGURA 3

Classes Canônicas de Chothia

H1 (10 aminoácidos*) = Classe 1

Resíduos Chave: 24(TAVGS); 26(G);
27(FYTG); 29(FLIV);
34(MIVLT); 94(RTKHGL)

H2 (17 aminoácidos) = Classe 2

Resíduos Chave: 52a(PTA); 55(GS); 71(ALT)**Classes Canônicas de Martin**

H1 (10 aminoácidos*) = Classe 1/10A

Resíduos Chave: 2(VIG); 4(LV); 20(LIMV);
22(C); 24(TAVGS); 26(G);
29(IFLS); 32(IHYFTNCED);
33(YAWGTLV); 34(IVMW);
35(HENQSYT); 36(W);
48(IMLV); 51(LIVTSN);
69(ILFMV); 78(ALVYF);
80(LM); 90(YF); 92(C);
94(RKGSHN); 102(YHVISDG)H2 (10 aminoácidos*) = Classe indefinida (embora muito semelhante
à Classe 2/10A)Resíduos Chave: 33(YWGATL); 47(WY);
50(REWYGQVLNKA); 51(LI);
52(DLNSY); 53(AGYSKTN) $\diamond$;
54(NSTKDG); 56(YREDGVSA);
58(KNTSDRGFY); 59(Y);
69(IFLM); 71(VAL); 78(ALV)

* A ansa H1 consiste na realidade de 5 aminoácidos de CDR1 e 5 aminoácidos da extremidade do terminal N de FR1.

* *AbM* define a ansa H2 como apenas 10 aminoácidos de comprimento, i.e., 7 aminoácidos mais curta do que a definição de Kabat para CDR2 $\diamond$ O aminoácido Asp (D) é encontrado nesta posição na região BAT V_H.**FIGURA 4**

CDR	Números Kabat	=====L1=====	==L2==	===L3===
		1 2 3 4 5 6 7		
BATV _k de murganho		12345678901234567890123456789012345678901234567890		
TEL9V _k humano		QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSARSSVSymHWFQKPGTSPKLWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSY		
Variante SEQ ID Nº		E.....SSL...V.DR.....R.SQSI SN.LN.Y.....KA...L..AA.T.Q....S.....D		
BATRK _A	15	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCSARS-SVSYMHWFQKPGKAPKLLIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTD		
BATRK _B	16	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCSARS-SVSYMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTD		
BATRK _C	17	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCSARS-SVSYMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTD		
BATRK _D	18	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCSARS-SVSYMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTD		

CDR	Números Kabat	8 9 10
		123456789012345678901234567
BATV _k de murganho		CLTISRMEADAATYYCQQRSSFPLTFGGGKLEIK
TEL9V _k humano		FT...NSLQP..F.....TN.....G.....
Variante SEQ ID Nº		
BATRK _A	15	FTLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGKLEIK
BATRK _B	16	YTLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGKLEIK
BATRK _C	17	YCLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGKLEIK
BATRK _D	18	YCLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGKLEIK

FIGURA 5

CDR	Números Kabat	-----H1=			=====H2=====			=====H3=====	
		1	2	3	4	5	6	7	
		1234567890123456789012345678901234567890123456789012ABC							
BATV_H murganho	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTDSGESTYAEEFKGRFAFSLETSA								
hsighv 1295 V_H	.V.....S.....AS.....S.SSHAI...R....Q..Q.....NT.SP...QG.T...V...D...VS								
Variante SEQ ID Nº									
BATRH _A	20	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYSFSNYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEEFKGRFVFSLDTSVS							
BATRH _B	21	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGY TFT NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEEFKGRFVFSLDTSVS							
BATRH _C	22	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGY TFT NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEEFKGRFVFSLDTSV N							
BATRH _D	23	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGY TFT NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEEFKGRFVFSLDTSV N							
BATRH _E	24	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFT NYGMNWVKQAPGQGL KWM GWINTDSGESTYAEEFKGR FA FSLDTSV N							
CDR	Números Kabat	H3=====							
		8	9	10	11				
		789012ABC345678901234567890ABC1234567890123							
BATV_H murganho	TAYLQINNLNNDTATYFCVRVGVDAL---	DYWGQGT	SVTVSS						
hsighv 1295 V_H	TS.TA...GM...AKESHSSA	LDL.....L.....							
Variante SEQ ID Nº									
BATRH _A	20	TAYLQITSLTAEDTGMFYCAKVGVDAL---	DYWGQGT	TLTVSS					
BATRH _B	21	TAYLQITSLTAEDTGMFYCAKVGVDAL---	DYWGQGT	TLTVSS					
BATRH _C	22	TAYLQITSLTAEDTGMFYC VR VGVDAL---	DYWGQGT	TLTVSS					
BATRH _D	23	TAYLQITSLTAEDTGMFYC VR VGVDAL---	DYWGQGT	TLTVSS					
BATRH _E	24	TAYLQITSLNAEDTGMFYC VR VGVDAL---	DYWGQGT	TLTVSS					

FIGURA 6

```

      AAGCTTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      TTCGAACGGCGGTGGTACCTGTACTCCCAGGGGCGAGTCGAGGACCCCGAGGACGACGAG

              M D M R V P A Q L L G L L L L

      TGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      ACCGAGGGTCCACGGTTTACACTTTAACACAACCTGCGTCAGAGGTAGGAGGGACAGACGT

              W L P G A K C E I V L T Q S P S S L S A

      TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCCAGGTCAAGTGTAAGTTACATGCAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      AGACATCCTCTGTCTCAGTGGTAGTGAACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAATGTACGTG

              S V G D R V T I T C S A R S S V S Y M H

      TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAGGACATCCAACCTG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      ACCATAGTCGTCTTTGGTCCCTTTTCGGGGATTTCGAGGACTAGATATCCTGTAGGTTGGAC

              W Y Q Q K P G K A P K L L I Y R T S N L

      GCTTCTGGGGTCCCATCTAGATTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
      CGAAGACCCCGGGTAGATCTAAGTCGCGCTCACCTAGACCCTGTCTAAAGTGAGAGTGG

              A S G V P S R F S G S G S G T D F T L T

      ATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGCCAGCAAAGGAGTAGTTTC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
      TAGTTGTCCGACGTCGGACTTCTAAAACGTTGAATGATAACGGTCGTTTCCTCATCAAAG

              I N S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R S S F

      CCACTCACGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTGGATCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 412
      GGTGAGTGCAAGCCGCCTCCCTGGTTCGACCTCTAGTTTGCACTCACCTAGG

              P L T F G G G T K L E I K

```

FIGURA 7

```

1  AAGCTTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
60  TTCGAACGGCGGTGGTACCTGTACTCCCAGGGGCGAGTCGAGGACCCCGAGGACGACGAG
      M D M R V P A Q L L G L L L L

61  TGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
120  ACCGAGGGTCCACGGTTTACACTTTAACACAACCTGCGTCAGAGGTAGGAGGGACAGACGT
      W L P G A K C E I V L T O S P S S L S A

121  TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCCAGGTCAAGTGTAAGTTACATGCAC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
180  AGACATCCTCTGTCTCAGTGGTAGTGAACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAATGTACGTG
      S V G D R V T I T C S A R S S V S Y M H

181  TGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCTGGATCTATAGGACATCCAACCTG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
240  ACCAAGGTCGTCTTTGGTCCCTTTTCGGGGATTTCGAGACCTAGATATCCTGTAGGTTGGAC
      W F Q Q K P G K A P K L W I Y R T S N L

241  GCTTCTGGGGTCCCATCTAGATTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
300  CGAAGACCCAGGGTAGATCTAAGTCGCCGTACCTAGACCCTGTCTAATGTGAGAGTGG
      A S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T

301  ATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGCCAGCAAAGGAGTAGTTTC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
360  TAGTTGTCGGACGTCGGACTTCTAAAACGTTGAATGATAACGGTCGTTTCCTCATCAAAG
      I N S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R S S F

361  CCACTCACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTGGATCC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
412  GGTGAGTGCAAGCCGCCTCCCTGGTTTCGACCTCTAGTTTGCACTCACCTAGG
      P L T F G G G T K L E I K

```

FIGURA 8

```

AAGCTTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TTCGAACGGCGGTGGTACCTGTACTCCCAGGGGCGAGTCGAGGACCCCGAGGACGACGAG

      M D M R V P A Q L L G L L L L

TGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ACCGAGGGTCCACGGTTTACACTTTAACACAACTGCGTCAGAGGTAGGAGGGACAGACGT

      W L P G A K C E I V L T Q S P S S L S A

TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCCAGGTCAAGTGTAAGTTACATGCAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGACATCCTCTGTCTCAGTGGTAGTGAACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAATGTACGTG

      S V G D R V T I T C S A R S S V S Y M H

TGGTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCTGGATCTATAGGACATCCAACCTG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
ACCAAGGTCGTCTTTGGTCCCTTTCGGGGATTGAGACCTAGATATCCTGTAGGTTGGAC

      W F Q Q K P G K A P K L W I Y R T S N L

GCTTCTGGGGTCCCATCTAGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACATCTTACTGTCTCACC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CGAAGACCCCAGGGTAGATCTAAGTCGCCGTCACCTAGACCCTGTAGAATGACAGAGTGG

      A S G V P S R F S G S G S G T S Y C L T

ATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGCCAGCAAAGGAGTAGTTTC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TAGTTGTCGGACGTCGGACTTCTAAAACGTTGAATGATAACGGTCGTTTCCTCATCAAAG

      I N S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R S S F

CCTCTACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTGGATCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 412
GGTGAGTGCAAGCGCCTCCCTGGTTCGACCTCTAGTTTGCACTCACCTAGG

      P L T F G G G T K L E I K

```

FIGURA 9

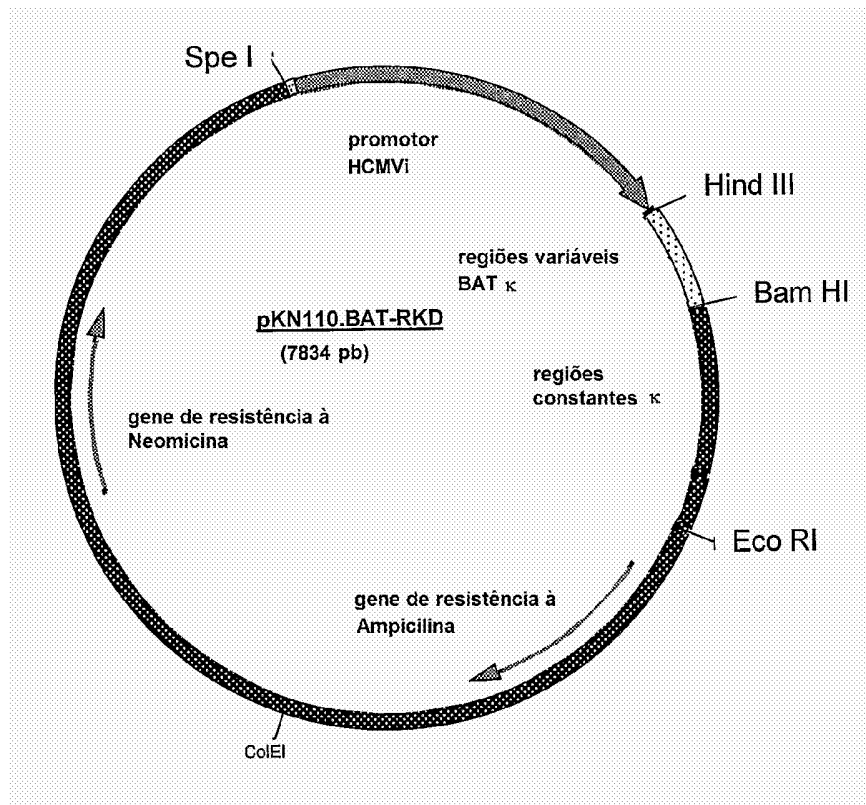


FIGURA 10

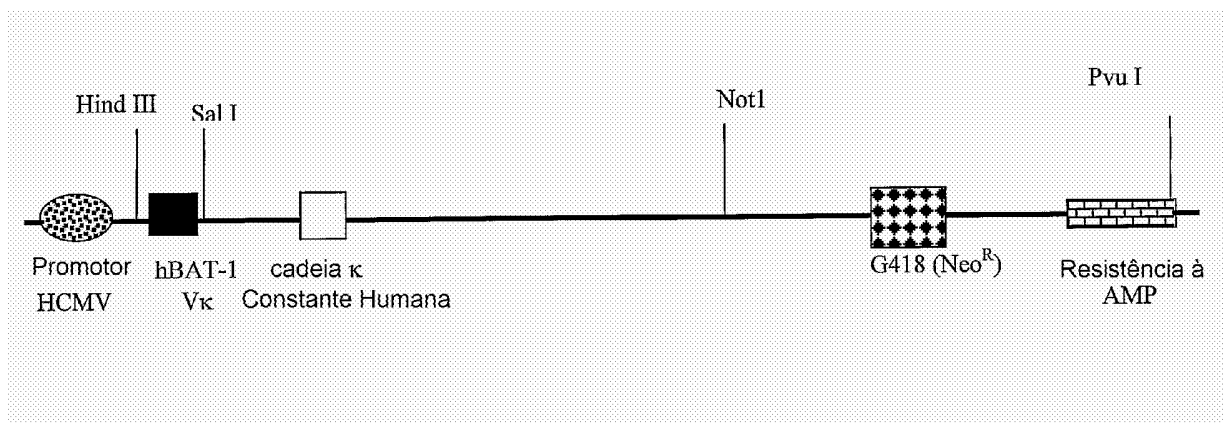


FIGURA 11

```

AAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCAACA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TTCGAACGGCGGTGGTACCTGACCTGGACCTCCTAGGAGAAGAACCACCGTCGTCGTTGT

      M D W T W R I L F L V A A A T

GGTGCCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGCTTAAGAAGCCTGGGGCC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CCACGGGTGAGGGTCCACGTCGACCACGTTAGACCCAGACTCGAATTCTTCGGACCCCGG

      G A H S Q V Q L V Q S G S E L K K P G A

TCAGTGAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATCTTTCTCAAACTATGGAATGAACTGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGTCACTTCTAGAGGACGTTCCGAAGACCTATATGAAAGTGTTTGATACCTTACTTGACC

      S V K I S C K A S G Y |S| F |S| N Y G M N W

GTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTCAGTGGATGGGATGGATAAACACCGACAGTGA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CACGCTGTCCGGGGACCTGTTCCCGAAGTCACCTACCTACCTATTTGTGGCTGTCACCT

      V R Q A P G Q G L Q W M G W I N T D S G

GAGTCAACATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CTCAGTTGTATACGACTTCTCAAGTTCCTGCCAAACAGAAGAGGAACCTGTGGAGACAG

      E S T Y A E E F K G R F V F S L D T S V

AACACGGCATATCTGCAGATCACCGCCTCACGGCTGAGGACACTGGCATGTATTTCTGT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TTGTGCCGTATAGACGTCTAGTGGTGGGAGTGCCGACTCCTGTGACCGTACATAAAGACA

      |S| T A Y L Q I T S L T A E D T G M Y F C

GCGAAGAGTCGGCTACGATGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CACTCTCAGCCGATGCTACGAAACCTGATGACCCCGGTCCTTGGGACCACTGGCAGAGG

      A K V G Y D A L D Y W G Q G T L V T V S

TCAGGTGAGTGGATCC
421 -----+----- 436
AGTCCACTCACCTAGG

S

```

FIGURA 12

```

1  AAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCAACA 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCGAACGGCGGTGGTACCTGACCTGGACCTCCTAGGAGAAGAACCACCGTCGTCGTTGT
       M D W T W R I L F L V A A A T

61  GGTGCCCACCTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGCTTAAGAAGCCTGGGGCC 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CCACGGGTGAGGGTCCACGTCGACCACGTTAGACCCAGACTCGAATTCTTCGGACCCCGG
       G A H S Q V Q L V Q S G S E L K K P G A

121 TCAGTGAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACTTTCACAACTATGGAATGAACTGG 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AGTCACTTCTAGAGGACGTTCCGAAGACCTATATGAAAGTGTGTTGATACCTTACTTGACC
       S V K I S C K A S G Y T F T N Y G M N W

181 GTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTCAGTGGATGGGATGGATAAACACCGACAGTGGA 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CACGCTGTCCGGGGACCTGTTCCCGAAGTCACCTACCTACCTATTTGTGGCTGTACCT
       V R Q A P G Q G L Q W M G W I N T D S G

241 GAGTCAACATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTCAGTTGTATACGACTTCTCAAGTTCCTGCCAACAGAAGAGGAACCTGTGGAGACAG
       E S T Y A E E F K G R F V F S L D T S V

301 AGCACGGCATATCTGCAGATCACCGCCTCACGGCTGAGGACACTGGCATGTATTTCTGT 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TCGTGCCGTATAGACGTCTAGTGGTCGGAGTGCCGACTCCTGTGACCGTACATAAAGACA
       S T A Y L Q I T S L T A E D T G M Y F C

361 GTGAGAGTCGGCTACGATGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CGCTTTCAGCCGATGCTACGAAACCTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAGAGG
       V R V G Y D A L D Y W G Q G T L V T V S

421 TCAGGTGAGTGGATCC 436
   -----+-----
   AGTCCACTCACCTAGG
       S

```

FIGURA 13

```

AAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCAACA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TTCGAACGGCGGTGGTACCTGACCTGGACCTCCTAGGAGAAGAACCACCGTCGTCGTTGT

      M D W T W R I L F L V A A A T

GGTGCCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGTCTGAGCTTAAGAAGCCTGGGGCC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CCACGGGTGAGGGTCCACGTCGACCACGTTAGACCCAGACTCGAATTCTTCGGACCCCGG

      G A H S Q V Q L V Q S G S E L K K P G A

TCAGTGAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACTTTACAAACTATGGAATGAACTGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGTCACTTCTAGAGGACGTTCCGAAGACCTATATGAAAGTGTTTGATACCTTACTTGACC

      S V K I S C K A S G Y T F T N Y G M N W

GTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTCAGTGGATGGGATGGATAAACACCGACAGTGG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CACGCTGTCCGGGGACCTGTTCCCGAAGTCACCTACCCTACCTATTTGTGGCTGTCACCT

      V R Q A P G Q G L Q W M G W I N T D S G

GAGTCAACATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CTCAGTTGTATACGACTTCTCAAGTTCCCTGCCAAACAGAAGAGGAACCTGTGGAGACAG

      E S T Y A E E F K G R F V F S L D T S V

AACACGGCATATCTGCAGATCACCAGCCTCACGGCTGAGGACACTGGCATGTATTCTGT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TTGTGCCGTATAGACGTCTAGTGGTCGGAGTGCCGACTCCTGTGACCGTACATAAAGACA

      N T A Y L Q I T S L T A E D T G M Y F C

GCGAAGTTCGGCTACGATGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CACTCTCAGCCGATGCTACGAAACCTGATGACCCCGTCCCTTGGGACCACTGGCAGAGG

      A K V G Y D A L D Y W G Q G T L V T V S

TCAGGTGAGTGGATCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 436
AGTCCACTCACCTAGG

S

```

FIGURA 14

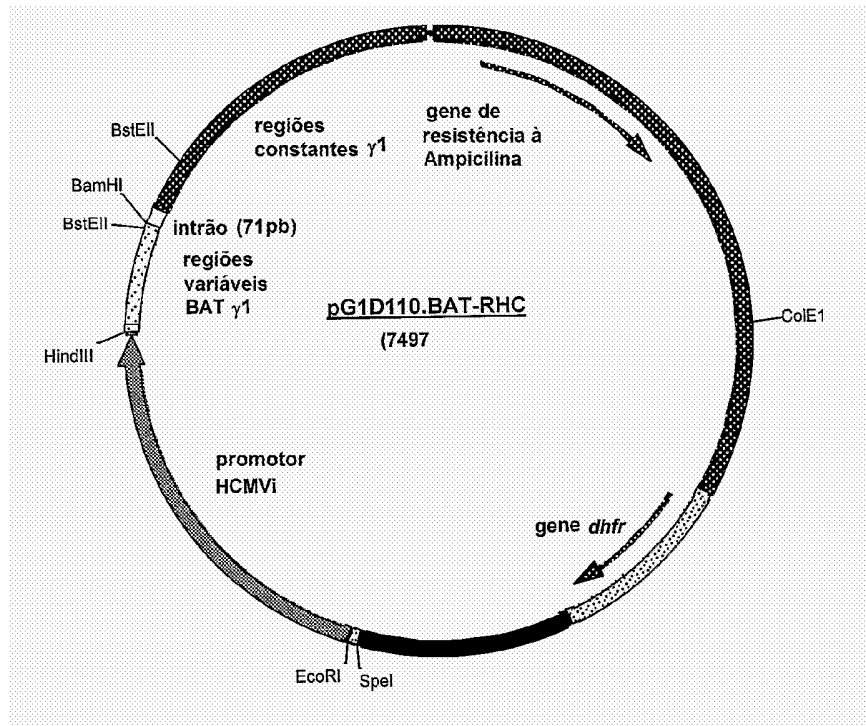


FIGURA 15

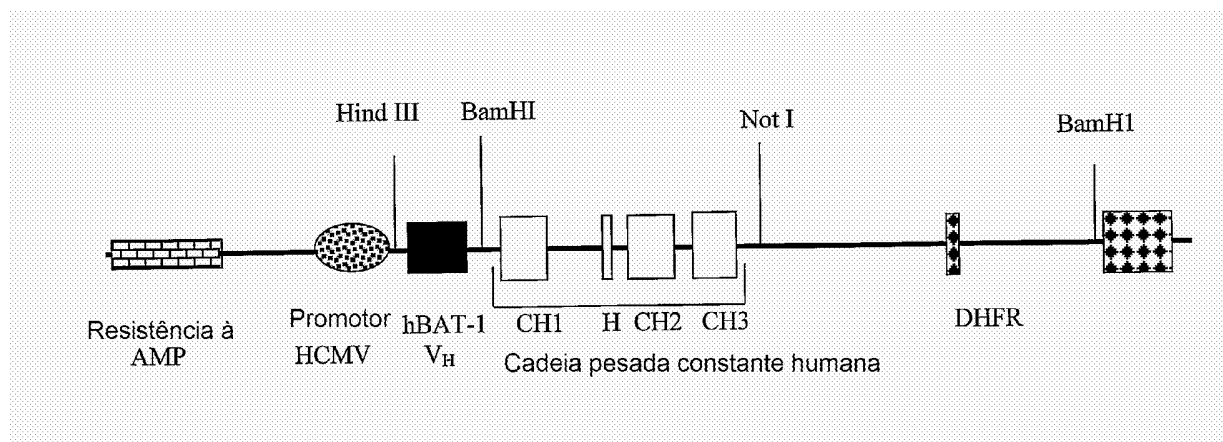


FIGURA 16

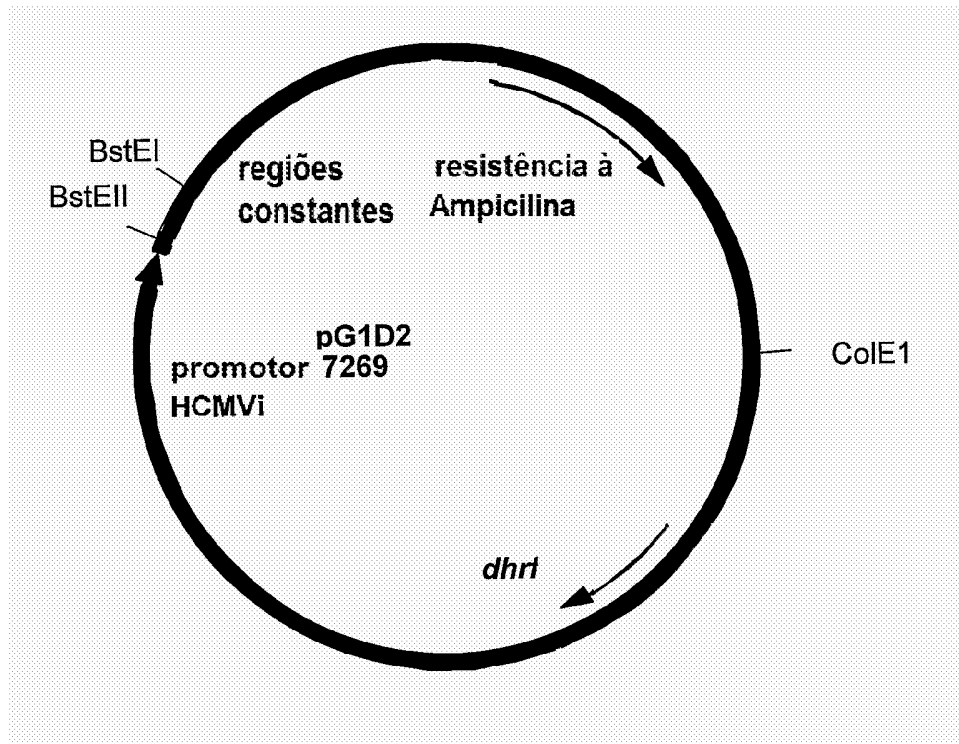


FIGURA 17

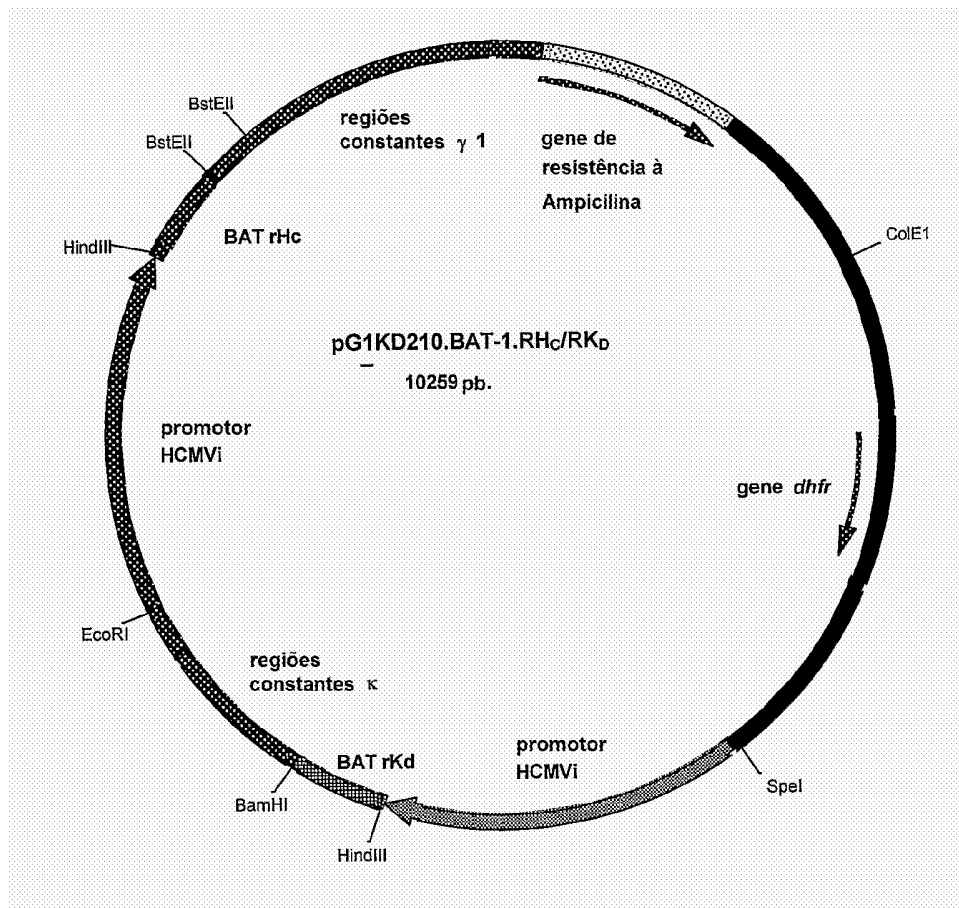


FIGURA 18

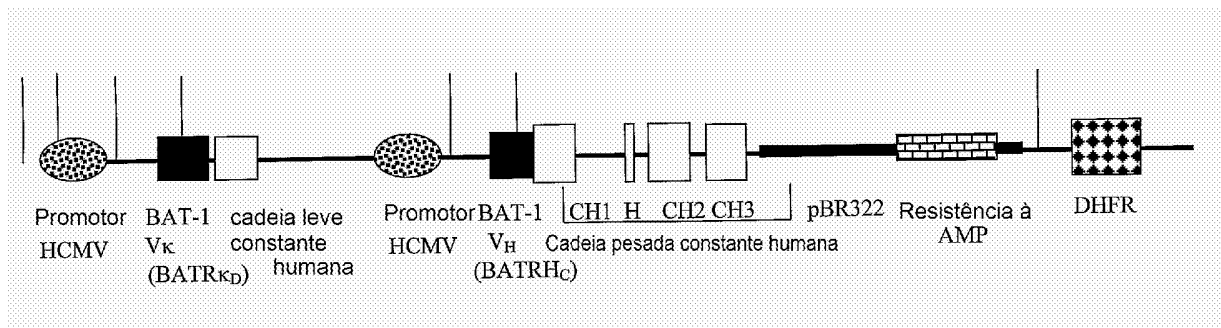


FIGURA 19

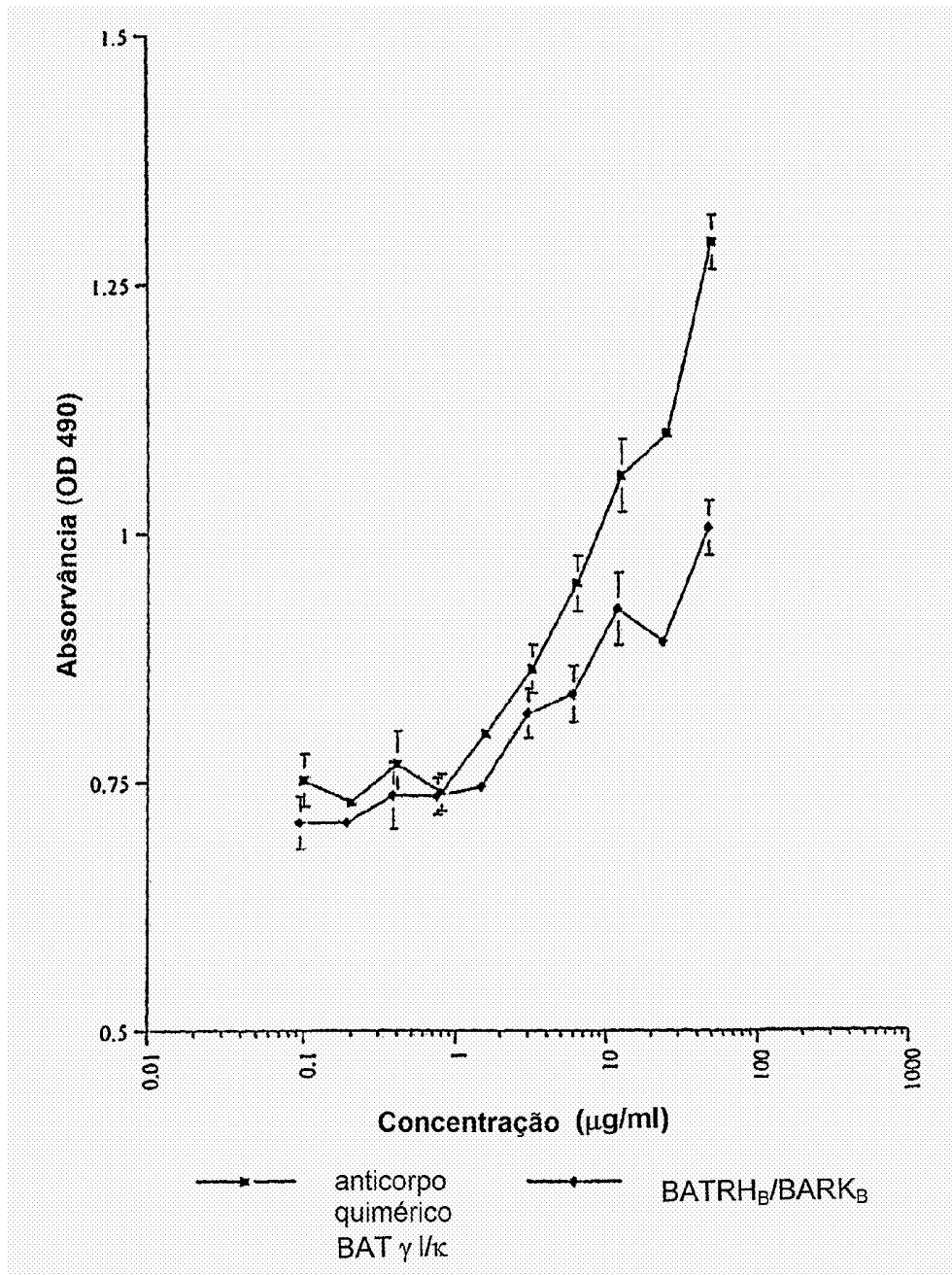


FIGURA 20

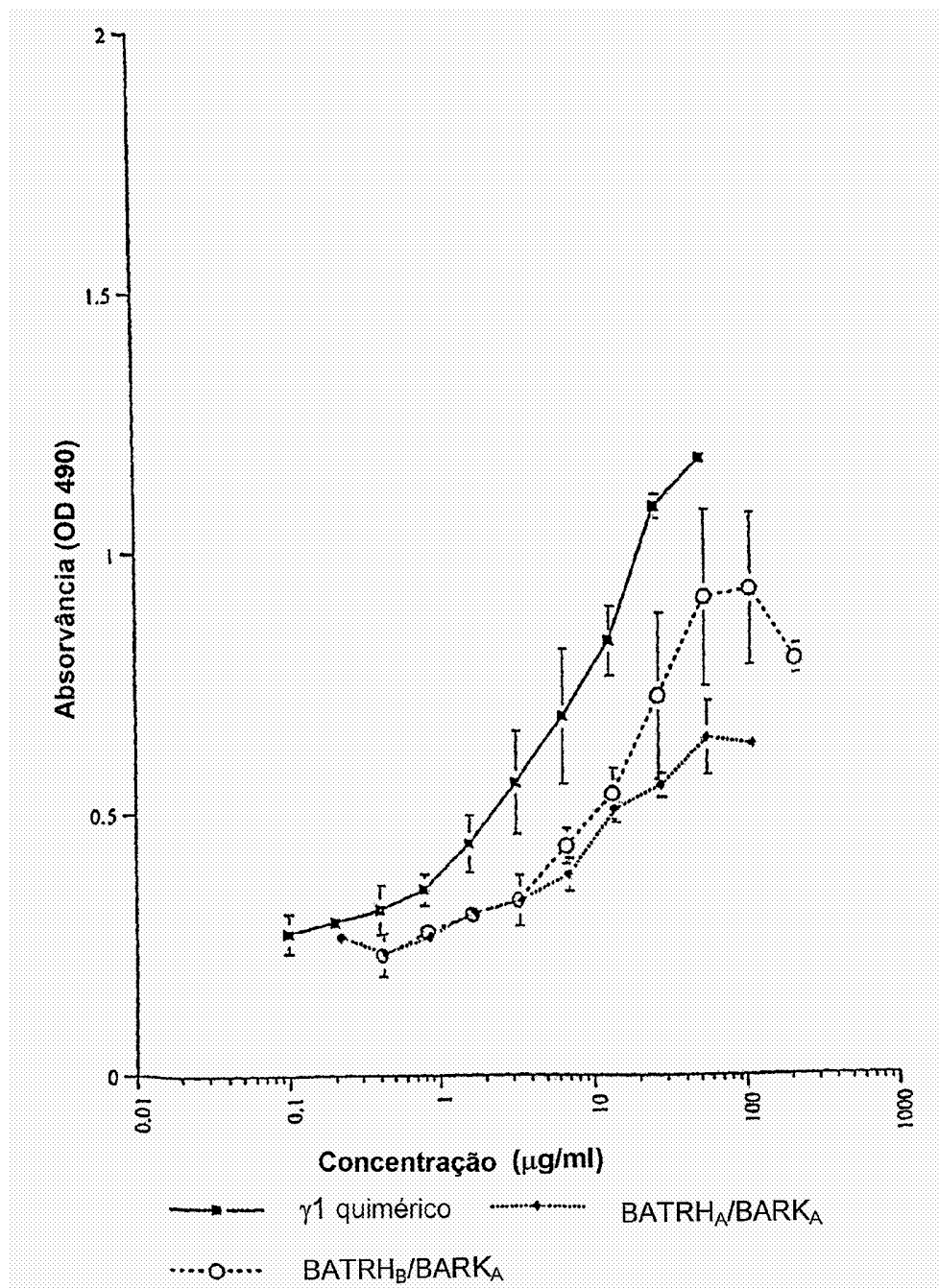


FIGURA 21

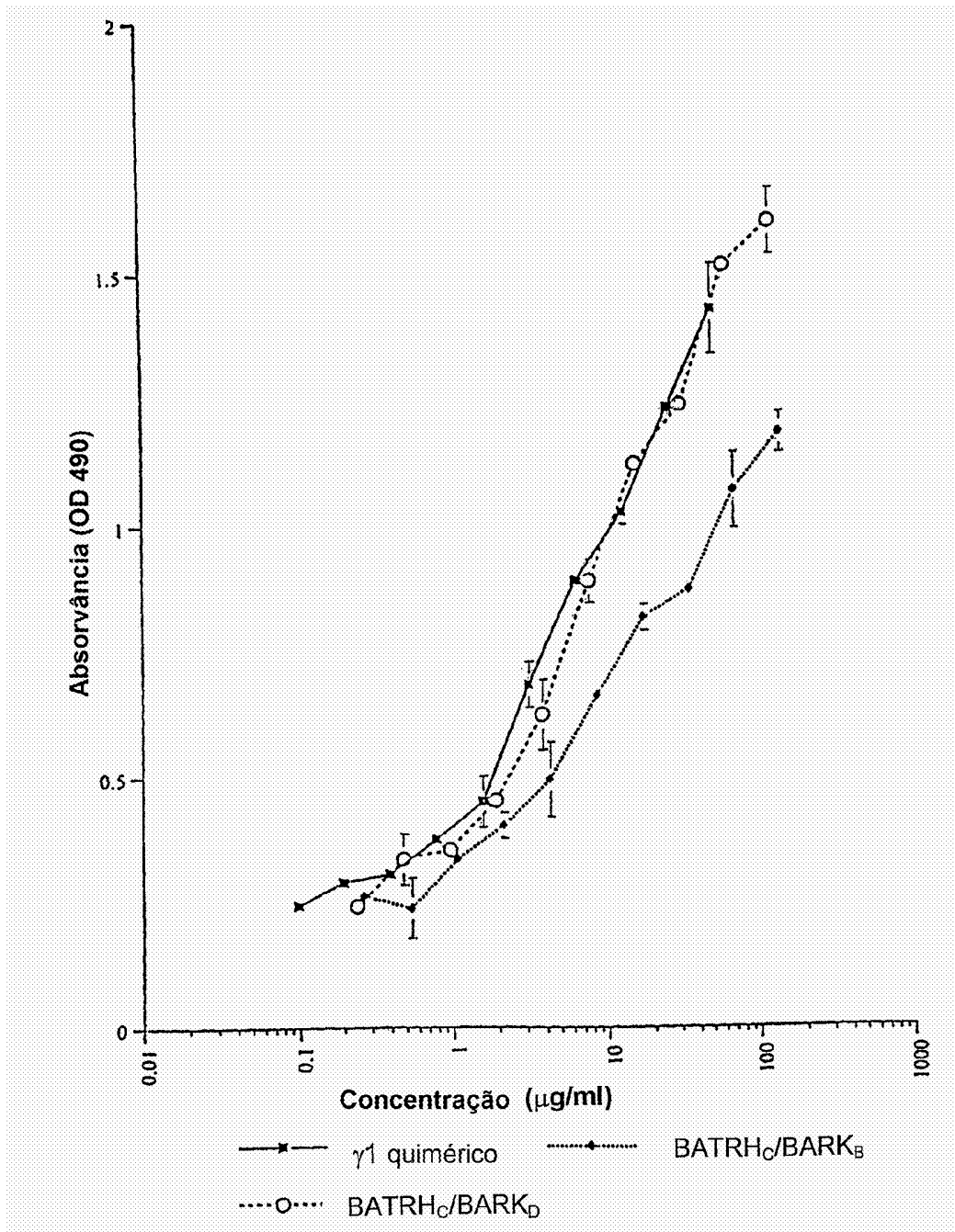


FIGURA 22

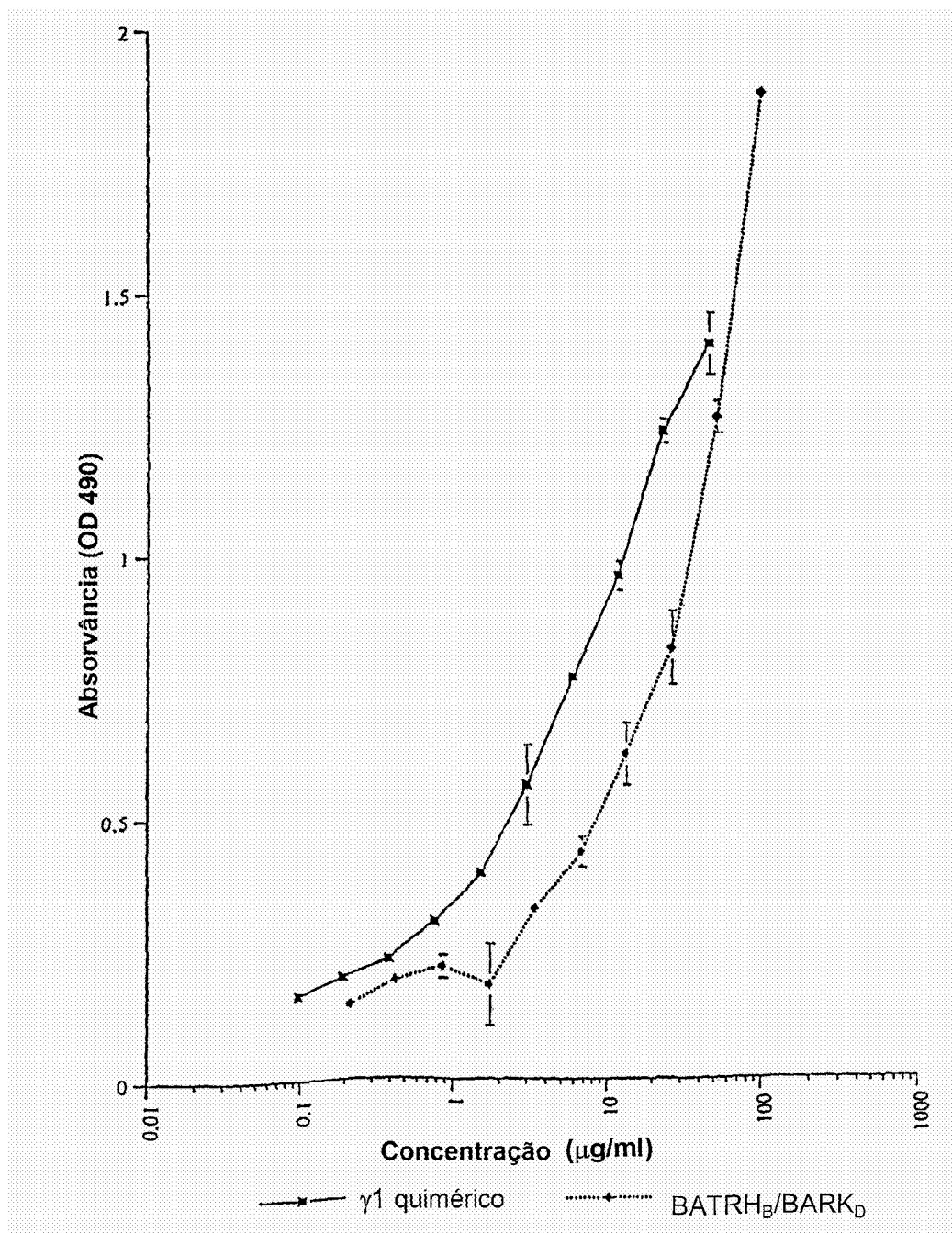


FIGURA 23

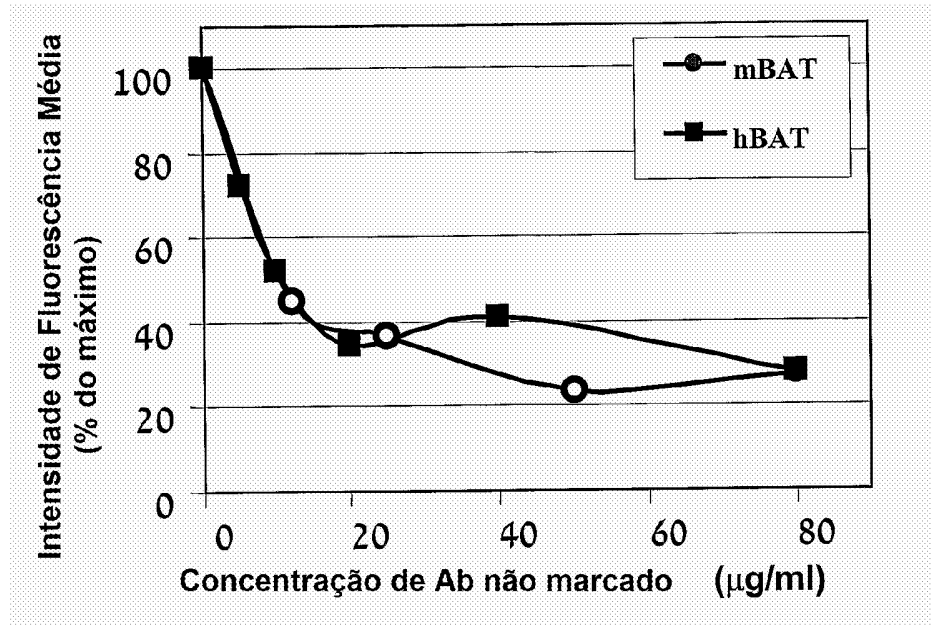


FIGURA 24

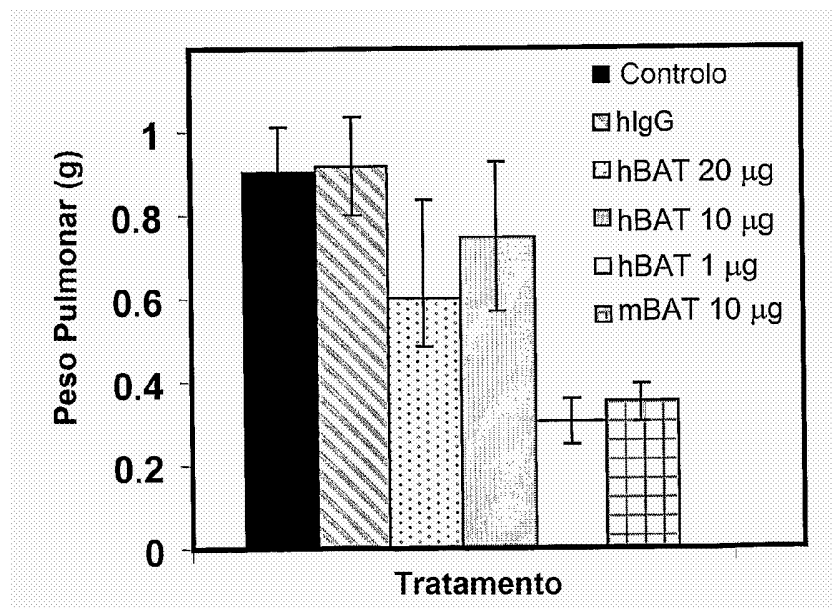


FIGURA 25

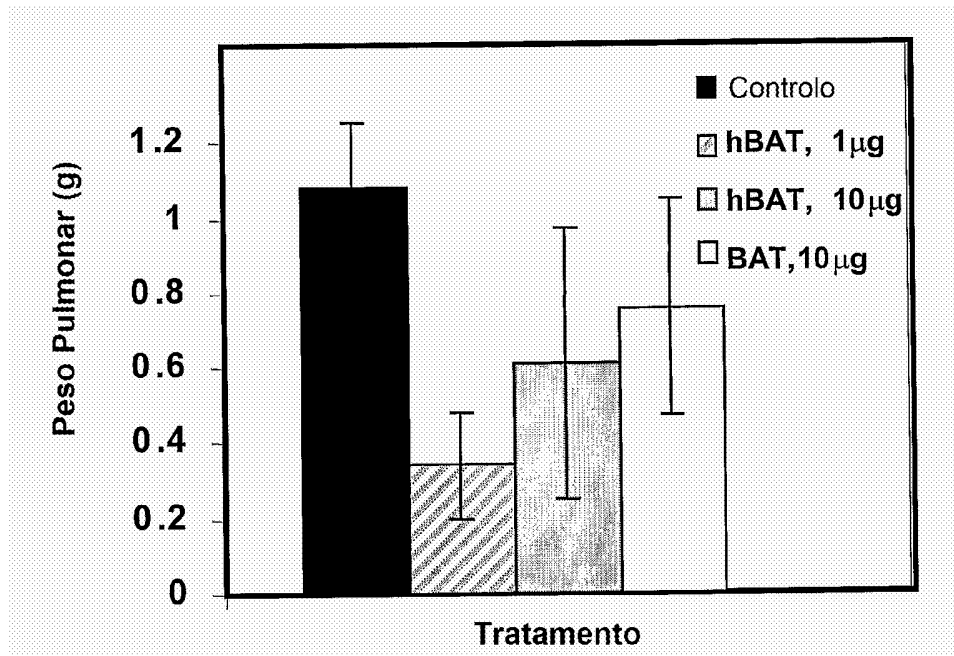


FIGURA 26

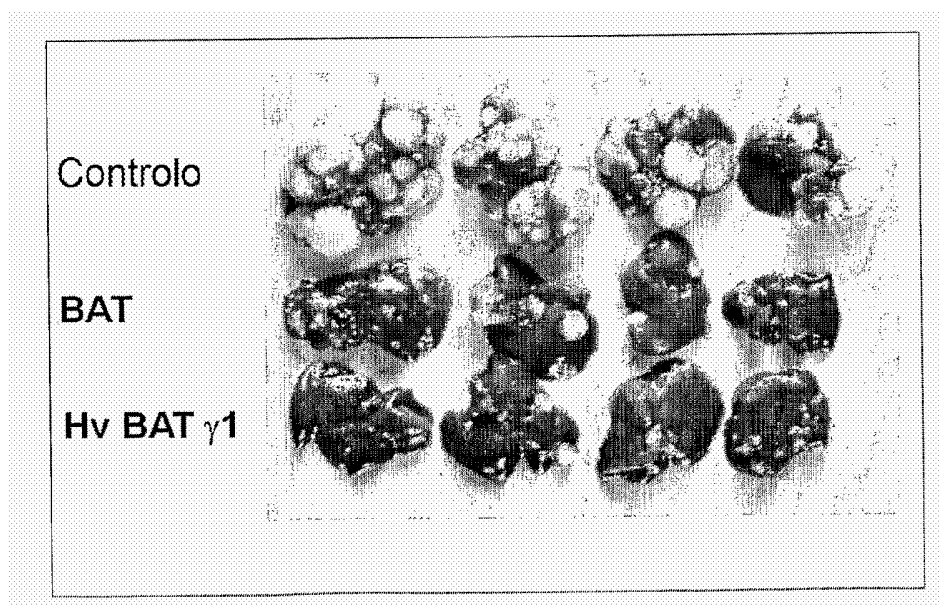


FIGURA 27

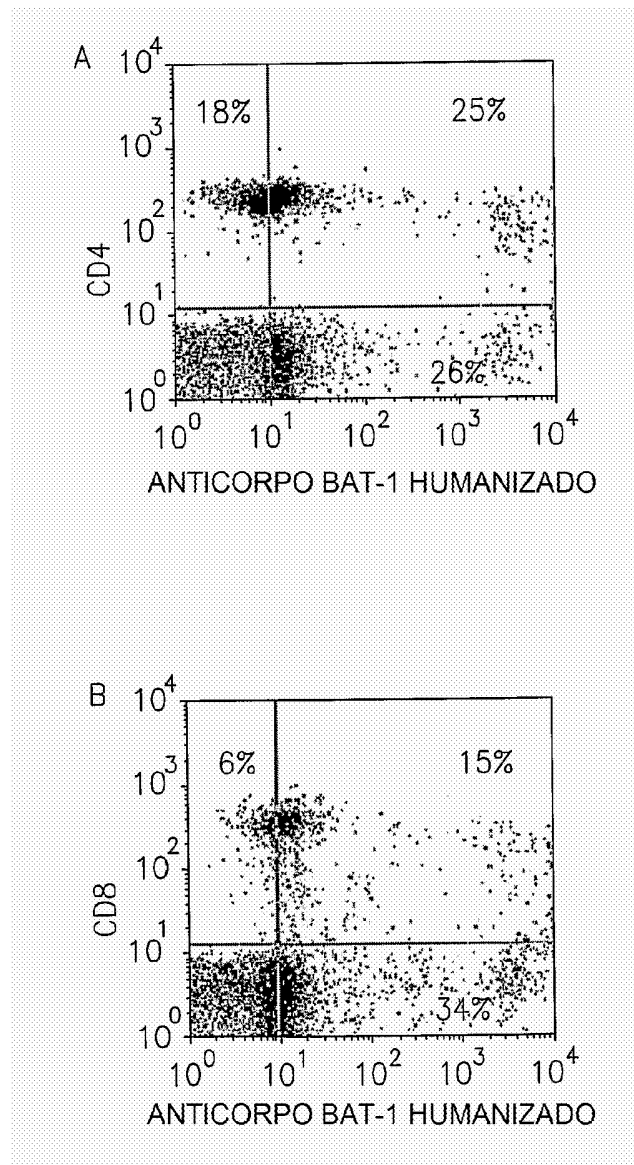
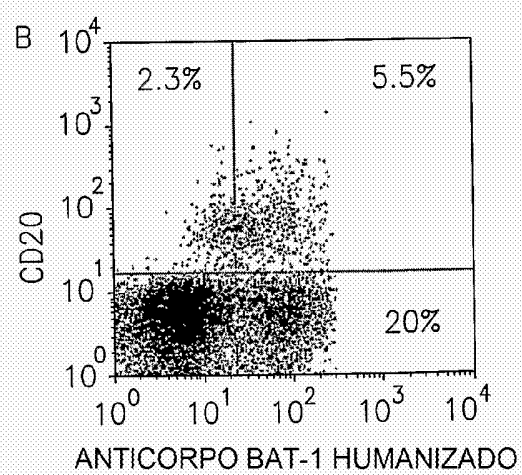
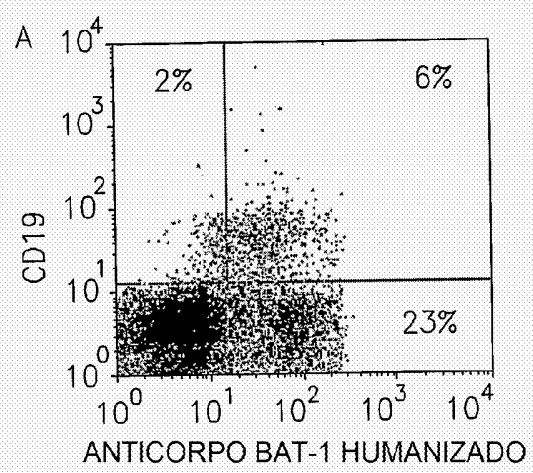
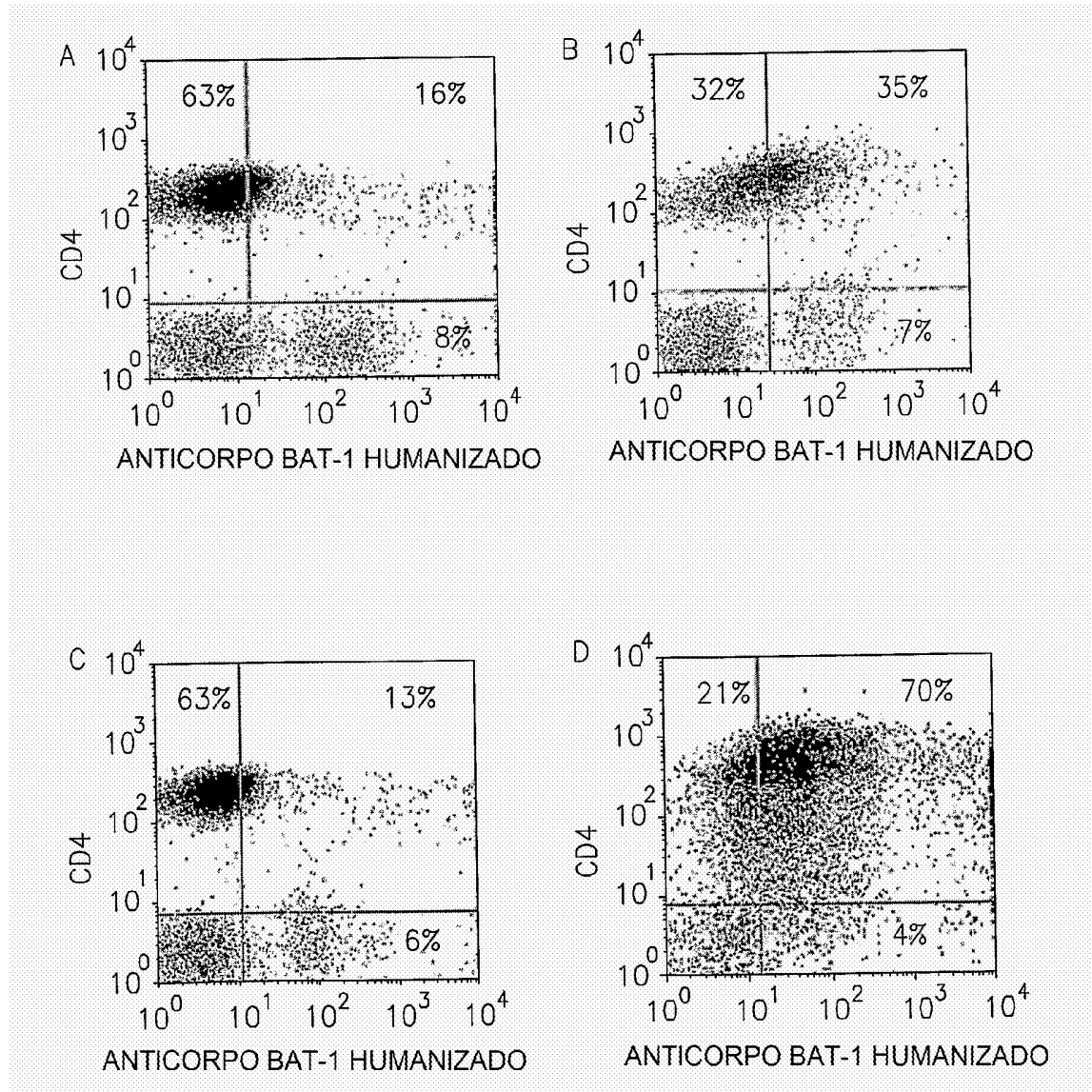
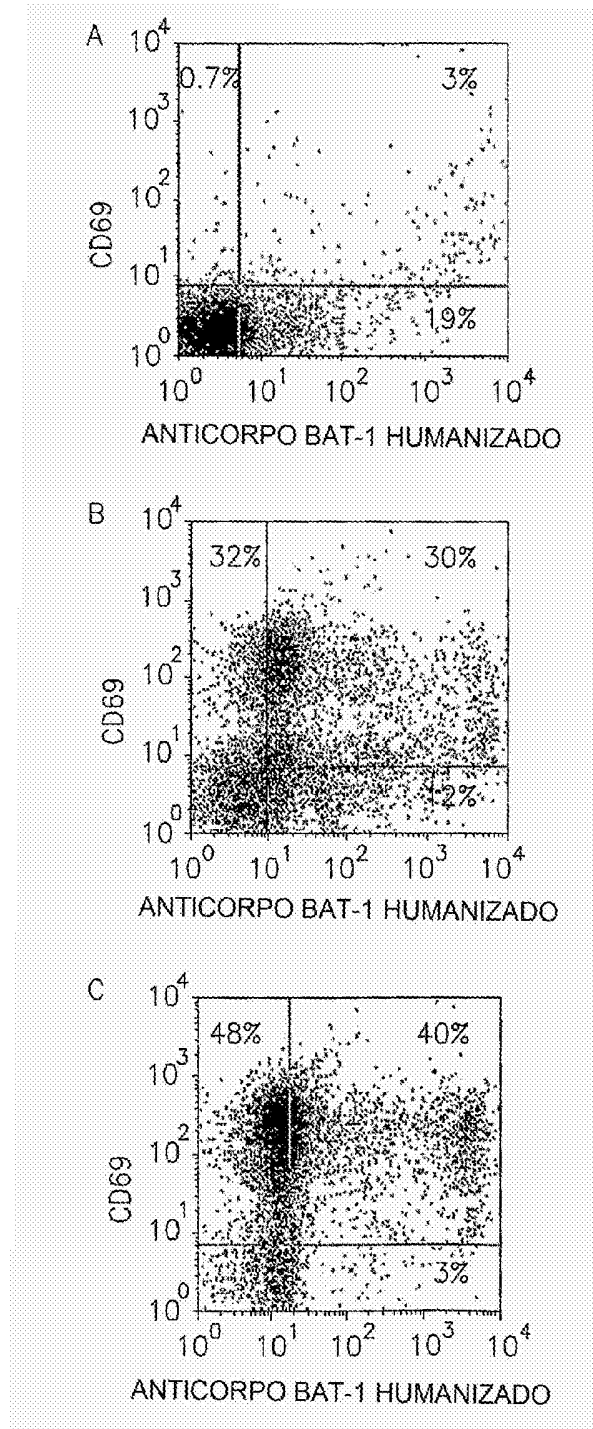
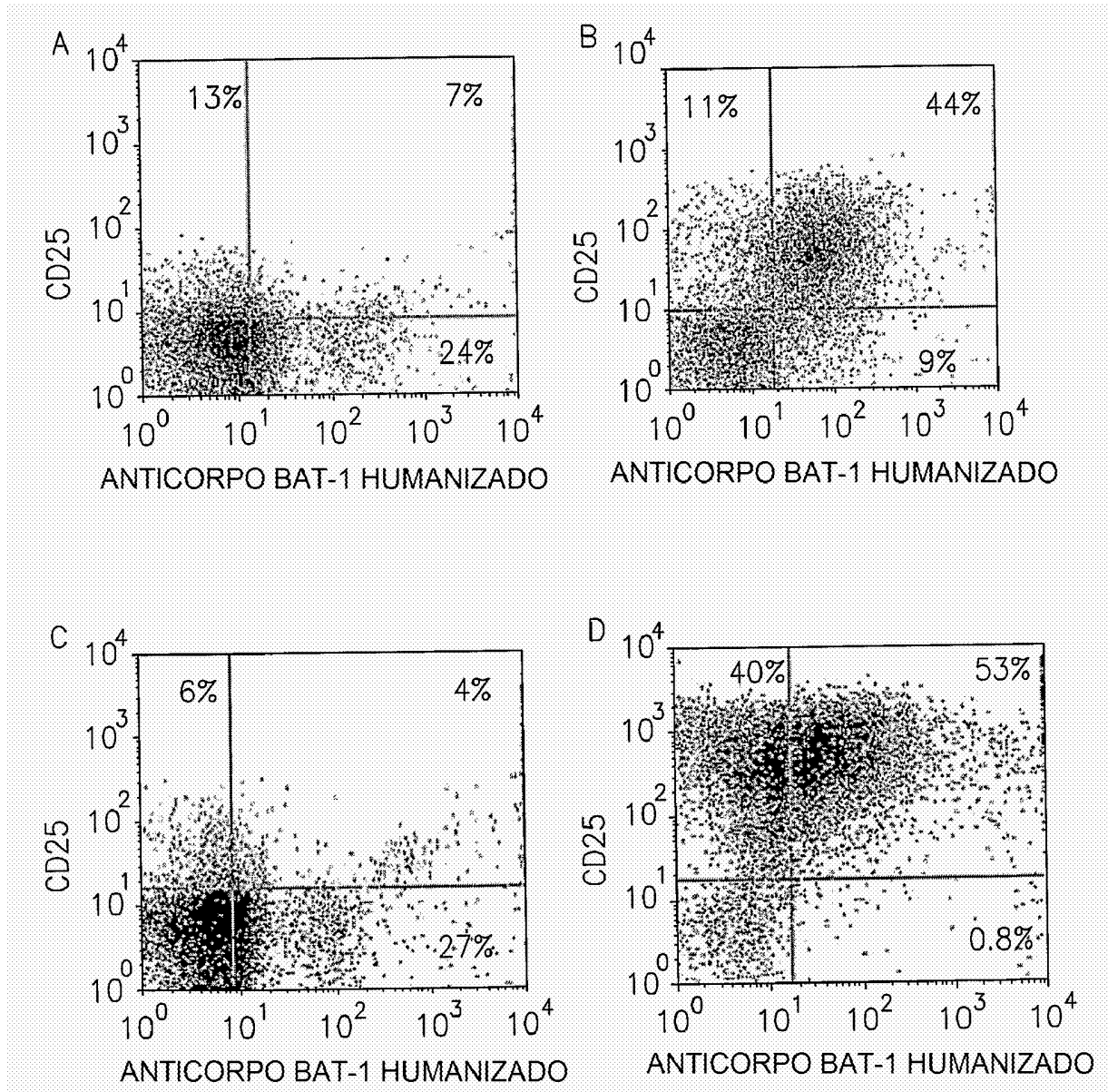


FIGURA 28

**FIGURA 29**

**FIGURA 30**

**FIGURA 31**

**FIGURA 32**

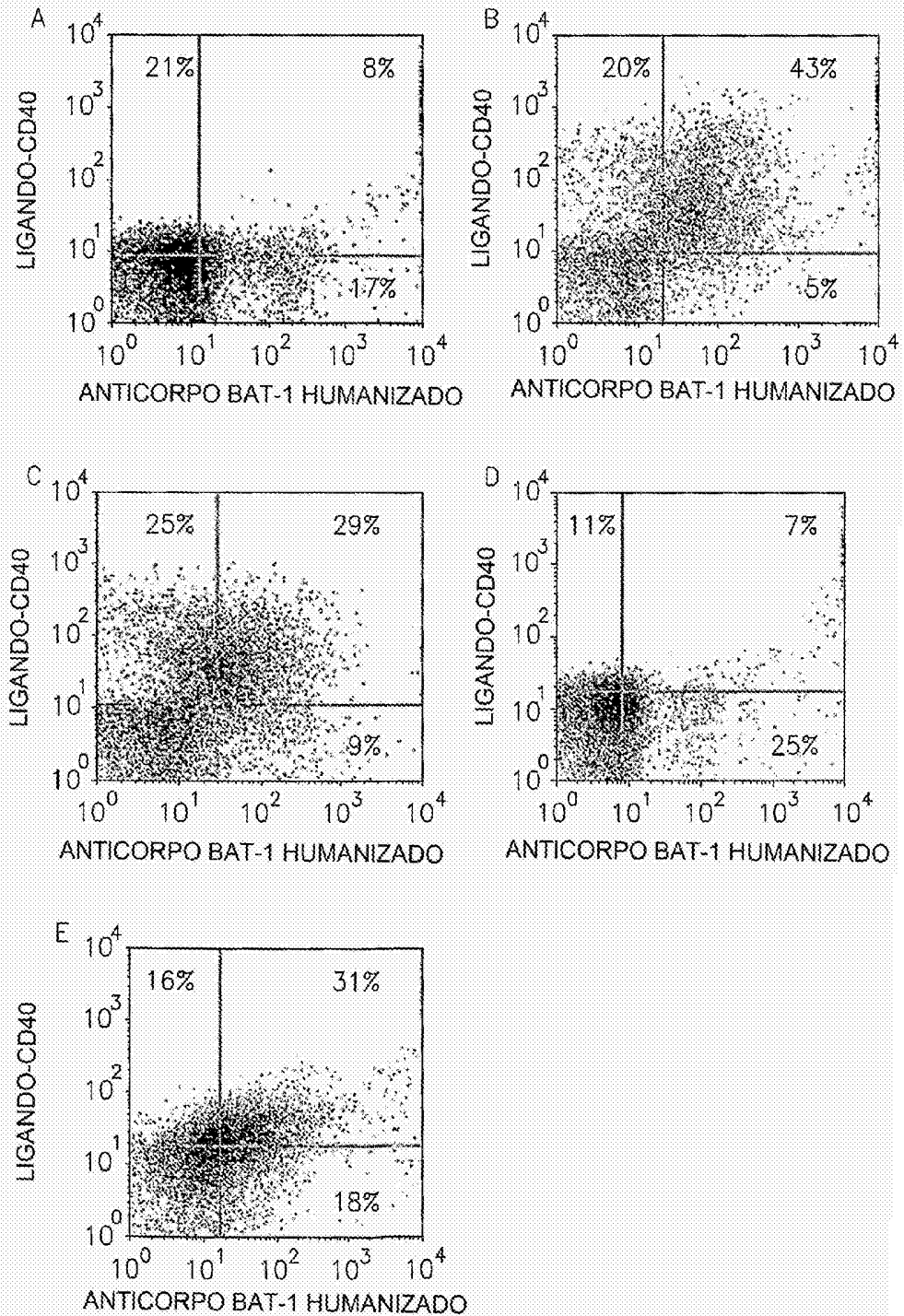
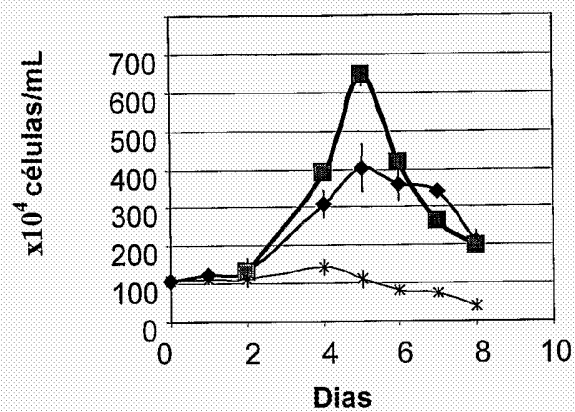


FIGURA 33

A



B

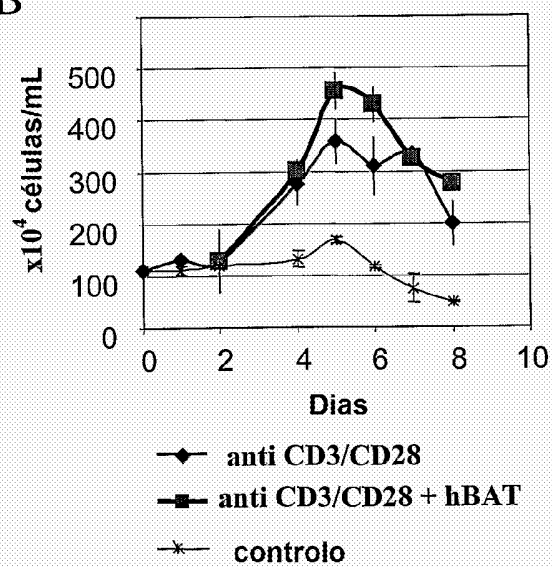


FIGURA 34

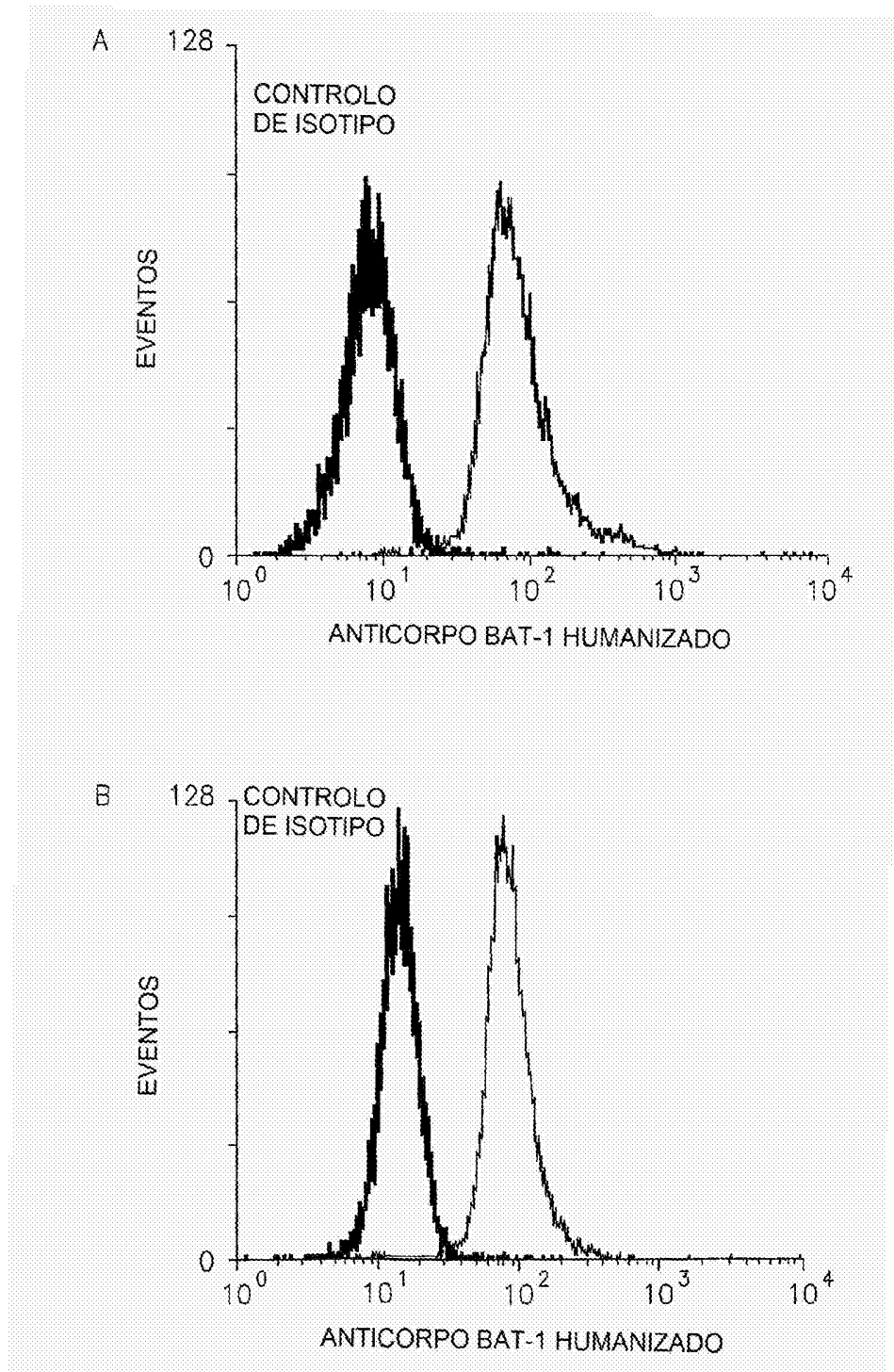
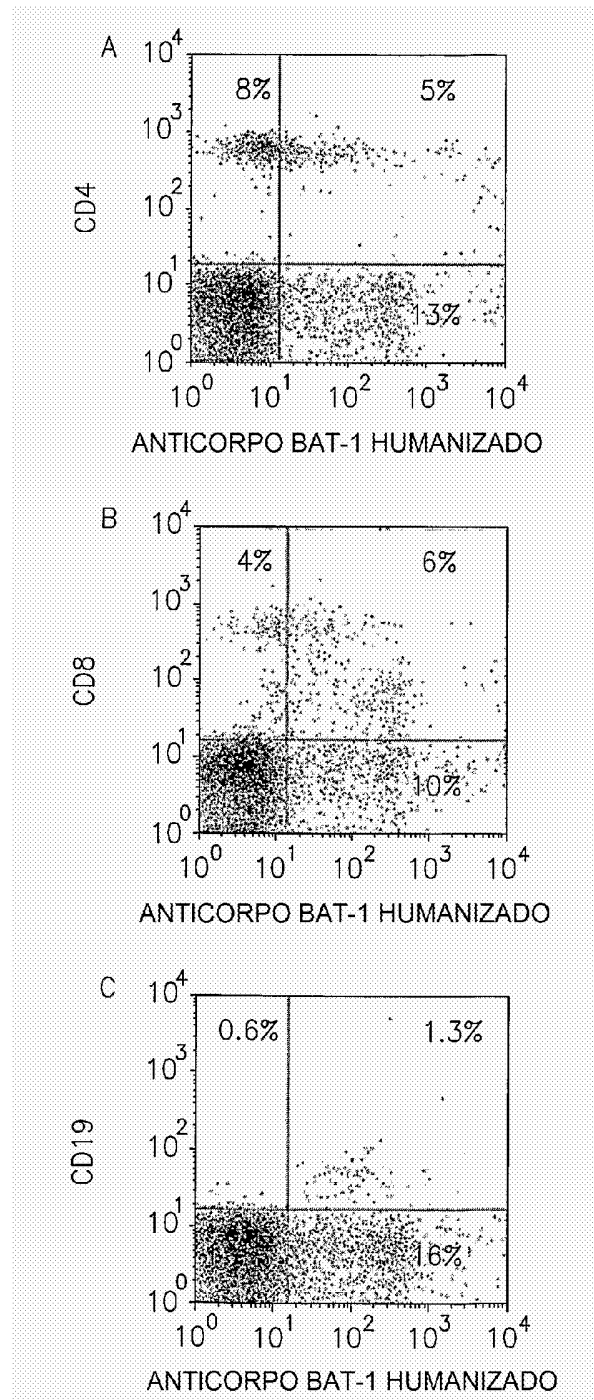


FIGURA 35

**FIGURA 36**