



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112013012858-5 B1**



**(22) Data do Depósito:** 22/11/2011

**(45) Data de Concessão:** 07/12/2021

**(54) Título:** ANTICORPO MONOCLONAL QUE SE LIGA A PECTINACETILESTERASE DE NOTUM, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA HOSPEDEIRA E MÉTODO PARA PRODUZIR O DITO ANTICORPO

**(51) Int.Cl.:** A61K 39/395; A61K 39/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 24/11/2010 US 61/416,927.

**(73) Titular(es):** LEXICON PHARMACEUTICALS, INC..

**(72) Inventor(es):** ROBERT JOSEPH BROMMAGE JR.; XIAO FENG; SEOKJOO HONG; GREGORY LANDES; JEFF LIU; DAVID GEORGE POTTER; DAVID REED POWELL.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2011061785 de 22/11/2011

**(87) Publicação PCT:** WO 2012/071381 de 31/05/2012

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 23/05/2013

**(57) Resumo:** ANTICORPOS QUE SE LIGAM A PECTINA ACETILESTERASE DE NOTUM. Anticorpos que neutralizam Pectina Acetilesterase de Notum são descritos, assim como composições compreendendo-os e métodos para seu uso para tratar doenças e distúrbios afetando o osso.

“ANTICORPO MONOCLONAL QUE SE LIGA A PECTINACETILESTERASE DE NOTUM, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA HOSPEDEIRA E MÉTODO PARA PRODUIR O DITO ANTICORPO”

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório US 61/416.927, depositado em 24 de Novembro de 2010, que está incorporado neste documento por referência em sua totalidade para qualquer finalidade.

## 1. CAMPO DA INVENÇÃO

[002] Esta invenção refere-se a inibidores de anticorpo de Pectina acetilesterase de Notum, composições compreendendo os mesmos, e métodos de uso dos mesmos.

## 2. FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] A saúde óssea depende das atividades coordenadas do osso formando osteoblastos e osteoclastos de reabsorção óssea. “Bone turnover reflects a balance between these anabolic and catabolic cellular functions and ensures that the mature skeleton can repair itself when damaged and sustain its endocrine function by release of minerals such as calcium and phosphorous into the circulation.” Allen, J.G. et al., J. Med. Chem., 53 (10 de junho de 2010), pp. 4332 – 4353, 4332. Muitos estados da doença alteram esse equilíbrio resultando em massa óssea aumentada ou reduzida ou alterações na qualidade óssea. A perda gradual de densidade mineral óssea é conhecida como osteopenia; a perda severa de osso é conhecida como osteoporose. Id.

[004] O padrão atual de cuidado para o tratamento e prevenção da osteoporose utiliza a classe de bisfosfonato de agentes antirreabsortivos de molécula pequena, orais. Id. em 4333. Ácido zoledrônico, raloxifeno, cálcio, e suplementos de vitamina D também são normalmente usados no tratamento de osteoporose. Id. Embora os agentes antirreabsortivos possam ajudar a prevenir a perda óssea, agentes anabólicos “são capazes de aumentar a massa óssea para um grau maior ... e também

têm a capacidade de melhorar a qualidade óssea e aumentar a resistência óssea”, Guo, H., et al., J. Med. Chem., 53 (25 de Fevereiro de 2010), pp. 1819-1829, 1819. Nos Estados Unidos, o PTH humano é o único agente anabólico aprovado por FDA. *Id.*; Allen em 4333. “Por causa da escassez de agentes anabólicos disponíveis para o tratamento da osteoporose, há uma necessidade urgente de desenvolver compostos moleculares pequenos para tratar esta doença que não sejam tóxicos, de custo eficaz e fáceis de administrar”. Guo, em 1819.

[005] “Embora o desenvolvimento de agentes farmacológicos que estimulam a formação óssea seja menos avançado em comparação com terapias de antirreabsorção, são conhecidas várias vias para facilitar a função de osteoblasto”. Allen em 4338. Estas vias incluem proteínas morfogênicas ósseas, fator de crescimento transformante  $\beta$ , hormônio da tireoide, fator de crescimento similar à insulina, fator de crescimento de fibroblasto, e sinalização de local de integração de MMTV tipo Wingless (WNT). *Id.* Guo e colaboradores recentemente relataram resultados relativos à primeira destas vias. Guo, *supra*. Em particular, eles relataram que determinados compostos de benzotiofeno e benzofurano substituídos aumentam a expressão de proteína morfogênica óssea 2 em camundongos e ratos. Dois dos compostos supostamente estimulam a formação óssea e restauração de conectividade trabecular *in vivo*. *Id.* em 1819.

[006] Outra destas vias é a via de WNT, que está implicada em uma variedade de desenvolvimento e processos regenerativos. Allen em 4340. A via é complexa, no entanto, e muito sobre isso e sobre como seus componentes afetam o osso permanece obscuro. Por exemplo, tem sido sugerido que LRP-5, mutações que estão associadas à maior massa óssea em seres humanos, e  $\beta$ -catenina, através dos quais a sinalização de WNT canônica ocorre, “não podem ser ligadas diretamente via sinalização de WNT ao controle de massa óssea”. *Id.*

[007] A análise recente de dados da expressão do gene levou à identificação

de novos alvos de sinalização de WNT. Vide por exemplo, Torisu, Y., et al., Cancer Sci., 99(6):1139-1146, 1143 (2008). Tal alvo é Pectina acetilesterase de Notum, também conhecida como NOTUM e LOC174111.

### 3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] Em algumas modalidades, um anticorpo monoclonal que se liga à pectina acetilesterase de notum humana (NOTUM) e neutraliza pelo menos uma atividade de NOTUM é fornecido. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um NOTUM selecionado de NOTUM de camundongo, NOTUM de porquinho-da-índia, NOTUM de macaco cinomolgos, e NOTUM de macaco rhesus. Em algumas modalidades, o anticorpo tem pelo menos uma atividade selecionada a partir de redução da atividade de NOTUM em um ensaio *in vitro* de 8-octanoiloxipireno-1,3,6-trissulfonato trissódico (OPTS), e redução da atividade de NOTUM em um ensaio *in vitro* de sinalização de Wnt. Em algumas modalidades, o anticorpo tem pelo menos uma atividade selecionada a partir de aumento dos níveis séricos de PINP *in vivo*, aumento da densidade mineral óssea *in vivo*, aumento da espessura cortical do eixo médio do fêmur *in vivo*, aumento da área do eixo médio óssea do fêmur *in vivo*, aumento da espessura cortical do eixo médio do úmero *in vivo*, aumento da formação óssea endocortical *in vivo*, aumento da proporção do volume ósseo cortical no corpo vertebral de LV5 *in vivo* e aumento da proporção do volume ósseo do colo do fêmur para o volume total do colo do fêmur *in vivo*. Em algumas modalidades, um anticorpo que se liga à NOTUM liga um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 com KD de menos de 50 nM, menos de 20 nM, ou menos de 10 nM.

[009] Em algumas modalidades, o anticorpo tem pelo menos uma característica de ligação, selecionada a partir de: a) se liga a um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 83 com uma afinidade de ligação que seja pelo menos 5 vezes mais forte que a afinidade de ligação do anticorpo a um polipeptídeo com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 84; b) se liga a um



polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 85 com uma afinidade de ligação que seja pelo menos 5 vezes mais forte que a afinidade de ligação do anticorpo a um polipeptídeo com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 86; c) se liga a um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 com uma afinidade de ligação que seja pelo menos 5 vezes mais forte que a afinidade de ligação do anticorpo a um polipeptídeo com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 94; d) se liga a um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 com uma afinidade de ligação que seja pelo menos 5 vezes mais forte que a afinidade de ligação do anticorpo a um polipeptídeo com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 99; e) se liga a um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 95 com uma afinidade de ligação que seja pelo menos 5 vezes mais forte que a afinidade de ligação do anticorpo a um polipeptídeo com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 2; f) compete para a ligação a NOTUM com um anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 7 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 8; g) compete para a ligação a NOTUM com um anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 15 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 16; h) compete para a ligação a NOTUM com um anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 23 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 24; i) compete para ligação a NOTUM com um anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 31 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 32; j) compete para ligação a NOTUM com um anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 39 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID

NO: 40; k) compete para ligação a NOTUM com um anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 47 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 48; e l) compete para ligação a NOTUM com um anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 55 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 56.

[0010] Em algumas modalidades, o anticorpo é selecionado de um anticorpo de camundongo, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado e um anticorpo humano.

[0011] Em algumas modalidades, um anticorpo que se liga à NOTUM compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia pesada compreende pelo menos uma CDR selecionada a partir de: a) uma CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 9, 17, 25, 33, 41, 49 e 90; b) uma CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 10, 18, 26, 34, 42 e 50; e c) uma CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 11, 19, 27, 35, 43, 51 e 91. Em algumas modalidades, cadeia pesada compreende um conjunto compreendendo uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3, onde o conjunto é selecionado de: a) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 9, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 10, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 11; b) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 18, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 91; c) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 17, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 18, e uma CDR3 tendo a sequência de

aminoácidos SEQ ID NO: 19; d) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 26, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 27; e) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 25, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 26, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 27; f) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 91; g) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 33, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 35; h) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 41, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 42, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 43; i) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 49, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 50, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 51; e j) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 57, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 58, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 59. Em algumas modalidades, a cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 63, 67, 71, 75 e 79.

[0012] Em algumas modalidades, um anticorpo que se liga à NOTUM compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia leve compreende pelo menos uma CDR selecionada a partir de: a) uma CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs:

12, 20, 28, 36, 44, 52 e 92; b) uma CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61 e 93; e c) uma CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 14, 22, 30, 38, 46, 54 e 62. Em algumas modalidades, a cadeia leve compreende um conjunto compreendendo uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3, em que o conjunto é selecionado a partir de: a) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 12, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 13, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 14; b) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 92, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 93, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 22; c) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 20, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 21, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 22; d) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 92, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 93, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 30; e) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 28, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 29, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 30; f) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 92, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 93, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 38; g) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 36, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 37, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 38; h) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 44, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 45 e uma CDR3 tendo a sequência de

aminoácidos SEQ ID NO: 46; i) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 52, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 53, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 54; e j) um conjunto compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 60, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 61, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 62. Em algumas modalidades, a cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve, compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 65, 69, 73, 77 e 81.

[0013] Em algumas modalidades, um anticorpo que se liga à NOTUM compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que: a) região variável de cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 9, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 10, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 11, e em que a região variável de cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 12, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 13, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 14; ou b) a região variável de cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 18, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 91, e em que a região variável de cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 92, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 93, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 22; ou c) região variável de cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 17, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 18, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 19 e a região variável de cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a

sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 20, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 21, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 22; ou d) região variável de cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 26, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 27, e em que a região variável de cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 92, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 93, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 30; ou e) região variável de cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 25, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 26, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 27, e em que a região variável de cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 28, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 29, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 30; ou f) região variável de cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 91, e em que a região variável de cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 92, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 93, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 38; ou g) região variável de cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 33, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 35 e a região variável de cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 36, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 37, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 38; ou h) região variável de cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a

sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 41, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 42, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 43, e em que a região variável de cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 44, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 45, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 46; ou i) região variável de cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 49, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 50, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 51, e em que a região variável de cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 52, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 53, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 54; ou j) região variável de cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 57, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 58, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 59, e em que a região variável de cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 60, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 61, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 62.

[0014] Em algumas modalidades, um anticorpo que se liga à NOTUM compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a) região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 7 e a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 8; ou b) a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 15 e a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 16; ou c) região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 71 e a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 73; ou

d) cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 72 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 74; ou e) região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 23 e a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 24; ou f) região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 75 e a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 77; ou g) cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 76 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 78; ou h) a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 31 e a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 32; ou i) região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 79 e a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 81; ou j) cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 80 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 82; ou k) a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 39 e a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 40; ou l) a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 67 e a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 69; ou m) a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 68 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 70; ou n) a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 47 e a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 48; ou o) a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 55 e a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 56; ou p) a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 63 e a região variável de cadeia



leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 65; ou q) a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 64 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 66.

[0015] Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico é fornecida que compreende uma sequência de polinucleotídeos que codifica uma cadeia pesada ou uma cadeia leve de um anticorpo que se liga à NOTUM e neutraliza pelo menos uma atividade de NOTUM. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma primeira sequência de polinucleotídeos que codifica a cadeia pesada e uma segunda sequência de polinucleotídeos que codifica a cadeia leve. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é um vetor. Em algumas modalidades, é fornecida uma célula hospedeira, compreendendo uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de polinucleotídeos que codifica uma cadeia pesada ou uma cadeia leve de um anticorpo que se liga à NOTUM e neutraliza pelo menos uma atividade de NOTUM. Em algumas modalidades, uma célula hospedeira compreendendo uma molécula de ácido nucleico que compreende uma primeira sequência de polinucleotídeos que codifica uma cadeia pesada e uma segunda sequência de polinucleotídeos que codifica uma cadeia leve é fornecida. Em algumas modalidades, uma célula hospedeira compreende uma primeira molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de polinucleotídeos que codifica uma cadeia pesada e uma segunda molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de polinucleotídeos que codifica uma cadeia leve. Em algumas modalidades, um método para produzir um anticorpo que se liga à NOTUM e neutraliza pelo menos uma atividade de NOTUM é fornecido, compreendendo incubar uma célula hospedeira sob condições suficientes para expressar o anticorpo.

[0016] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica é fornecida, compreendendo um anticorpo que se liga à NOTUM e neutraliza pelo menos uma atividade de NOTUM. Em algumas modalidades, um método para estimulação de

formação óssea endocortical em um paciente, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica, é fornecido. Em algumas modalidades, um método para tratar, gerenciar ou prevenir uma doença ou distúrbio caracterizado por perda óssea em um paciente, compreendendo administrar uma quantidade eficaz da composição farmacêutica é fornecido. Em algumas modalidades, a doença ou o distúrbio é a osteoporose. Em algumas modalidades, uma forma de dosagem unitária única compreendendo a composição farmacêutica é fornecida.

#### 4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0017] A Figura 1 fornece uma representação gráfica das diferenças entre as espessuras corticais de diversos locais do osso em camundongos nocaute homozigotos de NOTUM (“HOM”) e aqueles nas suas ninhadas do tipo selvagem (“WT”).

[0018] A Figura 2 fornece uma representação gráfica de um aumento em espessuras corticais do osso observado em ambos os camundongos nocaute homozigotos de NOTUM e heterozigotos (“HET”) em comparação com suas ninhadas do tipo selvagem.

[0019] A Figura 3 fornece uma representação gráfica dos resultados obtidos de testes de força de ruptura do fêmur e compressão da coluna vertebral realizados nos ossos de camundongos nocaute homozigotos e heterozigotos de NOTUM masculinos e suas ninhadas do tipo selvagem.

[0020] A Figura 4 fornece uma representação gráfica dos resultados obtidos de testes de força de ruptura do fêmur e compressão da coluna vertebral realizados nos ossos de camundongos nocaute homozigotos e heterozigotos de NOTUM fêmeas e suas ninhadas do tipo selvagem.

[0021] A Figura 5 fornece uma representação gráfica de determinadas proteínas quiméricas de humano/camundongo e indica uma região que parece estar envolvida na ligação de anticorpos neutralizantes de NOTUM na Pré-classificação 1,

conforme descrito no Exemplo 6.7.

[0022] A Figura 6 fornece uma representação gráfica das medições de espessura cortical do eixo médio do fêmur obtidas em camundongos após oito semanas de administração de MAb 2.1029 ou MAb 2,78, conforme descrito no Exemplo 6.9.1.

[0023] A Figura 7 fornece uma representação gráfica das medições de espessura cortical do eixo médio do fêmur obtidas em camundongos após quatro semanas de administração de diversas dosagens de MAb 2.1029, conforme descrito no Exemplo 6.9.2.

[0024] A Figura 8 fornece uma representação gráfica das medições de espessura cortical do eixo médio do fêmur obtidas em camundongos após quatro semanas de administração de diversas doses de MAb 2.78b, conforme descrito no Exemplo 6.9.3. A Figura 8A mostra dosagens de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg de MAb 2.78b. A Figura 8B mostra dosagens de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg e 3 mg/kg de MAb 2.78b.

[0025] A Figura 9 fornece uma representação gráfica das medições de espessura cortical do eixo médio do fêmur (A) e níveis séricos de PINP (B) obtidas em camundongos após 4 semanas de administração de MAb 2.78b, com e sem tratamento prévio com zoledronato, conforme descrito no Exemplo 6.9.4.

[0026] A Figura 10 fornece uma representação gráfica das medições de espessura cortical do eixo médio do fêmur obtidas em camundongos após 4 semanas de administração de MAb 2.78a, conforme descrito no Exemplo 6.9.5.

[0027] A Figura 11 fornece uma representação gráfica das medições de espessura cortical do eixo médio do fêmur (A) e medições de espessura cortical do eixo médio do úmero (B) obtidas em camundongos após 12 semanas de administração de MAb 2.78a, conforme descrito no Exemplo 6.9.6.

[0028] A Figura 12 fornece uma representação gráfica das medições de

espessura cortical do eixo médio do fêmur (A), medições de espessura cortical do úmero (B) e espessura cortical da nona costela (C) obtidas em camundongos após 24 semanas de administração de MAb 2.78a, conforme descrito no Exemplo 6.9.6.

[0029] A Figura 13 fornece uma representação gráfica da espessura cortical do eixo médio do fêmur (A) e área óssea mineralizada do eixo médio do fêmur (B) em cirurgia de simulação (sham) e camundongos ovariectomizados administrados por anticorpo neutralizante de NOTUM 2.78b ou anticorpo de controle, conforme descrito no Exemplo 6.10.3.

[0030] A Figura 14 fornece uma representação gráfica da proporção no corpo vertebral de LV5 de volume ósseo cortical para o volume total (A), a proporção no corpo vertebral de LV5 de volume ósseo cortical para o volume total (B), e a proporção no corpo vertebral de LV5 do volume ósseo trabecular para o volume total (C) em cirurgia de simulação (sham) e camundongos ovariectomizados administrados por anticorpo neutralizante de NOTUM 2.78b ou anticorpo de controle, conforme descrito no Exemplo 6.10.3.

[0031] A Figura 15 fornece uma representação gráfica da proporção do volume ósseo do colo femoral para o volume total em cirurgia de simulação (sham) e camundongos ovariectomizados administrados por anticorpo neutralizante de NOTUM 2.78b ou anticorpo de controle, conforme descrito no Exemplo 6.10.3.

[0032] A Figura 16 fornece uma representação gráfica da porcentagem da superfície endocortical das seções transversais do eixo médio do fêmur que foram rotuladas com calceína, alizarina e tetraciclina em cirurgia de simulação (sham) e camundongos ovariectomizados administrados por anticorpo neutralizante de NOTUM 2.78b ou anticorpo de controle, conforme descrito no Exemplo 6.10.4.

[0033] A Figura 17 fornece uma representação gráfica da taxa aposicional mineral (A) e a taxa de formação óssea referente ao volume (B) em cirurgia de simulação (sham) e camundongos ovariectomizados administrados por anticorpo

neutralizante de NOTUM 2.78b ou anticorpo de controle, conforme descrito no Exemplo 6.10.4.

## 5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0034] A presente invenção se baseia, em parte, na verificação de que a inibição de NOTUM pode afetar a formação óssea endocortical. Aspectos específicos da invenção estão baseados em estudos de camundongos carentes de um gene de NOTUM funcional (“camundongos nocaute”), no desenvolvimento de anticorpos que inibem NOTUM e a verificação de que esses anticorpos podem ser usados para estimular a formação óssea cortical em camundongos e ratos.

[0035] Os títulos de seção neste documento são para propósitos organizacionais apenas e não são para serem construídos como limitando o assunto descrito. Todos os documentos ou partes de documentos, citados neste pedido, incluindo Patentes, Pedidos de Patente, artigos, livros e tratados, são expressamente incorporados por referência, em sua totalidade, para qualquer finalidade. No caso em que uma ou mais de literatura incorporada e materiais similares definem um termo que contradiz tal definição do termo neste pedido, este pedido controla.

### 5.1. Definições

[0036] O termo “anticorpo”, como usados aqui, se refere a um anticorpo intacto ou um fragmento de um anticorpo que compete com o anticorpo intacto para ligação ao antígeno. Fragmentos de anticorpos incluem, mas não estão limitados a Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fd, diacorpos e outros fragmentos de anticorpos que mantêm pelo menos uma porção da região variável de um anticorpo intacto. Vide, por exemplo, Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134. Em algumas modalidades, os fragmentos de anticorpos são produzidos por clivagem química ou enzimática de anticorpos intactos. Em algumas modalidades, fragmentos de anticorpos são produzidos por técnicas de DNA recombinante.

[0037] O termo “local de ligação ao antígeno” refere-se a uma porção de um

anticorpo capaz de se ligar especificamente a um antígeno. Em algumas modalidades, um local de ligação ao antígeno é fornecido por uma ou mais regiões variáveis do anticorpo.

[0038] O termo “afinidade de ligação” refere-se a uma determinação qualitativa ou quantitativa da força com que um anticorpo se liga a um antígeno. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é a constante de dissociação (KD) do anticorpo para o antígeno. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação de um anticorpo a um antígeno é determinada qualitativamente, tal como em relação à afinidade de ligação de um anticorpo diferente a um antígeno, ou em relação à afinidade de ligação do mesmo anticorpo a um antígeno diferente (tal como o antígeno com uma ou mais alterações na sua sequência de aminoácidos). A afinidade de ligação de um anticorpo a um primeiro antígeno é considerada mais “forte” do que sua afinidade a um segundo antígeno, por exemplo, quando a KD do anticorpo ao primeiro antígeno é menor do que a KD do anticorpo ao segundo antígeno. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação de um anticorpo ao primeiro antígeno é considerada “mais forte” quando a KD do anticorpo ao primeiro antígeno é pelo menos 1,5 vez, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes ou pelo menos 10 vezes mais baixo do que a KD do anticorpo ao segundo antígeno. Por outro lado, a afinidade de ligação de um anticorpo a um primeiro antígeno é considerada mais “fraca” do que sua afinidade ao segundo antígeno, por exemplo, quando a KD do anticorpo ao primeiro antígeno é maior do que a KD do anticorpo ao segundo antígeno. Em algumas modalidades, considera-se a afinidade de ligação de um anticorpo ao primeiro antígeno “mais fraca” quando a KD do anticorpo ao primeiro antígeno é pelo menos 1,5 vez, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes ou pelo menos 10 vezes maior do que a KD do anticorpo ao segundo antígeno.

[0039] Um anticorpo “quimérico” refere-se a um anticorpo constituído de componentes de pelo menos duas fontes diferentes. Em algumas modalidades, um

anticorpo quimérico compreende uma porção de um anticorpo derivado de uma primeira espécie fundida a outra molécula, por exemplo, uma porção de um anticorpo derivado de uma segunda espécie. Em algumas dessas modalidades, um anticorpo quimérico compreende uma porção de um anticorpo derivado de um animal não humano fundida a uma porção de um anticorpo derivado de um humano. Em algumas dessas modalidades, um anticorpo quimérico compreende toda ou uma parte de uma região variável de um anticorpo derivado de um animal não humano fundida a uma região constante de um anticorpo derivado de um humano.

[0040] O termo “epítopo” refere-se a qualquer polipeptídeo determinante capaz de se ligar especificamente a uma imunoglobulina ou um receptor de células T. Em algumas modalidades, um epítopo é uma região de um antígeno que é especificamente ligado a um anticorpo. Em algumas modalidades, um epítopo pode incluir agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas, tais como aminoácidos, correntes laterais de açúcar, fosforila ou grupos sulfonila. Em algumas modalidades, um epítopo pode ter características estruturais tridimensionais específicas (por exemplo, um epítopo “conformacional”) e/ou características de carga específica.

[0041] Um epítopo é definido como “o mesmo” como outro epítopo, se um determinado anticorpo se liga especificamente a ambos os epítopos. Em algumas modalidades, polipeptídeos tendo sequências de aminoácidos primárias diferentes podem compreender epítopos que são os mesmos. Anticorpos diferentes são os referidos para se ligar ao mesmo epítopo se eles competem para ligação específica a esse epítopo.

[0042] Um “fragmento” de um polipeptídeo de referência refere-se a um trecho contíguo de aminoácidos, de qualquer parte do polipeptídeo de referência. Um fragmento pode ser de qualquer tamanho que é menor do que o comprimento do polipeptídeo de referência. Em algumas modalidades, um fragmento é um trecho

contíguo de aminoácidos de qualquer parte do polipeptídeo de referência que contém um epítopo específico ou uma atividade específica.

[0043] O termo “anticorpo humano” refere-se a um anticorpo monoclonal que contém sequências de anticorpo humano e não contém sequências de anticorpo de um animal não humano. Em algumas modalidades, um anticorpo humano pode conter sequências sintéticas não encontradas em anticorpos nativos. O termo não é limitado pela forma em que os anticorpos são produzidos. Por exemplo, em diversas modalidades, um anticorpo humano pode ser produzido em um camundongo transgênico, por exibição de fago, por linfócitos B humanos, ou por métodos recombinantes.

[0044] Um anticorpo “humanizado” refere-se a um anticorpo não humano que tem sido modificado de modo que ele corresponda mais de perto (na sequência de aminoácidos) um anticorpo humano. Um anticorpo humanizado é, portanto, um tipo de anticorpo quimérico. Em algumas modalidades, resíduos de aminoácidos fora dos resíduos de ligação ao antígeno da região variável do anticorpo não humano são modificados. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado é construído substituindo todas ou uma porção de uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de um anticorpo humano com todas ou uma porção de uma ou mais CDRs de outro anticorpo, tal como um anticorpo não humano, tendo a especificidade de ligação ao antígeno desejado. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado compreende regiões variáveis, em que todas ou substancialmente todas das CDRs correspondem às CDRs de um anticorpo não humano e todas ou substancialmente todas as regiões estruturais (FRs) correspondem às FRs de um anticorpo humano. Em algumas modalidades, um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais CDRs do anticorpo não humano são alterados no anticorpo humanizado, por exemplo, através de um processo de maturação de afinidade. Métodos exemplares de maturação de afinidade são



conhecidos na técnica. Em algumas dessas modalidades, um anticorpo humanizado adicionalmente compreende uma região constante (Fc) de um anticorpo humano.

[0045] A menos que especificado de outra forma, o termo “incluem” tem o mesmo significado que “incluem, mas não estão limitados a,” o termo “inclui” tem o mesmo significado que “inclui, mas está não limitado a”, e o termo “incluindo” tem o mesmo significado que “incluindo, mas não está limitado a”. De forma similar, o termo “tal como” tem o mesmo significado que o termo “tal como, mas não limitado a”.

[0046] A menos que especificado de outra forma, os termos “gerenciar”, “gerenciando” e “gerenciamento” englobam prevenir a recorrência da doença ou distúrbio especificado em um paciente que já tenha sofrido com a doença ou distúrbio, e/ou aumento do tempo que um paciente que sofre de doença ou distúrbio permanece em remissão. Os termos abrangem modulação do limite, desenvolvimento e/ou duração da doença ou distúrbio, ou alteração da forma que um paciente responde à doença ou ao distúrbio.

[0047] O termo “anticorpo monoclonal” refere-se a um anticorpo de uma população substancialmente homogênea de anticorpos que se ligam especificamente ao mesmo epítopo. Em algumas modalidades, um anticorpo monoclonal é secretado por um hibridoma. Em algumas dessas modalidades, um hibridoma é produzido de acordo com alguns métodos conhecidos pelos versados na técnica. Vide, por exemplo, Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-499. Em algumas modalidades, um anticorpo monoclonal é produzido usando métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, Patente US 4.816.567). Em algumas modalidades, um anticorpo monoclonal refere-se a um fragmento de anticorpo isolado de uma biblioteca de exibição de fago. Vide, por exemplo, Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628, e Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597. Para diversas outras técnicas de produção de anticorpo monoclonal, vide, por exemplo, Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,

NY).

[0048] O termo “anticorpo neutralizante” ou “anticorpo que neutraliza” refere-se a um anticorpo que reduz pelo menos uma atividade de um polipeptídeo compreendendo o epítopo que o anticorpo se liga especificamente. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante reduz a uma atividade do polipeptídeo *in vitro* e/ou *in vivo*.

[0049] O termo “NOTUM” refere-se à pectinacetilsterase de notum tendo uma sequência de aminoácidos de qualquer fonte de vertebrados ou mamíferos, incluindo seres humanos, bovinos, galinha, roedores, camundongo, rato, suínos, ovinos, primatas, macaco e porquinho-da-índia, a menos que especificado de outra forma. O termo também se refere a fragmentos e variantes de NOTUM nativo que mantêm pelo menos uma atividade *in vivo* ou *in vitro* de NOTUM nativo. O termo engloba formas precursoras não processadas de comprimento completo de NOTUM bem como formas maduras resultantes de clivagem pós-traducional de um peptídeo de sinal e outras formas de processamento proteolítico. Em algumas modalidades, um NOTUM de humano não processado, de comprimento completo tem a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, NOTUM de camundongo não processado, de comprimento completo tem a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

[0050] Os termos “polipeptídeo,” “peptídeo” e “proteína” são usados permutavelmente neste documento para se referir a um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos se aplicam aos polímeros de aminoácidos contendo aminoácidos de ocorrência natural bem como polímeros de aminoácidos, em que um ou mais resíduos de aminoácidos são um análogo químico artificial de um aminoácido de ocorrência natural correspondente. Os polímeros de aminoácidos podem ser de qualquer comprimento. O termo “polipeptídeo nativo” se refere a um polipeptídeo de ocorrência natural.

[0051] A menos que especificado de outra forma, os termos “prevenir”, “prevenindo” e “prevenção” contemplam uma ação que ocorre antes que um paciente comece a sofrer da doença ou distúrbio especificado, que inibe ou reduz a gravidade da doença ou distúrbio. Em outras palavras, os termos abrangem profilaxia.

[0052] A menos que especificado de outra forma, uma “quantidade profilaticamente eficaz” de um composto é uma quantidade suficiente para prevenir uma doença ou condição ou um ou mais sintomas associados à doença ou condição, ou prevenir a sua recorrência. Uma “quantidade profilaticamente eficaz” de um composto significa uma quantidade de agente terapêutico, sozinho ou em combinação com outros agentes, que fornece um benefício profilático na prevenção da doença. O termo “quantidade profilaticamente eficaz” pode abranger uma quantidade que melhora a profilaxia geral ou aumenta a eficácia profilática de outro agente profilático.

[0053] Um anticorpo “se liga especificamente” a um antígeno quando preferencialmente reconhece o antígeno em uma mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas. Em algumas modalidades, um anticorpo compreende um local de ligação ao antígeno que se liga especificamente a um epítopo específico. Em algumas dessas modalidades, o anticorpo é capaz de ligar-se especificamente a antígenos diferentes contanto que os antígenos diferentes compreendam tal epítopo específico. Em alguns casos, por exemplo, proteínas homólogas de diferentes espécies podem compreender ao mesmo epítopo. Em algumas modalidades, um anticorpo é dito especificamente ligar-se a um antígeno quando a constante de dissociação ( $K_D$ ) é  $\leq 1$   $\mu\text{M}$ , em algumas modalidades, quando a constante de dissociação é  $\leq 100$  nM e em algumas modalidades, quando a constante de dissociação é  $\leq 10$  nM.

[0054] Os termos “indivíduo” e “paciente” incluem os seres humanos e animais. Em algumas modalidades, um indivíduo ou paciente é um mamífero. Em algumas dessas modalidades, um indivíduo ou paciente é um humano.

[0055] A menos que especificado de outra forma, uma “quantidade

terapeuticamente eficaz” de um composto é uma quantidade suficiente para fornecer um benefício terapêutico no tratamento ou gerenciamento de uma doença ou condição, ou para retardar ou minimizar um ou mais sintomas associados à doença ou condição. Uma “quantidade terapêuticamente eficaz” de um composto significa uma quantidade de agente terapêutico, sozinho ou em combinação com outras terapias, que fornece um benefício terapêutico no tratamento ou no gerenciamento da doença ou condição. O termo “quantidade terapêuticamente eficaz” pode abranger uma quantidade que melhora a terapia global, reduz ou evita sintomas ou causas de uma doença ou condição ou aumenta a eficácia terapêutica de outro agente terapêutico.

[0056] A menos que especificado de outra forma, os termos “tratar”, “tratando” e “tratamento” contemplam uma ação que ocorre quando um paciente está sofrendo de doença ou distúrbio especificado, o que reduz a gravidade da doença ou de distúrbio, ou retarda ou diminui a progressão da doença ou distúrbio.

## 5.2. Anticorpos

### 5.2.1. Estrutura de anticorpo exemplar

[0057] Um anticorpo nativo normalmente tem uma estrutura tetramérica. Um tetrâmero normalmente compreende dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par tendo uma cadeia leve (em algumas modalidades, de cerca de 25 kDa) e uma cadeia pesada (em algumas modalidades, de cerca de 50 a 70 kDa). Em um anticorpo nativo, uma cadeia pesada compreende uma região variável, VH e três regiões constantes, CH1, CH2 e CH3. O domínio de VH é o terminal amino de cadeia pesada, e o domínio de CH3 é o terminal carbóxi. Em um anticorpo nativo, uma cadeia leve compreende uma região variável, VL e uma região constante, CL. A região variável de cadeia leve é o terminal amino de cadeia leve. Em um anticorpo nativo, as regiões variáveis de cada par de cadeias leve/pesada normalmente formam o local de ligação ao antígeno. As regiões constantes são normalmente responsáveis pela

função efetora.

[0058] Cadeias leves humanas nativas são geralmente classificadas como cadeias leves kappa e lambda. Cadeias pesadas humanas nativas são normalmente classificadas como mu, delta, gama, alfa ou épsilon e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tem subclasses, incluindo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tem subclasses incluindo IgM1 e IgM2. IgA tem subclasses incluindo IgA1 e IgA2. Dentro de cadeias leves e pesadas humanas nativas, as regiões variáveis e constantes são normalmente unidas por uma região “J” de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada incluindo também uma região “D” de cerca de 10 ou mais aminoácidos. Vide, por exemplo, *Fundamental Immunology* (1989) Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y.).

[0059] Em um anticorpo nativo, as regiões variáveis normalmente apresentam a mesma estrutura geral na qual as regiões estruturais relativamente conservadas (FRs) são unidas por três regiões hipervariáveis, também denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs). As CDRs de duas cadeias de cada par normalmente são alinhadas pelas regiões estruturais, que lhe permitam ligar-se a um epítipo específico. Do terminal N para terminal C, duas regiões variáveis de cadeias leve e pesada normalmente compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. As CDRs de cadeia pesada são referidas como H1, H2 e H3, enquanto as CDRs de cadeia leve são referidas como L1, L2 e L3. Normalmente, a CDR3 é a maior fonte de diversidade molecular dentro do local de ligação ao antígeno. H3, por exemplo, em determinados casos, pode ser tão curto quanto dois resíduos de aminoácidos ou superior a 26. A atribuição de aminoácidos para cada domínio é, normalmente, de acordo com as definições de Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Publication Nº 91-3242, vols. 1-3, Bethesda, MD); Chothia, C., and Lesk, A.M., (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; ou Chothia, C. et al. *Nature* 342:878-883 (1989). No presente pedido, o

termo “CDR” refere-se a uma CDR de qualquer cadeia leve ou pesada, a menos que especificado de outra forma.

[0060] Um fragmento “Fab” compreende uma cadeia leve e a CH1 e a região variável de cadeia pesada. A cadeia pesada de uma molécula de Fab não pode formar uma ligação de dissulfeto com outra molécula de cadeia pesada. Um fragmento “Fab” compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada compreendendo a região constante adicional, que se estende entre os domínios de CH1 e CH2. Uma ligação de dissulfeto intercadeias pode ser formada entre duas cadeias pesadas de um fragmento Fab' para formar uma “molécula de F(ab')<sub>2</sub>”.

[0061] Um fragmento “Fv” compreende as regiões variáveis de ambas as cadeias leve e pesada, mas não possui regiões constantes. Um fragmento Fv (scFv) de cadeia única compreende regiões variáveis de cadeia leve e pesada ligadas por um ligante flexível para formar uma cadeia de polipeptídeo único com uma região de ligação ao antígeno. Anticorpos de cadeia única exemplares são discutidos em detalhes no WO 88/01649 e Patente US 4.946.778 e 5.260.203. Em determinados casos, uma única região variável (isto é, uma região variável de cadeia pesada ou uma região variável de cadeia leve) pode ter a capacidade de reconhecer e ligar o antígeno.

[0062] Neste documento, o termo “cadeia pesada” refere-se a um polipeptídeo compreendendo sequência de região variável de cadeia pesada suficiente para conferir especificidade antigênica sozinha ou em combinação com uma cadeia leve.

[0063] Neste documento, o termo “cadeia leve” refere-se a um polipeptídeo compreendendo sequência de região variável de cadeia leve suficiente para conferir especificidade antigênica sozinha ou em combinação com uma cadeia pesada.

#### 5.2.2. Anticorpos exemplares

[0064] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a NOTUM são fornecidos. Em algumas dessas modalidades, os

anticorpos monoclonais são anticorpos neutralizantes que reduzem pelo menos uma atividade de NOTUM *in vivo* ou *in vitro*.

[0065] Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM reduz a atividade de NOTUM em um ensaio *in vitro* de 8-octanoiloxipireno-1,3,6-trissulfonato trissódico (OPTS). Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM reduz a atividade de NOTUM em um ensaio *in vitro* de sinalização de Wnt.

[0066] Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM aumenta níveis séricos de PINP *in vivo* quando administrado a um indivíduo em quantidade suficiente e por uma duração suficiente. Dosagens exemplares e programas de dosagem para administração de uma quantidade suficiente de uma duração suficiente são discutidos neste documento. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM aumenta a densidade óssea mineral. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM aumenta a espessura cortical do eixo médio do fêmur *in vivo*. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM aumenta a área óssea do eixo médio do fêmur *in vivo*. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM aumenta a espessura cortical do eixo médio do úmero *in vivo*. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM aumenta a formação óssea endocortical *in vivo*. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM aumenta a proporção do volume ósseo cortical no corpo vertebral de LV5 *in vivo*. “A proporção do volume ósseo cortical no corpo vertebral de LV5” significa a proporção do volume ósseo cortical para o volume total do corpo vertebral de LV5. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM aumenta a proporção do volume ósseo do colo femoral para o volume total *in vivo*.

[0067] Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes que se ligam especificamente a NOTUM de camundongo são fornecidos. Em algumas

modalidades, anticorpos neutralizantes que se ligam especificamente a NOTUM de humano são fornecidos. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes que se ligam a uma região de Q47 para M177 de NOTUM de humano são fornecidos. Em algumas modalidades, os anticorpos neutralizantes que dependem de uma região de Q47 para M177 de NOTUM de humano para ligação são fornecidos. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes que se ligam especificamente à mesma região de NOTUM de espécies diferentes (ou seja, anticorpos que demonstram a reatividade cruzada) são fornecidos. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes que se ligam à NOTUM de humano e NOTUM de pelo menos uma espécie selecionada a partir de camundongo, rato, porquinho-da-índia, macaco cinomolgos, sagui e macaco rhesus, são fornecidos. Em algumas dessas modalidades, os anticorpos se ligam especificamente a ambas NOTUM de primatas não humanos e NOTUM de humano. Em algumas modalidades, os anticorpos se ligam especificamente a ambas NOTUM de camundongo e NOTUM de humano.

[0068] Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes que se ligam a uma região de NOTUM de humano de Q47 para M177 são fornecidos. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes que dependem de uma região de NOTUM de humano de Q47 para M177 para ligação são fornecidos. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM são fornecidos que se ligam a NOTUM quimérico de humano-camundongo (SEQ ID NO: 83) com uma afinidade que é pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, ou pelo menos 20 vezes mais forte do que a afinidade para o NOTUM quimérico de humano-camundongo (SEQ ID NO: 84). Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM são fornecidos que se ligam ao NOTUM quimérico de humano-camundongo-humano (SEQ ID NO: 85) com uma afinidade que é pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, ou pelo menos 20 vezes mais forte do que a afinidade NOTUM quimérico de camundongo-humano-camundongo (SEQ ID NO: 86). Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes



de NOTUM são fornecidos que se ligam a NOTUM de humano (SEQ ID NO: 1) com uma afinidade que é pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, ou pelo menos 20 vezes mais forte do que a afinidade para NOTUM D141S (SEQ ID NO: 94). Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM são fornecidos que se ligam a NOTUM de camundongo S148D (SEQ ID NO: 95) com uma afinidade que é pelo menos 5 vezes, pelo 10 vezes, ou pelo menos 20 vezes mais forte do que a afinidade para NOTUM de camundongo (SEQ ID NO: 2). Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes NOTUM são fornecidos que se ligam a NOTUM de humano (SEQ ID NO: 1) com uma afinidade que é pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, ou pelo menos 20 vezes mais forte do que a afinidade para NOTUM de humano R144A/R145A (SEQ ID NO: 99).

[0069] Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM se liga a NOTUM de humano (SEQ ID NO: 1) com uma afinidade (KD) de menos de 100 nM, menos de 50 nM, menos de 40 nM, menos de 30 nM, menos de 25 nM, menos de 20 nM, menos de 15 nM, menos de 10 nM, menos de 5 nM, menos de 3 nM, ou menos de 2 nM, determinada conforme descrito no Exemplo 6.8. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM tem uma IC<sub>50</sub> em um ensaio de OPTS de menos de 100 nM, menos de 75 nM, menos de 50 nM, menos de 40 nM, menos de 30 nM, menos de 25 nM, menos de 20 nM, menos de 15 nM, ou menos de 10 nM, conforme descrito no Exemplo 6.4.1. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTUM tem uma IC<sub>50</sub> em um ensaio de sinalização de Wnt de menos de 100 nM, menos de 75 nM, menos de 50 nM, menos de 40 nM, menos de 30 nM, menos de 25 nM, menos de 20 nM, menos de 15 nM, ou menos de 10 nM, conforme descrito no Exemplo 6.4.2. Em algumas modalidades, a IC<sub>50</sub> é para NOTUM de humano. Em algumas modalidades, a IC<sub>50</sub> é para NOTUM de camundongo.

[0070] Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes são anticorpos monoclonais não humanos. Em algumas dessas modalidades, anticorpos

neutralizantes são anticorpos monoclonais de roedores. Em algumas dessas modalidades, anticorpos neutralizantes são anticorpos monoclonais de camundongo. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes são os anticorpos monoclonais quiméricos. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes são os anticorpos monoclonais humanizados. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes são anticorpos monoclonais humanos. Em algumas modalidades, anticorpos quiméricos, humanizados, e/ou monoclonais humanos são úteis como anticorpos terapêuticos em seres humanos.

[0071] Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes são fragmentos de anticorpos. Fragmentos de anticorpos exemplares incluem, mas não estão limitados a Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fd, diacorpos e similares.

[0072] Anticorpos neutralizantes de NOTUM exemplares não limitantes incluem MAbs 1.731 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2,55 e 2,78. Cada um dos MAbs 1.731 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2,55 e 2,78 neutraliza, pelo menos uma atividade de NOTUM. Além disso, pelo menos MAbs 1.802, 1.815, 1.846 e 2,78 são dependentes de ligação a NOTUM em pelo menos uma porção da região de NOTUM de humano ligada por aminoácidos Q47 a M177. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compete para ligação a NOTUM com pelo menos um anticorpo selecionado a partir de MAbs 1.731, 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2.55, e 2.78. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM se liga a um epítipo de NOTUM que se sobrepõe pelo menos parcialmente com o epítipo ligado por pelo menos um anticorpo selecionado a partir de MAbs 1.731 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2,55 e 2,78. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante que compete para ligação a NOTUM com pelo menos um anticorpo selecionado a partir de MAbs 1.731, 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2.55 e 2.78 está previsto para ser um anticorpo neutralizante de NOTUM. As sequências das CDRs e regiões variáveis de MAbs 1.731 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2,55 e 2,78 são mostradas na seção 7,

abaixo.

[0073] Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM são fornecidos que se ligam ao mesmo epítopo ao qual Mab 1.731 se liga. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM são fornecidos que se ligam ao mesmo epítopo, ao qual MAb 1.802 se liga. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM são fornecidos que se ligam ao mesmo epítopo, ao qual MAb 1.815 se liga. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM são fornecidos que se ligam ao mesmo epítopo, ao qual MAb 1.846 se liga. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes NOTUM são fornecidos que se ligam ao mesmo epítopo, ao qual MAb 2.1029 se liga. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM são fornecidos que se ligam ao mesmo epítopo, ao qual MAb 2.55 se liga. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM são fornecidos que se ligam ao mesmo epítopo, ao qual MAb 2,78 se liga.

[0074] Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma região variável de cadeia pesada selecionada a partir de SEQ ID NOs: 7, 15, 23, 31, 39 e 47. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma região variável de cadeia leve selecionada a partir de SEQ ID NOs: 8, 16, 24, 32, 40 e 48. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma região variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 7 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 8. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma região variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 15 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma região variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 23 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 24. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante

de NOTUM compreende uma região variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 31 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 32. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma região variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 39 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 40. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma região variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 47 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 48.

[0075] Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma CDR1 de cadeia pesada selecionada a partir de SEQ ID NOs: 9, 17, 25, 33, 41, 49 e 90. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma CDR2 de cadeia pesada selecionada a partir de SEQ ID NOs: 10, 18, 26, 34, 42 e 50. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma CDR3 de cadeia pesada selecionada a partir de SEQ ID NOs: 11, 19, 27, 35, 43, 51 e 91. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 9, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 10, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 11. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 17 e 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 18 e uma CDR3 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 19 e 91. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 17, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 18, e uma CDR3 tendo a

sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 19. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 25 e 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 26, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 27. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 25, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 26, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 27. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 33 e 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34 e uma CDR3 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 35 e 91. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 33, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 35. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 41, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 42, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 43. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 49, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 50, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 51. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 57, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID

NO: 58, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 59. Em algumas modalidades, X1 na SEQ ID NO: 90 é selecionado a partir de Y e F. Em algumas modalidades, X2 na SEQ ID NO: 91 é selecionado a partir de H e N.

[0076] Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma CDR1 de cadeia leve selecionada a partir de SEQ ID NOs: 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60 e 92. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma CDR2 de cadeia leve selecionada a partir de SEQ ID NOs: 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61 e 93. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma CDR3 de cadeia leve selecionada a partir de SEQ ID NOs: 14, 22, 30, 38, 46, 54 e 62. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 12, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 13, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 14. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 20 e 92, uma CDR2 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NO: 21 e 93 e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 22. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 20, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 21, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 22. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 28 e 92, uma CDR2 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 29 e 93 e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 30. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve

compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 28, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 29, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 30. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 36 e 92, uma CDR2 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 37 e 93 e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 38. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 36, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 37, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 38. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 44, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 45, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 52, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 53, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 54. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 60, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 61, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 62. Em algumas modalidades, X3 na SEQ ID NO: 92 é selecionado a partir de I e S; X4 na SEQ ID NO: 92 é selecionado a partir de T e E; e X5 na SEQ ID NO: 92 é selecionado a partir de M e I. Em algumas modalidades, X6 na SEQ ID NO: 93 é selecionado a partir de D e N.

[0077] Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de

aminoácidos SEQ ID NO: 9, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 10, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 11; e uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 12, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 13, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 14. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 17 e 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 18 e uma CDR3 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 19 e 91; e uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 20 e 92, uma CDR2 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 21 e 93 e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 22. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 17, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 18, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 19; e uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 20, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 21, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 22. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 25 e 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 26, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 27; e uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 28 e 92, uma CDR2 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 29 e 93 e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 30. Em algumas



modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 25, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 26, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 27; e uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 28, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 29, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 30. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 33 e 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34 e uma CDR3 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 35 e 91; e uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 36 e 92, uma CDR2 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 37 e 93 e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 38. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 33, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 35; e uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 36, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 37, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 38. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 41, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 42, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 43; e uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 44, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 45, e uma CDR3 tendo a sequência de

aminoácidos SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 49, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 50, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 51; e uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 52, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 53, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 54. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 57, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 58, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 59; e uma cadeia leve compreendendo uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 60, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 61, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 62. Em algumas modalidades, Xx na SEQ ID NO: 90 é selecionado a partir de Y e F. Em algumas modalidades, X2 na SEQ ID NO: 91 é selecionado a partir de H e N. Em algumas modalidades, X3 SEQ ID NO: 92 é selecionado a partir de I e S; X4 na SEQ ID NO: 92 é selecionado a partir de T e E; e X5 SEQ ID NO: 92 é selecionado a partir de M e L. Em algumas modalidades, X6 na SEQ ID NO: 93 é selecionado a partir de D e N.

[0078] Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM que se ligam especificamente a NOTUM de humano são fornecidos. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM especificamente se ligam ao mesmo epítipo em NOTUM de espécies diferentes (ou seja, anticorpos que demonstram a reatividade cruzada) são fornecidos. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM que se ligam especificamente a NOTUM de humano e também especificamente se ligam a pelo menos uma espécie de NOTUM selecionado a partir de camundongo, rato, porquinho-da-índia, macaco cinomolgos,

sagui e macaco rhesus são fornecidos. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM que se ligam especificamente a NOTUM de humano e NOTUM de pelo menos uma espécie de primatas não humanos são fornecidos. Em algumas modalidades, anticorpos neutralizantes de NOTUM que se ligam especificamente a NOTUM de humano e NOTUM de camundongo são fornecidos.

#### 5.2.2.1. Anticorpos monoclonais quimerizados e humanizados

[0079] Em algumas modalidades, anticorpos não humanos são quimerizados. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais de camundongo que se ligam especificamente a NOTUM de humano são quimerizados. Determinados métodos exemplares para produzir anticorpos quiméricos são fornecidos, por exemplo, em Morrison et al. (1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608; Takeda et al. (1985) Nature 314:452-454; e Patentes US 6.075.181 e 5.877.397.

[0080] Em algumas modalidades, anticorpos não humanos são “humanizados”. Em algumas modalidades, anticorpos monoclonais de camundongo que se ligam especificamente a NOTUM de humano são humanizados. Em algumas modalidades, anticorpos monoclonais de camundongo elevados contra NOTUM de camundongo, mas que especificamente ligam-se (ou seja, reatividade cruzada) com NOTUM de humano, são humanizados. Em algumas modalidades, anticorpos humanizados retêm sua especificidade de ligação e têm imunogenicidade reduzida (por exemplo, resposta reduzida a anticorpo anticamundongo humano (HAMA)) quando administrados a um humano. Em algumas modalidades, a humanização é feita por métodos incluindo enxerto de CDR e engenharia humana, conforme descrito em detalhes abaixo.

[0081] Em algumas modalidades de anticorpos humanizados, uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) das regiões variáveis de cadeias leve e pesada de um anticorpo com a especificidade de ligação desejada (o

anticorpo “doador”) são enxertadas em regiões estruturais humanas (FRs) em um anticorpo “receptor”. O enxerto de CDR exemplar é descrito, por exemplo, nas Patentes US 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, e 5.530.101; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033. Em algumas modalidades, uma ou mais CDRs de regiões variáveis de cadeias leve e pesada são enxertadas em FRs humanas de consenso em um anticorpo receptor. Para criar FRs humanas de consenso, em algumas modalidades, FRs de diversas sequências de aminoácidos de cadeia leve ou cadeia pesada estão alinhadas para identificar uma sequência de aminoácido de consenso.

[0082] Em algumas modalidades, determinados aminoácidos de FR no anticorpo receptor são substituídos por aminoácidos de FR de anticorpo doador. Em algumas dessas modalidades, aminoácidos de FR de anticorpo doador são aminoácidos que contribuem para a afinidade do anticorpo doador para o antígeno alvo. Vide, por exemplo, Patentes US 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089 e 5.530.101; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Sci. USA 86:10029-10033. Em algumas modalidades, programas de computador são usados para anticorpos doador e/ou receptor de modelagem para identificar resíduos que possam estar envolvidos no antígeno de ligação e/ou contribuir para a estrutura do local de ligação ao antígeno, contribuindo assim na seleção de resíduos, tais como resíduos de FR, a serem substituídos no anticorpo doador.

[0083] Em algumas modalidades, CDRs de um anticorpo doador são enxertadas em um anticorpo receptor compreendendo uma região constante humana. Em algumas dessas modalidades, FRs também são enxertadas no receptor. Em algumas modalidades, CDRs de um anticorpo doador são derivadas de um anticorpo de Fv de cadeia única. Em algumas modalidades, FRs de um anticorpo doador são derivadas de um anticorpo de Fv de cadeia única. Em algumas modalidades, CDRs enxertadas em um anticorpo humanizado são adicionalmente modificadas (por

exemplo, por substituições, deleções ou inserções de aminoácido) para aumentar a afinidade do anticorpo humanizado para o antígeno alvo. Em algumas modalidades, FRs enxertadas em um anticorpo humanizado são modificadas (por exemplo, por substituições, deleções ou inserções de aminoácido) para aumentar a afinidade do anticorpo humanizado para o antígeno alvo.

[0084] Em algumas modalidades, anticorpos não humanos podem ser humanizados usando um método de “engenharia humana”. Vide, por exemplo, Patentes US 5.766.886 e 5.869.619. Em algumas modalidades da engenharia humana, a informação na estrutura dos domínios variáveis de anticorpo (por exemplo, a informação obtida de estruturas cristalinas e/ou modelagem molecular) é usada para avaliar a probabilidade de um resíduo de aminoácido determinado em uma região variável estar (a) envolvido na ligação de antígeno, (b) exposto na superfície do anticorpo (ou seja, acessível ao solvente), ou (c) enterrado dentro da região variável do anticorpo (ou seja, envolvido na manutenção da estrutura da região variável). Além disso, em algumas modalidades, sequências de consenso da região variável humana são geradas para identificar resíduos que são conservados entre regiões variáveis humanas. Em algumas modalidades, tal informação fornece orientação sobre se um resíduo de aminoácido na região variável de um anticorpo não humano deve ser substituído.

[0085] Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM humanizado compreende uma cadeia pesada compreendendo pelo menos uma de CDR1, CDR2 e CDR3 de um anticorpo selecionado a partir de MAbs 1.731, 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2.55 e 2.78. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo CDR1, CDR2 e CDR3 de um anticorpo selecionado a partir de MAbs 1.731, 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2.55 e 2.78. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo pelo menos uma de CDR1,

CDR2 e CDR3 de um anticorpo selecionado de MAbs 1.731 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2.55 e 2.78. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo CDR1, CDR2 e CDR3 de um anticorpo selecionado de MAbs 1.731 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2.55 e 2.78. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada e CDR1, CDR2, e CDR3 de cadeia leve de um anticorpo selecionado de MAbs 1.731 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2.55 e 2.78.

[0086] Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 63, 67, 71, 75 e 79. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 64, 68, 72, 76 e 80. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 65, 69, 73, 77 e 81. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 66, 70, 74, 78 e 82. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 63 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 65. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 67 e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 69. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 71 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 73. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma

cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 75 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 77. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 79 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 81. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 64 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 66. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada, compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 68 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 70. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 72 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 74. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 76 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 78. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 80 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 82.

#### 5.2.2.2. Isotipos de anticorpo

[0087] Em algumas modalidades, um anticorpo contra NOTUM é de qualquer isotipo selecionado a partir de IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Em algumas modalidades, um anticorpo contra NOTUM é o isotipo IgG. Em algumas dessas modalidades, um anticorpo é da subclasse IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em algumas modalidades, um anticorpo contra NOTUM é o isotipo IgM. Em algumas dessas modalidades, um anticorpo é da subclasse IgM1 ou IgM2. Em algumas modalidades, um anticorpo

contra NOTUM é o isotipo IgA. Em algumas dessas modalidades, um anticorpo é da subclasse IgA1 ou IgA2. Um anticorpo contra NOTUM pode compreender uma região constante de cadeia leve de lambda ou kappa de, por exemplo, qualquer origem humana ou de camundongo. Em algumas modalidades, um anticorpo contra NOTUM compreende uma região constante de cadeia leve kappa humana e uma região constante de cadeia pesada de IgG1, IgG2 ou IgG4 humana. Em algumas modalidades, um anticorpo contra NOTUM compreende uma cadeia leve de kappa de camundongo e uma cadeia pesada de IgG1 ou IgG2 de camundongo.

#### 5.2.2.3. Anticorpos modificados

[0088] Em algumas modalidades, um anticorpo é modificado para alterar uma ou mais das suas propriedades. Em algumas modalidades, um anticorpo modificado pode possuir vantagens sobre um anticorpo não modificado, tais como estabilidade aumentada, tempo aumentado em circulação ou imunogenicidade reduzida (vide, por exemplo, Patente US 4.179.337). Em algumas modalidades, um anticorpo é modificado ligando-o a grupo não proteináico. Em algumas modalidades, um anticorpo é modificado, alterando o estado de glicosilação do anticorpo, por exemplo, alterando o número, tipo, ligação e/ou posição das cadeias de carboidrato no anticorpo. Em algumas modalidades, um anticorpo é alterado de modo que ele não seja glicosilado.

[0089] Em algumas modalidades, uma ou mais porções químicas estão ligadas à estrutura principal do aminoácido e/ou resíduos de carboidrato do anticorpo. Determinados métodos exemplares para ligar uma porção química a um anticorpo são conhecidos por aqueles versados na técnica. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a reações de acilação ou reações de alquilação. Vide, por exemplo, EP 0 401 384; Malik et al. (1992), Exp. Hematol., 20:1028-1035; Francis (1992) Focus on Growth Factors 3(2):4-10, publicado por Mediscript, Mountin Court, Friern Barnet Lane, London N20 OLD, UK; EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; WO 95/34326; WO 95/13312; WO 96/11953; WO 96/19459 e WO 96/19459. Em algumas



modalidades, qualquer uma destas reações é usada para gerar um anticorpo que é quimicamente modificado no seu terminal amino.

[0090] Em algumas modalidades, um anticorpo é ligado a um marcador detectável, tal como um marcador enzimático, fluorescente, isotópico ou de afinidade. Em algumas dessas modalidades, um marcador detectável permite a detecção ou isolamento do anticorpo. Em algumas modalidades, um marcador detectável permite a detecção de antígeno ligado pelo anticorpo.

[0091] Em algumas modalidades, um anticorpo é modificado, ligando-o a um ou mais polímeros. Em algumas modalidades, um anticorpo é ligado a um ou mais polímeros solúveis em água. Em algumas dessas modalidades, ligação a um polímero solúvel em água reduz a probabilidade de que o anticorpo precipite em um ambiente aquoso, tal como um ambiente fisiológico. Em algumas modalidades, um anticorpo terapêutico é ligado a um polímero solúvel em água. Em algumas modalidades, uma pessoa versada na técnica pode selecionar um polímero solúvel em água adequado com base em considerações inclusive se o conjugado anticorpo/polímero será usado no tratamento de um paciente e, em caso afirmativo, o perfil farmacológico do anticorpo (por exemplo, meia-vida, dosagem, atividade, antigenicidade, ou outros fatores).

[0092] Determinados polímeros clinicamente aceitáveis, solúveis em água exemplares incluem, mas não estão limitados a, polietileno glicol (PEG); polietileno glicol propionaldeído; copolímeros de etileno glicol/propileno glicol; monometóxi-polietileno glicol; carboximetilcelulose; dextrano; álcool polivinílico (PVA); polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano; poli-1,3,6-trioxano; copolímero de anidrido maleico/etileno; poli- $\beta$ -aminoácidos (homopolímeros ou copolímeros aleatórios); poli(n-vinil pirrolidona)polietileno glicol; homopolímeros de polipropileno glicol (PPG) e outros óxidos de polialquileno; copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno; polióis polioxietilados (POG) (por exemplo, glicerol) e outros polióis polioxietilados;

sorbitol polioxietilado, glicose polioxietilada, ácidos colônicos ou outros polímeros de carboidratos; e Ficoll, dextrano ou misturas dos mesmos. Determinados PEGs exemplares incluem, mas não estão limitados a determinadas formas conhecidas da técnica por serem úteis na modificação de anticorpos, tal como mono-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alcóxi- ou arilóxi-PEG. Em algumas modalidades, PEG propionaldeído pode ter vantagens na fabricação devido à sua estabilidade na água.

[0093] Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água é de qualquer peso molecular. Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água é ramificado ou não ramificado. Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água tem um peso molecular médio de cerca de 2 kDa a cerca de 100 kDa, incluindo todos os pontos entre os pontos de extremidade do intervalo. Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água tem um peso molecular médio de cerca de 5 kDa a cerca de 40 kDa. Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água tem um peso molecular médio de cerca de 10 kDa a cerca de 35 kDa. Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água tem um peso molecular médio de cerca de 15 kDa a cerca de 30 kDa.

[0094] Em algumas modalidades, um anticorpo está ligado ao polietilenoglicol (PEG; isto é, um anticorpo é “peguilado”). Em diversas modalidades, PEG tem baixa toxicidade em mamíferos. Vide, Carpenter et al. (1971) Toxicol Appl. Pharmacol., 18:35-40. Notavelmente, um PEG aduto de adenosina desaminase foi aprovado nos Estados Unidos para uso em seres humanos para o tratamento da síndrome de imunodeficiência combinada grave. Em diversas modalidades, PEG pode reduzir a imunogenicidade de anticorpos. Por exemplo, em algumas modalidades, a ligação de PEG a um anticorpo tendo sequências não humanas pode reduzir a antigenicidade de tais anticorpos quando administrado a um humano.

[0095] Em algumas modalidades, um polímero está ligado a um ou mais resíduos de aminoácidos reativos em um anticorpo. Determinados resíduos de

aminoácido reativos exemplares incluem, mas não estão limitados a, grupo alfa-amino do aminoácido de terminal amino, grupos de amino de épsilon de cadeias laterais de lisina, grupos sulfidríla de cadeias laterais de cisteína, grupos carboxila de cadeias laterais de aspartil e glutamil, grupo alfa-carboxila do terminal carbóxi do aminoácido, cadeias laterais de tirosina, e cadeias de glicosila ativadas ligadas a determinados resíduos de asparagina, serina ou treonina. Determinadas formas ativadas de PEG exemplares (“reagentes de PEG”) adequadas para reação direta com proteínas são conhecidas por aqueles versados na técnica. Por exemplo, em algumas modalidades, reagentes de PEG adequados para ligação a grupos amino incluem, mas não estão limitados a, ésteres ativos de ácido carboxílico ou derivados de carbonato de PEG, por exemplo, aqueles em que os grupos de saída são N-hidroxissuccinimida, p-nitrofenol, imidazol ou l-hidróxi-2-nitrobenzeno-4-sulfonato. Em algumas modalidades, reagentes de PEG contendo grupos maleimido ou haloacetila são usados para modificar grupos tióis. Em algumas modalidades, reagentes de PEG contendo grupos amino, hidrazina e/ou hidrazida podem ser usados em reações com aldeídos gerados por oxidação de periodato dos grupos de carboidratos em proteínas.

[0096] Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água tem pelo menos um grupo reativo. Em algumas modalidades, um derivado ativado de um polímero solúvel em água, tal como PEG, é criado reagindo o polímero solúvel em água com um grupo de ativação. Em algumas modalidades, um grupo de ativação pode ser monofuncional, bifuncional ou multifuncional. Determinados grupos de ativação exemplares que podem ser usados para ligar um polímero solúvel em água a dois ou mais anticorpos incluem, mas não estão limitados aos seguintes grupos: sulfona (por exemplo, clorossulfona, vinilsulfona e divinilsulfona), maleimida, sulfidríla, tiol, triflato, tresilato, azidirina, oxirano e 5-piridila. Em algumas modalidades, um derivado de PEG é normalmente estável contra hidrólise por períodos prolongados em ambientes aquosos em pHs de cerca de 11 ou menos. Em algumas modalidades,

um derivado de PEG ligado à outra molécula, tal como um anticorpo, confere estabilidade da hidrólise sobre essa molécula. Determinados derivados de PEG homobifuncionais incluem, mas não estão limitados a PEG-bis-clorossulfona e PEG-bis-vinilsulfona (vide WO 95/13312).

#### 5.2.3. Determinados métodos para produzir anticorpos monoclonais

##### 5.2.3.1. Determinados métodos de hibridoma

[0097] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais são produzidos por técnicas convencionais. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais são produzidos por métodos baseados em hibridoma. Alguns desses métodos são conhecidos por aqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Kohler et al. (1975) Nature 256:495-497; Harlow e Lane (1988): Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 6 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Em algumas dessas modalidades, um animal adequado, tal como um camundongo, rato, hamster, macaco ou outro mamífero, é imunizado com um imunogênio para produzir células secretoras de anticorpos. Em algumas modalidades, as células secretoras de anticorpos são células B, tais como linfócitos ou esplenócitos. Em algumas modalidades, linfócitos (por exemplo, linfócitos humanos) são imunizados *in vitro* para gerar células secretoras de anticorpos. Vide, por exemplo, Borreback et al. (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:3995-3999.

[0098] Em algumas modalidades, células secretoras de anticorpo são fundidas com uma linhagem celular "imortalizada", tal como uma linhagem celular tipo mieloide, para produzir células de hibridoma. Em algumas modalidades, as células de hibridoma que produzem os anticorpos desejados são identificadas, por exemplo, por ELISA. Em algumas modalidades, essas células podem então ser subclonadas e cultivadas usando métodos padrão. Em algumas modalidades, essas células podem também ser cultivadas *in vivo* como tumores de ascite em um hospedeiro animal adequado. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais são isolados do

meio de cultura de hibridoma, soro ou líquido de ascite, usando procedimentos de separação padrão, tais como a cromatografia de afinidade. Orientação para a produção de hibridomas e a purificação de anticorpos monoclonais de acordo com determinadas modalidades é fornecida, por exemplo, em Harlow and Lane (1988): Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 8 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0099] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais de camundongo são produzidos imunizando camundongos geneticamente modificados com um imunogênio. Em algumas dessas modalidades, os camundongos são camundongos deficientes em NOTUM, parcialmente ou completamente sem função de NOTUM. Em algumas dessas modalidades, os camundongos são camundongos “nocaute” carentes total ou parcial de um gene que codifica o NOTUM. Em algumas modalidades, esses camundongos nocaute são imunizados com NOTUM de camundongo. Em algumas modalidades, esses camundongos nocaute são imunizados com NOTUM de humano.

[00100] Em algumas modalidades, anticorpos monoclonais humanos são gerados em animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes de produzir anticorpos humanos. Vide, por exemplo, Patentes US 6.075.181 A e 6.114.598 A; e WO 98/24893 A2. Por exemplo, em algumas modalidades, genes de imunoglobulina humana são introduzidos (por exemplo, usando cromossomos artificiais de levedura, fragmentos do cromossomo humano, ou integração da linhagem germinativa) em camundongos, em que os genes Ig endógenos têm sido inativados. Vide, por exemplo, Jakobovits et al. (1993) Nature 362:255-258; Tomizuka et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:722-727; e Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156 (descrevendo a linhagem XenoMouse II® de camundongos transgênicos).

[00101] Em algumas modalidades, esses camundongos transgênicos são imunizados com um imunogênio. Em algumas dessas modalidades, células linfáticas

(tais como células B) dos camundongos que expressam anticorpos são obtidas. Em algumas dessas modalidades, tais células recuperadas são fundidas com uma linhagem celular “imortalizada”, tal como uma linhagem celular tipo mieloide, para produzir células de hibridoma. Em algumas dessas modalidades, células de hibridoma são rastreadas e selecionadas para identificar aquelas que produzem anticorpos específicos para o antígeno de interesse. Determinados métodos exemplares e camundongos transgênicos adequados para a produção de anticorpos monoclonais humanos são descritos, por exemplo, em Jakobovits et al. (1993) Nature 362:255-258; Jakobovits (1995) Curr Opin. Biotechnol. 6:561-566; Lonberg et al. (1995) Int'l Rev. Immunol. 13:65-93; Fishwild et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:845-851; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156; Green (1999) J. Immunol. Methods 231:11-23; Tomizuka et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:722-727; e revistos em Little et al. (2000) Immunol. Today 21:364-370; e WO 98/24893. Em algumas modalidades, anticorpos monoclonais humanos contra NOTUM são adequados para uso como anticorpos terapêuticos. Vide Parte V.G., abaixo.

#### 5.2.3.2. Determinados métodos baseados em exibição

[00102] Em algumas modalidades, anticorpos monoclonais humanos são produzidos usando um método baseado em exibição, tal como, por exemplo, qualquer um dos descritos abaixo.

[00103] Em algumas modalidades, um anticorpo monoclonal é produzido usando técnicas de exibição de fago. Diversos métodos de exibição de fago de anticorpo são conhecidos por aqueles versados na técnica e descritos, por exemplo, em Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, de Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O' Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ). Por exemplo, em algumas modalidades, uma biblioteca de anticorpos é exibida na superfície de um fago filamentoso, tal como o fago filamentoso não lítico fd ou M13.

Em algumas modalidades, os anticorpos são fragmentos de anticorpos, tais como scFvs, Fabs, Fvs com uma ligação de dissulfeto intermolecular engenheirada para estabilizar o par de VH-VL, e diacorpos. Em algumas modalidades, anticorpos com a especificidade de ligação desejada, em seguida, podem ser selecionados. Modalidades não limitantes exemplares de métodos de exibição de fago de anticorpo são descritas em mais detalhes abaixo.

[00104] Em algumas modalidades, uma biblioteca de exibição de fago de anticorpo pode ser preparada usando determinados métodos conhecidos para aqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, from Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O' Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ). Em algumas modalidades, repertórios de gene variáveis são preparados por amplificação por PCR de DNA genômico ou cDNA derivado de mRNA de células secretoras de anticorpos. Por exemplo, em algumas modalidades, cDNA é preparado a partir de mRNA de células B. Em algumas modalidades, cDNA codificando as regiões variáveis de cadeias leve e pesada é amplificado, por exemplo, por PCR.

[00105] Em algumas modalidades, cDNA de cadeia pesada e cDNA de cadeia leve são clonados em um vetor adequado. Em algumas modalidades, cDNA de cadeia pesada e cDNA de cadeia leve são combinados aleatoriamente durante o processo de clonagem, assim resultando no conjunto de uma biblioteca de cDNA codificando diversas scFvs ou Fabs. Em algumas modalidades, cDNA de cadeia pesada e cDNA de cadeia leve são ligados antes de serem clonados em um vetor adequado. Em algumas modalidades, cDNA de cadeia pesada e cDNA de cadeia leve são ligados pela gradual clonagem em um vetor adequado.

[00106] Em algumas modalidades, cDNA é clonado em um vetor de exibição de fago, tal como um vetor de fagemídeo. Determinados vetores de fagemídeo

exemplares, tal como pCESI, são conhecidos por aqueles versados na técnica. Em algumas modalidades, cDNA codificando ambas as cadeias leve e pesada está presente no mesmo vetor. Por exemplo, em algumas modalidades, cDNA codificando scFvs é clonado na estrutura com todos ou uma porção de gene III, que codifica a menor proteína de revestimento de fago. Em algumas dessas modalidades, um fagemídeo direciona a expressão da fusão de scFv-pIII na superfície do fago. Alternativamente, em algumas modalidades, cDNA codificando cadeia pesada (ou cadeia leve) é clonado na estrutura com todos ou uma parte do gene III e cDNA codificando cadeia leve (ou cadeia pesada) é clonado a jusante de uma sequência sinal do mesmo vetor. A sequência sinal direciona a expressão de cadeia leve (ou cadeia pesada) no periplasma da célula hospedeira, onde cadeias leve e pesada montam em fragmentos Fab. Alternativamente, em algumas modalidades, cDNA codificando cadeia pesada e cDNA codificando cadeia leve estão presentes em vetores separados. Em determinadas modalidades, cDNA de cadeia pesada e cadeia leve é clonado, separadamente, um em um fagemídeo e o outro em um vetor do fago, que contêm sinais de recombinação *in vivo* na célula hospedeira.

[00107] Em algumas modalidades, vetores de fago ou fagemídeo recombinantes são introduzidos em um hospedeiro bacteriano adequado, tal como *E. coli*. Em algumas modalidades usando fagemídeo, o hospedeiro está infectado com fago auxiliar para fornecer proteínas estruturais do fago, assim permitindo a expressão de partículas de fago carregando a proteína de fusão de anticorpo-pIII na superfície do fago.

[00108] Em algumas modalidades, bibliotecas de anticorpo “sintéticas” são construídas usando os repertórios de genes variáveis que são reorganizados *in vitro*. Por exemplo, em algumas modalidades, segmentos de gene individuais codificando cadeia leve ou pesada (V-D-J ou V-J, respectivamente) são aleatoriamente combinados usando PCR. Em algumas modalidades, a diversidade de sequência



adicional pode ser introduzida em CDRs e possivelmente FRs, por exemplo, por PCR propensa a erro. Em algumas dessas modalidades, a diversidade de sequência adicional é introduzida na CDR3, por exemplo, H3 de cadeia pesada.

[00109] Em algumas modalidades, bibliotecas de exibição de fago “naive” ou “universais” são construídas conforme descrito acima, usando o ácido nucleico de um animal não imunizado. Em algumas modalidades, o animal não imunizado é um humano. Em algumas modalidades, bibliotecas de exibição de fago “imunizadas” são construídas conforme descrito acima, usando o ácido nucleico de um animal imunizado. Em algumas modalidades, o animal imunizado é um humano, rato, camundongo, hamster ou macaco. Em algumas dessas modalidades, os animais são imunizados com qualquer um dos imunogênios descritos abaixo.

[00110] Determinadas bibliotecas de exibição de fago de anticorpo humano universais exemplares estão disponíveis a partir de fontes comerciais. Determinadas bibliotecas exemplares incluem, mas não estão limitadas a, série de HuCAL<sup>®</sup> de bibliotecas de MorphoSys AG (Martinstreid/Munich, Germany); bibliotecas de Crucell (Leiden, the Netherlands) usando MAbstract<sup>®</sup> technology; biblioteca de Fab n-CoDeR<sup>™</sup> de BioInvent (Lund, Sweden); e bibliotecas disponíveis a partir de Cambridge Antibody Technology (Cambridge, UK).

[00111] Em algumas modalidades, a seleção de anticorpos tendo a especificidade de ligação desejada de uma biblioteca de exibição de fago é feita por etapas de filtração sucessivas. Em algumas modalidades de filtração, preparações de fago de biblioteca são expostas ao antígeno. Em algumas dessas modalidades, os complexos de antígeno-fago são lavados, e o fago não ligado é descartado. Em algumas dessas modalidades, o fago ligado é recuperado e posteriormente amplificado infectando *E. coli*. Em determinadas modalidades, fago de produção de anticorpos monoclonais pode ser clonado selecionando placas únicas. Em algumas modalidades, o processo acima se repete.

[00112] Em algumas modalidades, o antígeno usado na filtração é qualquer um dos imunogênios descritos abaixo. Em algumas modalidades, o antígeno é imobilizado em um suporte sólido para permitir que a purificação do fago de ligação ao antígeno por cromatografia de afinidade. Em algumas modalidades, o antígeno é biotinilado, permitindo assim a separação do fago ligado do fago não ligado usando grânulos magnéticos revestidos por estreptavidina. Em algumas modalidades, o antígeno pode ser imobilizado em células (para filtração direta), em criossecções de tecido, ou em membranas (por exemplo, membranas de náilon ou nitrocelulose). Outras variações de determinados procedimentos de filtração podem ser determinadas rotineiramente por uma pessoa versada na técnica.

[00113] Em algumas modalidades, um sistema de exibição de levedura é usado para produzir anticorpos monoclonais. Em alguns desses sistemas, um anticorpo é expresso como uma proteína de fusão com toda ou uma porção da proteína de levedura AGA2, que se torna exibida na superfície da parede celular da levedura. Em determinadas tais modalidades, células de levedura expressando anticorpos com a especificidade de ligação desejada, em seguida, podem ser identificadas por exposição das células para antígeno marcado de forma fluorescente. Em determinadas tais modalidades, células de levedura que ligam o antígeno, em seguida, podem ser isoladas por citometria de fluxo. Vide, por exemplo, Boder et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15:553-557.

#### 5.2.3.3. Determinados métodos de maturação de afinidade

[00114] Em algumas modalidades, a afinidade de um anticorpo para um antígeno específico é aumentada, submetendo o anticorpo à maturação de afinidade (ou “evolução direcionada”), *in vitro*, *in vivo*, anticorpos nativos sofrem maturação de afinidade através de hipermutação somática, seguida pela seleção. Alguns métodos *in vitro* imitam esse processo *in vivo*, permitindo a produção de anticorpos, tendo afinidades que igualar ou superar as de anticorpos nativos.

[00115] Em algumas modalidades da maturação de afinidade, mutações são introduzidas em uma sequência de ácido nucleico codificando a região variável de um anticorpo com a especificidade de ligação desejada. Vide, por exemplo, Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; Brekke et al. (2002) Nat. Reviews 2:52-62. Em algumas modalidades, as mutações são introduzidas na região variável de cadeia pesada, cadeia leve ou de ambas. Em algumas modalidades, as mutações são introduzidas nas uma ou mais CDRs. Em algumas dessas modalidades, mutações são introduzidas em H3, L3 ou em ambas. Em algumas modalidades, mutações são introduzidas em uma ou mais FRs. Em algumas modalidades, uma biblioteca de mutações é criada, por exemplo, em uma biblioteca de exibição de fago, ribossoma, ou levedura de modo que os anticorpos com maior afinidade possam ser identificados por métodos de rastreio padrão. Vide, por exemplo, Boder et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:10701-10705; Foote et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:10679-10681; Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, de Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O' Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ); e Hanes et al. (1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:14130-14135.

[00116] Em algumas modalidades, as mutações são introduzidas por mutagêneses de local específico com base em informações sobre a estrutura do anticorpo, por exemplo, o local de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, mutações são introduzidas usando mutagênese combinatória de CDRs. Em algumas modalidades, toda ou uma porção da sequência de codificação de região variável é aleatoriamente mutagenizada, por exemplo, usando células de modificador de E. coli, rearranjo de gene homólogo ou PCR propensa a erro. Em algumas modalidades, as mutações são introduzidas usando “embaralhamento de DNA” (“DNA shuffling”). Vide, por exemplo, Cramer et al. (1996) Nat. Med. 2:100-102; Fermer et al. (2004) Tumor Biol. 25:7-13.

[00117] Em algumas modalidades, “embaralhamento de cadeia” é usado para gerar anticorpos com afinidade aumentada. Em algumas modalidades de embaralhamento de cadeia, uma das cadeias, por exemplo, a cadeia leve, é substituída por um repertório de cadeia leve, enquanto a cadeia, por exemplo, a cadeia pesada, não é alterada, assim fornecendo a especificidade. Em algumas dessas modalidades, uma biblioteca de anticorpos embaralhados de cadeia é criada, em que a cadeia pesada inalterada é expressa em combinação com cada cadeia leve do repertório de cadeias leves. Em algumas modalidades, essas bibliotecas podem então ser rastreadas para anticorpos com afinidade aumentada. Em algumas modalidades, ambas as cadeias leve e pesada são sequencialmente substituídas. Em algumas modalidades, apenas as regiões variáveis de cadeia leve e/ou pesada são substituídas. Em algumas modalidades, apenas uma porção das regiões variáveis, por exemplo, CDRs, de cadeias leve e/ou pesada são substituídas. Vide, por exemplo, Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; Brekke et al. (2002) Nat. Reviews 2:52-62; Kang et al. (1991) Proc. Nat’l Acad. Sci. USA 88: 11120-11123; Marks et al. (1992) Biotechnol. 10:779-83.

[00118] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais de camundongo que se ligam especificamente a NOTUM de humano (incluindo anticorpos monoclonais de camundongo elevados contra NOTUM de camundongo, mas que se ligam especificamente (isto é, reatividade cruzada) com NOTUM de humano) são submetidos ao embaralhamento de cadeia sequencial. Em algumas modalidades, por exemplo, a cadeia pesada de um determinado anticorpo monoclonal de camundongo é combinada com um novo repertório de cadeias leves humanas, e anticorpos com a afinidade desejada são selecionados. Em determinadas tais modalidades, as cadeias leves dos anticorpos selecionados são então combinadas com um novo repertório de cadeias pesadas humanas, e anticorpos com a afinidade desejada são selecionados. Desse modo, em algumas modalidades, anticorpos

humanos, tendo a especificidade de ligação ao antígeno desejada e afinidade, são selecionados.

[00119] Alternativamente, em algumas modalidades, a cadeia pesada de um determinado anticorpo monoclonal de camundongo é combinada com um novo repertório de cadeias leves humanas, e anticorpos com a afinidade desejada são selecionados a partir desta primeira rodada de embaralhamento. Em algumas modalidades, a cadeia leve do anticorpo monoclonal de camundongo original é combinada com um novo repertório de cadeias pesadas humanas, e anticorpos com a afinidade desejada são selecionados a partir desta segunda rodada de embaralhamento. Em algumas modalidades, cadeias leves humanas de anticorpos selecionados na primeira rodada de embaralhamento são então combinadas com cadeias pesadas humanas dos anticorpos selecionados na segunda rodada de embaralhamento. Desse modo, em algumas modalidades, anticorpos humanos, tendo uma especificidade de ligação ao antígeno desejada e afinidade, são selecionados.

[00120] Em algumas modalidades, é utilizado um método de “exibição de ribossoma” que alterna a seleção do anticorpo com maturação de afinidade. Em algumas modalidades de um método de exibição do ribossoma, ácido nucleico codificando anticorpo é amplificado por RT-PCR, entre as etapas de seleção. Desse modo, em algumas modalidades, polimerases propensas a erro podem ser usadas para introduzir mutações no ácido nucleico. Um exemplo não limitante de tal método é descrito em detalhes em Hanes et al. (1998) Proc Nat'l Acad. Sci. USA 95:14130-14135.

#### 5.2.3.4. Determinados métodos recombinantes

[00121] Em algumas modalidades, um anticorpo monoclonal é produzido por técnicas recombinantes. Vide, por exemplo, Patente US 4.816.567. Em algumas dessas modalidades, cadeias de anticorpo monoclonal codificando ácido nucleico são clonadas e expressas em uma célula hospedeira adequada. Por exemplo, em

algumas modalidades, RNA pode ser preparado a partir de células expressando o anticorpo desejado, tais como células B maduras ou células de hibridoma, usando métodos padrão. Em algumas modalidades, o RNA, então pode ser usado para produzir cDNA usando métodos padrão. Em algumas modalidades, cDNA codificando um polipeptídeo de cadeia leve ou pesada é amplificado, por exemplo, por PCR, usando iniciadores de oligonucleotídeo específicos. Em algumas modalidades, cDNA é clonado em um vetor de expressão adequado. Em algumas modalidades, o vetor de expressão, em seguida, é transformado ou transfectado em uma célula hospedeira adequada, tal como uma célula hospedeira que não produz endogenamente anticorpos. Determinadas células hospedeiras exemplares incluem, mas não estão limitadas a, *E. Coli.*, células COS, células do ovário de hamster chinês (CHO) e células de mieloma. Em algumas modalidades, em que cadeias leve e pesada são coexpressas no mesmo hospedeiro, o anticorpo reconstituído pode ser isolado.

[00122] Em algumas modalidades, cDNA codificando uma cadeia leve ou pesada pode ser modificado. Por exemplo, em algumas modalidades, a região constante de cadeia leve ou pesada de camundongo pode ser substituída pela região constante de cadeia leve ou pesada humana. Desse modo, em algumas modalidades, um anticorpo quimérico pode ser produzido que possui regiões constantes de anticorpo humano, mas mantém a especificidade de ligação de um anticorpo de camundongo.

[00123] Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeos que codifica a cadeia pesada ou a cadeia leve de um anticorpo neutralizante de NOTUM. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico única compreende uma primeira sequência de polinucleotídeos que codifica a cadeia pesada de um anticorpo neutralizante de NOTUM e uma segunda sequência de polinucleotídeos que codifica a cadeia leve de um anticorpo neutralizante de NOTUM. Em algumas modalidades, por exemplo,

quando o anticorpo é uma Fv (scFv) de cadeia única, a sequência de codificação para a cadeia pesada e a sequência de codificação para a cadeia leve fazem parte de uma sequência contínua de codificação de modo que um único polipeptídeo seja expresso, o que inclui a cadeia pesada e a cadeia leve do anticorpo. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico única que codifica uma cadeia pesada e uma cadeia leve é capaz de expressar as duas cadeias de polipeptídeos separados. Em algumas dessas modalidades, cada cadeia está sob o controle de um promotor separado. Em algumas modalidades, as duas cadeias estão sob o controle do mesmo promotor. Uma pessoa versada na técnica pode selecionar uma configuração adequada e elementos de controle adequados para cadeias leve e pesada de anticorpo neutralizante de NOTUM de acordo com a aplicação pretendida.

[00124] Em algumas modalidades, o ácido nucleico é um vetor, tal como um vetor de expressão adequado para expressar a cadeia pesada e/ou a cadeia leve em uma célula hospedeira específica. Uma pessoa versada na técnica pode selecionar um vetor de expressão adequado, ou vetores de expressão, de acordo com a célula hospedeira a ser usada para a expressão. Muitos de tais vetores exemplares são conhecidos na técnica.

[00125] Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeos que codifica uma cadeia pesada de um anticorpo neutralizante de NOTUM selecionado a partir de MAbs 1.731 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2.55, 2.78, e versões humanizadas de tais MAbs. Em algumas dessas modalidades, uma molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 101, 103, 105, 107, 109, 111, 112, 115, 116, 119, 120, 123, 124, 127 e 128. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeos que codifica uma cadeia leve de um anticorpo neutralizante de NOTUM selecionado a partir de MAbs 1.731 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2.55, 2.78 e versões humanizadas

de tais MABs. Em algumas dessas modalidades, uma molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 102, 104, 106, 108, 110, 113, 114, 117, 118, 121, 122, 125, 126, 129 e 130. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico compreende uma primeira sequência de polinucleotídeos que codifica a cadeia pesada e uma segunda sequência de polinucleotídeos que codifica a cadeia leve, de um anticorpo neutralizante de NOTUM selecionado a partir de MABs 1.731, 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2.55, 2.78 e versões humanizadas de MABs.

[00126] Em algumas modalidades, anticorpos recombinantes podem ser expressos em determinadas linhagens celulares. Em algumas modalidades, as sequências que codificam anticorpos específicos podem ser usadas para a transformação de uma célula hospedeira de mamífero adequada. De acordo com determinadas modalidades, a transformação pode ser por qualquer método conhecido para a introdução de polinucleotídeo em uma célula hospedeira. Determinados métodos exemplares incluem, mas não estão limitados a, embalar o polinucleotídeo em um vírus (ou em um vetor viral) e transdução de uma célula hospedeira com o vírus (ou vetor) e usando determinados procedimentos de transfecção conhecidos na técnica, tal como exemplificado pelas Patentes US 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 e 4.959.455. Em algumas modalidades, o procedimento de transformação utilizado pode depender do hospedeiro a ser transformado. Determinados métodos de introdução de polinucleotídeo heterólogos em células de mamíferos exemplares são conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, transfecção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção mediada polibreno, fusão de protoplasto, eletroporação, encapsulamento de polinucleotídeo(s) em lipossomas, e microinjeção direta de DNA em núcleos.

[00127] Determinadas linhagens celulares de mamíferos exemplares disponíveis como hospedeiros para expressão são conhecidas na técnica e incluem,



mas não estão limitadas a, muitas linhagens celulares imortalizadas disponíveis a partir de Coleção de Cultura tipo Americana (ATCC), incluindo células de ovário de hamster chinês (CHO), células de HeLa, células de rim de hamster bebê (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2) e uma série de outras linhagens celulares. Em algumas modalidades, linhagens celulares podem ser selecionadas, determinando quais linhagens celulares produzem altos níveis de anticorpos que se ligam especificamente a NOTUM.

### 5.3. Métodos de tratamento

[00128] Esta invenção compreende um método de estimulação de formação óssea endocortical em um paciente, que compreende administrar a um paciente em necessidade da mesma uma quantidade eficaz de um anticorpo da invenção. Também engloba um método de aumento da espessura óssea cortical, compreendendo administrar a um paciente em necessidade da mesma uma quantidade eficaz de um anticorpo da invenção.

[00129] Esta invenção compreende um método de tratamento, gerenciamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio associado à perda de tecido ósseo, que compreende administrar a um paciente em necessidade da mesma uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um anticorpo da invenção. Exemplos de doenças e distúrbios incluem osteoporose (por exemplo, osteoporose pós-menopausa, osteoporose induzida por glicocorticoide ou esteroide, osteoporose masculina, e osteoporose idiopática), osteopenia, e doença de Paget.

[00130] Também englobado pela invenção é um método de tratamento, gestão, ou prevenção de fraturas ósseas, que compreende administrar a um paciente em necessidade da mesma uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um anticorpo da invenção. Fraturas ósseas específicas estão associadas à doença óssea metastática, ou seja, câncer que tem metástase para o osso. Exemplos de

cânceres que podem ter metástase para o osso incluem câncer de próstata, mama, pulmão, tireoide e rim.

[00131] Esta invenção também abrange um método de tratamento, gerenciamento ou prevenção de perda óssea, associado ou causado por uma doença ou distúrbio, que compreende administrar a um paciente em necessidade da mesma uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um anticorpo da invenção. Exemplos de doenças e distúrbios incluem doença celíaca, doença de Crohn, síndrome de Cushing, hiperparatireoidismo, doença inflamatória intestinal e colite ulcerativa.

[00132] Pacientes exemplares não limitantes que podem se beneficiar de métodos para esta invenção incluem homens e mulheres com idade de 55 anos ou mais velhos, mulheres pós-menopausa e pacientes que sofrem de insuficiência renal.

[00133] Anticorpos da invenção podem ser administrados em combinação (por exemplo, simultaneamente ou em momentos diferentes) com outros fármacos conhecidos por serem úteis no tratamento, gerenciamento ou prevenção de doenças ou condições que afetam o osso. Exemplos incluem: moduladores de receptores de andrógenos; bisfosfonatos; calcitonina; antagonistas de receptores detectores de cálcio; anticorpos de RANKL, inibidores de cathepsina K; estrogênio e moduladores de receptores de estrogênio; ligantes de integrina, anticorpos, e antagonistas receptores; paratormônio (PTH) e análogos e imitações dos mesmos; e vitamina D e análogos de vitamina D sintéticos.

[00134] Exemplos moduladores de receptor de andrógeno incluem finasterida e outros inibidores de 5 $\alpha$ -redutase, nilutamida, flutamida, bicalutamida, liarozol e acetato de abiraterona.

[00135] Exemplos de bisfosfonatos incluem alendronato, cimadronato, clodronato, etidronato, ibandronato, incadronato, minodronato, neridronato, olpadronato, pamidronato, piridronato, risedronato, tiludronato e zolendronato e sais

farmaceuticamente aceitáveis e ésteres dos mesmos.

[00136] Exemplos de inibidores de catepsina K incluem VEL-0230, AAE581 (balicatib), MV061194, SB-462795 (relacatib), MK-0822 (odanacatib), e MK-1256.

[00137] Exemplos de estrogênio e moduladores do receptor de estrogênio incluem estrogênios de ocorrência natural (por exemplo, 7-estradiol, estrona, e estriol), estrogênios conjugados (por exemplo, os estrogênios equinos), contraceptivos orais, estrogênios sulfatados, progestagênio, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, LY353381, LY117081, toremifeno, fulvestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropóxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etóxi]fenil]-2H-1-benzopiran-3-il)-fenil-2,2-dimetilpropanoato, 4, 4'-di-hidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona e SH646.

[00138] Exemplos de ligantes de integrina, anticorpos, e antagonistas dos receptores incluem vitaxin (MEDI-522), cilengitide e L-000845704.

#### 5.4. Formulações farmacêuticas

[00139] Esta invenção engloba composições farmacêuticas compreendendo um ou mais anticorpos da invenção e, opcionalmente, um ou mais outros fármacos, como os descritos acima.

[00140] Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante de NOTUM pode ser usado como um anticorpo terapêutico. Anticorpos neutralizantes de NOTUM exemplares para serem usados como anticorpos terapêuticos incluem, mas não estão limitados a anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e anticorpos humanos. Aqueles versados na técnica estão familiarizados com o uso de anticorpos como agentes terapêuticos.

[00141] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica é fornecida a qual compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo para NOTUM e um diluente, veículo, solubilizante, emulsificante, conservante ou adjuvante farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, uma composição

farmacêutica é fornecida que compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo para NOTUM e uma quantidade eficaz de pelo menos um agente terapêutico adicional, juntamente com um diluente, veículo, solubilizante, emulsificante, conservante ou adjuvante farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, pelo menos um agente terapêutico adicional é selecionado como descrito acima.

[00142] Em algumas modalidades, materiais de formulação para composições farmacêuticas são não tóxicos para recipientes em dosagens e concentrações empregadas.

[00143] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende materiais de formulação para modificar, manter ou preservar, por exemplo, o pH, osmolaridade, viscosidade, clareza, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou liberação, absorção ou penetração da composição. Em algumas modalidades, materiais de formulação adequados incluem, mas não estão limitados a, aminoácidos (por exemplo, glicina, glutamina, asparagina, arginina e lisina); antimicrobianos; antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico, sulfito de sódio e hidrogenossulfito de sódio); tampões (por exemplo, borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos e outros ácidos orgânicos); agentes de volume (por exemplo, manitol e glicina); agentes quelantes (por exemplo, etilenodiamina ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)); agentes complexantes (por exemplo, cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina e hidroxipropil-beta-ciclodextrina); preenchantes; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos (por exemplo, glicose, manose e dextrinas); proteínas (por exemplo, albumina, gelatina e imunoglobulinas); agentes corantes, flavorizantes e diluentes; emulsionantes; polímeros hidrofílicos (por exemplo, polivinilpirrolidona); polipeptídeos de baixo peso molecular; contraíons de formação de sal (por exemplo, sódio); conservantes (por exemplo, cloreto de benzalcônio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, álcool fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorexidina, ácido sórbico e peróxido de

hidrogênio); solventes (por exemplo, glicerina, propileno glicol e polietilenoglicol); álcoois de açúcar (por exemplo, manitol e sorbitol); agentes de suspensão; agentes tensoativos ou umectantes (por exemplo, plurônicos, PEG, ésteres de sorbitano), polissorbatos (por exemplo, polissorbato 20 e polissorbato 80), triton, trometamina, lecitina, colesterol e tiloxapal); agentes de aumento de estabilidade (por exemplo, sacarose e sorbitol); agentes de aumento de tonicidade (por exemplo, haletos de metais alcalinos (por exemplo, sódio ou cloreto de potássio), manitol, e sorbitol); veículos de liberação; diluentes; excipientes; e adjuvantes farmacêuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edição, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990).

[00144] Em algumas modalidades, um anticorpo de NOTUM ou outra molécula terapêutica está ligado a um veículo de meia-vida estendida. Veículos de meia-vida estendida exemplares incluem os conhecidos na técnica. Tais veículos incluem, mas não estão limitados a domínio de Fc, polietileno glicol e dextrano. Tais veículos exemplares são descritos, por exemplo, no Pedido PCT publicado WO 25044/99.

[00145] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica ótima será determinada por um versado na técnica dependendo, por exemplo, da via de administração pretendida, formato de liberação e dosagem desejada. Vide, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*. Em algumas modalidades, tais composições podem influenciar o estado físico, estabilidade, taxa de liberação *in vivo*, ou taxa de afastamento *in vivo* de um anticorpo neutralizante.

[00146] Em algumas modalidades, um veículo ou transportador primário em uma composição farmacêutica pode ser aquoso ou não aquoso na natureza. Por exemplo, em algumas modalidades, um veículo ou transportador adequado pode ser água para injeção, soro fisiológico, ou líquido cefalorraquidiano artificial, eventualmente complementado com outros materiais comuns em composições para

administração parenteral. Veículos exemplares incluem, mas não estão limitados a solução salina tamponada neutra e soro fisiológico misturado com albumina de soro. Em algumas modalidades, composições farmacêuticas compreendem tampão Tris de cerca de pH 7,0 a 8,5, ou tampão de acetato de cerca de pH 4,0-5,5, que podem adicionalmente incluir sorbitol ou um substituto adequado para os mesmos. Em algumas modalidades, uma composição compreendendo um anticorpo para NOTUM, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, pode ser preparada por armazenamento misturando a composição selecionada tendo o grau de pureza desejado com agentes de formulação opcional (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*), sob a forma de um bolo liofilizado ou uma solução aquosa. Em algumas modalidades, uma composição que inclui um anticorpo para NOTUM com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional pode ser formulada como um liofilizado usando excipientes adequados tal como sacarose.

[00147] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica é selecionada para administração parenteral. Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica é selecionada para inalação ou para liberação através do trato digestivo, tal como por via oral. Diversas técnicas para a preparação de composições farmaceuticamente aceitáveis estão dentro da habilidade de uma pessoa versada na técnica.

[00148] Em algumas modalidades, componentes de formulação estão presentes em concentrações que são aceitáveis para o local de administração. Em algumas modalidades, tampões são usados para manter a composição no pH fisiológico, ou a um pH ligeiramente inferior, normalmente dentro de um intervalo de pH de cerca de 5 a cerca de 8.

[00149] Em algumas modalidades, quando a administração parenteral é contemplada, uma composição farmacêutica pode estar sob a forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável, livre de pirogênio, compreendendo o anticorpo

desejado para NOTUM, com ou sem agentes terapêuticos adicionais, em um veículo farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, um veículo para a injeção parenteral é água destilada estéril, em que o anticorpo para NOTUM, com ou pelo menos um agente terapêutico adicional, é formulado como uma solução isotônica, estéril, devidamente conservada. Em algumas modalidades, a preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com um agente, tais como microesferas injetáveis, partículas bioerodíveis, compostos poliméricos (tais como o ácido polilático ou ácido poliglicólico), grânulos ou lipossomas, que podem fornecer liberação sustentada ou controlada do produto que, em seguida, pode ser liberado através de uma injeção de depósito. Em algumas modalidades, ácido hialurônico também pode ser usado e pode ter o efeito de promover duração sustentada na circulação. Em algumas modalidades, dispositivos de liberação de fármacos implantáveis podem ser usados para introduzir a molécula desejada.

[00150] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica pode ser formulada para inalação. Em algumas modalidades, um anticorpo para NOTUM, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, pode ser formulado como um pó seco para inalação. Em algumas modalidades, uma solução de inalação, compreendendo um anticorpo para NOTUM, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, pode ser formulada com um propelente para liberação de aerossol. Em algumas modalidades, soluções podem ser nebulizadas.

[00151] Em algumas modalidades, uma formulação pode ser administrada por via oral. Em algumas modalidades, um anticorpo para NOTUM, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, que é administrado desta forma pode ser formulado com ou sem veículos normalmente usados na composição de formas de dosagem sólidas tais como comprimidos e cápsulas. Em algumas modalidades, uma cápsula pode ser projetada para liberar a porção ativa da formulação no ponto no trato gastrointestinal quando a biodisponibilidade é maximizada e a degradação pré-

sistêmica é minimizada. Em algumas modalidades, pelo menos um agente adicional pode ser incluído para facilitar a absorção do anticorpo para NOTUM com ou sem quaisquer agentes terapêuticos adicionais. Em algumas modalidades, diluentes, flavorizantes, ceras de baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes de desintegração do comprimido, e/ou ligantes também podem ser empregados.

[00152] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo para NOTUM, com ou pelo menos um agente terapêutico adicional, em mistura com excipientes não tóxicos que são adequados para a fabricação de comprimidos. Em algumas modalidades, dissolvendo-se os comprimidos em água estéril ou outro veículo adequado, soluções podem ser preparadas na forma de dose unitária. Excipientes exemplares incluem, mas não estão limitados a, diluentes inertes (por exemplo, carbonato de cálcio, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, lactose e fosfato de cálcio); agentes de ligação (por exemplo, amido, gelatina e acácia); e agentes lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, ácido esteárico, e talco).

[00153] Composições farmacêuticas adicionais serão evidentes para os versados na técnica, incluindo formulações compreendendo um anticorpo para NOTUM, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, em formulações de liberação sustentada ou controlada. Formulações de liberação sustentada ou controlada exemplares incluem, mas não estão limitadas a transportadores de lipossomas, micropartículas bioerodíveis, grânulos porosos e injeções de depósito. Diversas técnicas para a preparação de formulações são conhecidas por aqueles versados na técnica. Em algumas modalidades, preparações de liberação sustentada podem incluir matrizes de polímero semipermeáveis na forma de artigos formatados, por exemplo, películas ou microcápsulas. Matrizes de liberação sustentada exemplares incluem, mas não estão limitadas a, poliésteres, hidrogéis, polilactatos



(vide, por exemplo, Patente US 3.773.919 e EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato (vide, por exemplo, Sidman et al. (1983) Biopolymers 22:547-556), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (vide, por exemplo, Langer et al. (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 e Langer (1982) Chem. Tech. 12:98-105), acetato de etileno vinila (Langer et al., *supra*) e ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988). Em algumas modalidades, composições de liberação sustentada podem incluir lipossomas, que podem ser preparados, em algumas modalidades, por qualquer um dos diversos métodos conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Eppstein et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:3688-3692; EP 036.676; EP 088.046; e EP 143.949.

[00154] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica a ser usada para administração *in vivo* normalmente é estéril. Em algumas modalidades, isso pode ser efetuado por filtração através de membranas de filtração estéril. Em algumas modalidades, onde a composição é liofilizada, usando este método de esterilização podem ser realizadas antes ou após liofilização e reconstituição. Em algumas modalidades, a composição para administração parenteral pode ser armazenada na forma liofilizada ou em uma solução. Em algumas modalidades, composições parenterais geralmente são colocadas em um recipiente com um orifício de acesso estéril, por exemplo, um saco de solução intravenosa ou frasco com uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[00155] Em algumas modalidades, uma vez que a composição farmacêutica foi formulada, pode ser armazenada em frascos estéreis, tais como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido, ou como um pó desidratado ou liofilizado. Em algumas modalidades, tais formulações podem ser armazenadas em uma forma pronta para uso ou em uma forma (por exemplo, liofilizada) que é reconstituída antes da administração.

[00156] Em algumas modalidades, são fornecidos kits para produzir uma

unidade de administração de dose única. Em algumas modalidades, os kits podem cada um conter um primeiro recipiente tendo uma proteína seca e um segundo recipiente tendo uma formulação aquosa. Em algumas modalidades, kits com seringas pré-cheias simples ou multisseptadas (por exemplo, seringas de líquido e lioseringas) são incluídos.

[00157] Em algumas modalidades, o valor eficaz de uma composição farmacêutica, compreendendo um anticorpo para NOTUM, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, a ser empregada terapeuticamente dependerá, por exemplo, do contexto e dos objetivos do tratamento. Uma pessoa versada na técnica apreciará que os níveis de dosagem adequados para tratamento, de acordo com algumas modalidades, assim variarão dependendo, em parte, da molécula liberada, da indicação para qual anticorpo para NOTUM, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, está sendo usado, da via de administração e do tamanho (peso corporal, tamanho de superfície ou órgão do corpo) e/ou condição (idade e saúde geral) do paciente. Em algumas modalidades, o médico pode titular a dosagem e modificar a via de administração para obter o melhor efeito terapêutico. Em algumas modalidades, uma dosagem típica pode variar de cerca de 0,1 µg/kg de peso corporal do paciente, até cerca de 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores acima mencionados. Em algumas modalidades, a dosagem podem variar de 0,1 µg/kg até cerca de 100 mg/kg; 1 µg/kg até 100 mg/kg; ou 5 µg/kg até cerca de 100 mg/kg, incluindo todos os pontos (incluindo frações) entre qualquer uma das extremidades anteriores. Em algumas modalidades, a dosagem está entre 1 mg/kg de peso corporal e 60 mg/kg de peso corporal. Em algumas modalidades, a dosagem é de cerca de 1 mg/kg de peso corporal, cerca de 3 mg/kg de peso corporal, cerca de 5 mg/kg de peso corporal, cerca de 10 mg/kg de peso corporal, cerca de 20 mg/kg de peso corporal, cerca de 30 mg/kg de peso corporal, cerca de 40 mg/kg de peso corporal, cerca de 50 mg/kg de peso corporal ou cerca de 60 mg/kg de peso corporal.

[00158] Em algumas modalidades, uma dose humana de um anticorpo neutralizante contra NOTUM é determinada com base na dose eficaz do mesmo anticorpo em outra espécie, tais como camundongos, cães, macacos, etc. Em algumas modalidades, uma dose humana de um anticorpo neutralizante contra NOTUM é determinada usando “Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers”, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, and Center for Drug Evaluation and Research (CDER), July 2005 (Pharmacology and Toxicology).

[00159] Em algumas modalidades, uma dosagem adequada pode ser determinada por um versado na técnica, por exemplo, baseado em estudos com animais.

[00160] Em diversas modalidades, um anticorpo neutralizante contra NOTU é administrado ao paciente, duas vezes por semana, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez por mês, em cada dois meses, ou até menos frequentemente.

[00161] Em algumas modalidades, a frequência de administração levará em consideração os parâmetros farmacocinéticos de um anticorpo para NOTUM e, se aplicáveis, quaisquer agentes terapêuticos adicionais na formulação usada. Em algumas modalidades, um médico administrará a composição até atingir uma dose que atinge o efeito desejado. Em algumas modalidades, a composição pode, portanto, ser administrada como dose única, ou como duas ou mais doses (que podem ou não podem conter a mesma quantidade da molécula desejada) ao longo do tempo, ou como uma infusão contínua através de um dispositivo de implantação ou cateter. Em algumas modalidades, refinamento adicional da dose adequada é rotineiramente feito por aqueles versados na técnica e está no âmbito das tarefas executadas rotineiramente por eles. Em algumas modalidades, dosagens adequadas podem ser

determinadas através do uso de dados de resposta à dose adequada. Em algumas modalidades, um paciente recebe uma dose de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo para NOTUM. Em algumas modalidades, um paciente recebe uma, duas, três ou quatro doses diárias de uma composição farmacêutica, compreendendo um anticorpo para NOTUM. Em algumas modalidades, um paciente recebe uma, duas, três, quatro, cinco ou seis doses por semana de uma composição farmacêutica, compreendendo um anticorpo para NOTUM. Em algumas modalidades, um paciente recebe uma, duas, três ou quatro doses por mês de uma composição farmacêutica, compreendendo um anticorpo para NOTUM.

[00162] Em algumas modalidades, a via de administração da composição farmacêutica é de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, por via oral, através de injeção por subcutânea, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intra-arterial, intraportal, ou vias intralesionais; sistemas de liberação sustentada ou dispositivos de implantação. Em algumas modalidades, as composições podem ser administradas por injeção de bólus ou continuamente por infusão, ou por dispositivo de implantação.

[00163] Em algumas modalidades, a composição pode ser administrada localmente através da implantação de uma membrana, esponja ou outro material adequado, no qual a molécula desejada foi absorvida ou encapsulada. Em algumas modalidades, onde um dispositivo de implantação é usado, o dispositivo pode ser implantado em qualquer órgão ou tecido adequado, e a liberação da molécula desejada pode ser através de difusão, bólus de liberação cronometrada ou administração contínua.

[00164] Em algumas modalidades, um anticorpo para NOTUM, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, é liberado pela implantação de determinadas células que tenham sido geneticamente modificadas, usando métodos

tais como aqueles descritos neste documento, para expressar e secretar polipeptídeos. Em algumas modalidades, essas células podem ser células humanas ou animais, podem ser autólogas, heterólogas ou xenogênicas. Em algumas modalidades, as células podem ser imortalizadas. Em algumas modalidades, com a finalidade de reduzir a chance de uma resposta imunológica, as células podem ser encapsuladas para evitar infiltração dos tecidos circundantes. Em algumas modalidades, os materiais de encapsulamento são normalmente biocompatíveis, invólucros poliméricos semipermeáveis ou membranas que permitem a liberação de produtos de proteína, mas impedem a destruição das células pelo sistema imunológico do paciente, ou por outros fatores prejudiciais aos tecidos circundantes.

## 6. EXEMPLOS

### 6.1. Camundongo nocaute

[00165] Camundongos homozigotos para a mutação geneticamente engenheirada no ortólogo murinho do gene de NOTUM de humano foram gerados usando clones de células-tronco embrionárias mutantes (ES) correspondentes da coleção de OMNIBANK de clones de célula ES murinho mutantes (vide geralmente, Patente US 6.080.576). Em resumo, clones de células ES contendo uma inserção viral mutagênica no locus de NOTUM murino foram injetados em blastocistos que por sua vez foram implantados em hospedeiras pseudográvidas e transportados por período. A prole quimérica resultante posteriormente foi criada para 6 camundongos fêmeas pretos C57 e a prole verificada para a transmissão da linhagem germinativa do alelo de NOTUM eliminado. Posteriormente, os animais heterozigotos para o alelo mutante de NOTUM foram criados para produzir descendentes que foram homozigotos para o alelo de NOTUM mutante, heterozigoto para o alelo de NOTUM mutante, ou prole do tipo selvagem em uma razão aproximada de 1:2:1.

[00166] Camundongos homozigotos (-/-) para o rompimento do gene de NOTUM foram estudados em conjunto com camundongos heterozigotos (+/-) para o

rompimento do gene de NOTUM e ninhadas do tipo selvagem (+/+). Durante esta análise, os camundongos foram submetidos a um trabalho de acompanhamento médico usando um conjunto integrado de procedimentos de diagnóstico médico, destinado a avaliar a função dos sistemas principais do órgão em um indivíduo mamífero. Estudando os camundongos “nocaute” homozigotos (-/-) nos números descritos e em conjunto com heterozigotos (+/-) e ninhadas do tipo selvagem (+/+), dados mais confiáveis e reproduzíveis foram obtidos.

[00167] Como mostrado na Figura 1, camundongos masculinos tendo perturbação homozigótica do gene de NOTUM (“homs”) exibiu espessura cortical aumentada em diversos locais do osso, em comparação com suas ninhadas do tipo selvagem de 16 semanas de idade (número de camundongos N = 10 para ambos os grupos). Essas diferenças, que foram medidas por microCT (Scanco  $\mu$ CT40), foram: 28% ( $p < 0,001$ ) na eixo médio do fêmur; 19% ( $p < 0,001$ ) na diáfise do úmero; 17% ( $p < 0,001$ ) na diáfise da tíbia; e 11% ( $p < 0,001$ ), na articulação da tíbia-fíbula. Como mostrado na Figura 2, com 16 semanas de idade, a espessura óssea cortical do eixo médio do fêmur de camundongos heterozigotos para a mutação de NOTUM (“hets”) também foi maior do que das suas ninhadas do tipo selvagem: hets de machos (N = 50) exibiu um aumento de 6% ( $p = 0,007$ ) em relação às suas ninhadas do tipo selvagem (N = 23); e hets de fêmeas (N = 57) exibiu um aumento de 9% ( $p < 0,001$ ) em relação às suas ninhadas do tipo selvagem (N = 22).

[00168] Manifestações práticas da redistribuição observada da formação óssea em animais de NOTUM são refletidas nas Figuras 3 e 4, que mostram resultados de testes de força de ruptura do fêmur (interpretadas por SkeleTech, agora Ricerca Biosciences) usando um teste de flexão de 4 pontos padrão. Como mostrado na Figura 3, que fornece resultados obtidos de camundongos machos com 16 semanas de idade, hets (N = 20) exibiu um aumento de 5% ( $p = 0,54$ ) na força de ruptura do fêmur em relação às suas ninhadas do tipo selvagem (N = 23), ao passo

que homs (N = 17) exibiu um aumento de 28% ( $p < 0,001$ ). Por outro lado, testes de compressão da coluna vertebral de homs e hets de NOTUM não apresentaram uma redução significativa em cargas de compressão da coluna vertebral máxima em comparação com os controles do tipo selvagem. Resultados similares foram obtidos para camundongos fêmeas de 16 semanas de idade. Como mostrado na Figura 4, hets (N = 20) exibiu um aumento de 12% ( $p = 0,04$ ) na ruptura do fêmur em às suas ninhadas do tipo selvagem (N = 21), ao passo que homs (N = 18) exibiu um aumento de 28% ( $p < 0,001$ ). A análise destes e de outros dados revelou uma forte correlação entre a espessura cortical e a resistência à ruptura do fêmur.

#### 6.2. Produção e Purificação de Proteínas de NOTUM recombinantes

[00169] Sequências de codificação de comprimento completo para seres humanos, NOTUM de seres humanos cataliticamente inativos (S232A), camundongo, camundongo cataliticamente inativo (S239A), rato, porquinho-da-índia, macaco cinomolgos e macaco rhesus, cada um com uma marcação de epítipo 6XHis de terminal C, foram subclonadas no vetor de expressão pIRESpuro2 (Clontech). Os constructos de expressão podem ser usados para gerar meio condicionado contendo proteína de NOTUM secretada por transfecção transiente, ou para estabelecer transfectantes estáveis para a geração de maiores quantidades de meio condicionado, por exemplo, para posterior purificação da proteína de NOTUM.

[00170] Células HEK293F foram transfectadas usando Lipofectamine2000 (Invitrogen) e cultivadas em cultura de suspensão em meio de expressão de Freestyle 293 (Invitrogen) em frascos agitadores. Para transfecções transientes, o meio condicionado foi colhido quatro dias depois da transfecção, filtrado estéril e armazenado a 4°C. Para a geração de proteína de NOTUM expressando de forma estável linhagens celulares, a integração genômica do plasmídeo de expressão foi selecionada na presença de puromicina.

[00171] A expressão e a secreção de proteínas de NOTUM foram confirmadas

por Western blot de lisados celulares e/ou meio condicionado, usando um anticorpo anti-His. Subclonagem de transfectantes estáveis de volume de produção de NOTUM limitando a diluição permitiu a identificação por Western blot de anti-His de clones individuais expressando NOTUM em níveis relativamente elevados.

[00172] Para produzir proteínas de NOTUM de humano e camundongo purificado na escala de 10 a 20 mg, linhagens celulares HEK293F clonais expressando NOTUM de humano ou de camundongo foram em cultura de suspensão expandida para um volume de 3L. Quando a densidade celular neste volume alcançou  $1 \times 10^6$  de células viáveis por ml, as células foram peletizadas por centrifugação e ressuspensas no meio de expressão Freestyle 293 fresco e mantidas em cultura por mais 96 horas sem alterações de meios adicionais. Após 96 horas, culturas foram colhidas, as células foram peletizadas por centrifugação e o meio condicionado foi filtrado estéril e armazenado a 4°C para processamento posterior.

[00173] Imediatamente antes da purificação, o meio condicionado contendo NOTUM foi concentrado de 3L a 1L e então trocado de tampão em cromatografia de afinidade de metal imobilizado por níquel (IMAC) (Tris-HCl a 20 mM, imidazol a 10 mM, NaCl a 0,5 M, pH 7,4) por filtração de fluxo tangencial usando uma membrana com peso molecular nominal de 10kDa cortado. O meio condicionado com tampão trocado, concentrado foi então aplicado a uma coluna quelante de metal, carregada por níquel, equilibrada. A proteína ligada foi lavada e eluída usando um gradiente de concentração de imidazol. Frações de eluição contendo proteína de NOTUM pura foram agrupadas e dializadas contra solução salina tamponada por fosfato para remover o tampão de eluição. A proteína dializada, purificada foi aliquoteada e congelada a -80°C.

[00174] Para cada lote de proteína, uma alíquota foi usada para determinar a concentração de proteínas por ensaio de ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific, Rockford, IL), pureza por SDS PAGE seguido de coloração Coomassie ou



prata, atividade em ensaio enzimático de OPTS livre de célula (descrito no Exemplo 6.4.1, abaixo) e ensaio de sinização de Wnt baseado em célula (descrito no Exemplo 6.4.2, abaixo) e a concentração de endotoxina por ensaio Limulos Amoebocyte Lysate (LAL) (Lonza, Basel, Switzerland).

### 6.3. Geração de Anticorpos Monoclonais de Camundongo para NOTUM

[00175] Os anticorpos foram elevados contra proteínas de NOTUM de humano e camundongo recombinantes purificadas em duas campanhas de imunização separadas.

[00176] Na Campanha 1, camundongos homozigotos para uma inserção de corrente de captura de gene no gene de NOTUM e, portanto, carentes de proteína de NOTUM endógena foram imunizados com proteína de NOTUM de humano da seguinte forma. Os camundongos foram iniciados com 20µg de proteína de NOTUM de humano em adjuvante de Freund completo injetado intraperitonealmente. Os camundongos foram impulsionados com 20µg de proteína de NOTUM de humano em adjuvante de Freund completo injetado intraperitonealmente a cada duas a três semanas. Os camundongos que exibem um título de soro robusto contra NOTUM de humano conforme determinado por ELISA receberam um impulso final de 10µg de proteína NOTUM de humano em PBS, injetado por via intravenosa (i.v.).

[00177] Na Campanha 2, camundongos homozigotos para uma inserção de corrente de captura de gene no gene de NOTUM foram imunizados através das plantas dos pés traseiras com uma imunização de iniciação de 10µg de proteína de NOTUM de camundongo em adjuvante TiterMax com DNA de CpG, seguido por dez impulsos de 10µg de proteína de NOTUM de camundongo em adjuvante Alum com DNA de CpG em três ou quatro dias de intervalo. Linfonodos inguinais e poplíteos foram colhidos de camundongos de título elevado após um impulso da planta dos pés final com 10µg proteína de NOTUM de camundongo em PBS.

[00178] Os baços de camundongos impulsionados i.v. ou linfonodos de

camundongos imunizados na planta dos pés foram coletados quatro dias após o impulso final e foram picados e forçados a render uma suspensão de células. Os glóbulos vermelhos foram lisados e a suspensão de células foi enriquecida por células B por seleção negativa usando grânulos magnéticos revestidos com anticorpos específicos para populações de não célula B. Hibridomas foram gerados pela fusão eletrocelular de células B enriquecidas com células de mieloma NS1 de camundongo e foram semeadas em placas de 96 poços, meio de hibridoma contendo hipoxantina e aminopterina para selecionar para hibridomas de célula B/célula de mieloma viáveis.

[00179] Os hibridomas foram selecionados para a produção de anticorpos específicos de NOTUM por ensaio de meio de hibridoma condicionado de imunorreatividade com proteína NOTUM passivamente absorvida em um formato de ELISA. Centenas de hibridomas de secreção de anticorpos específicos para NOTUM de humano e/ou camundongo foram encontrados a partir de duas campanhas de imunização.

#### 6.4. Ensaio de Neutralização de NOTUM

##### 6.4.1. Ensaio de OPTS

[00180] No ensaio de OPTS, 8-octanoiloxipireno-1,3,6-trissulfonato trissódico (OPTS), um substrato de enzima solúvel em água para ensaios fluorimétricos de esterases e lipases, é usado para medir a atividade de NOTUM. Clivagem enzimática da ligação de éster em OPTS produz um produto fluorescente.

[00181] Verificou-se que esse meio de hibridoma condicionado em geral interferiu no ensaio de OPTS talvez devido à liberação de células mortas de hidrolases que também poderiam decompor OPTS. Por esta razão, o meio condicionado de hibridoma adicional foi gerado para as linhagens originalmente mostrando o alto nível de atividade de ligação por ELISA e o anticorpo foi purificado em um formato de 96 poços por cromatografia de afinidade com grânulos de proteína A. Estes anticorpos purificados foram então testados no ensaio de OPTS em uma diluição quatro vezes

sem prévia quantificação.

[00182] Os anticorpos foram testados em quatro exemplares em placas de 384 poços. 12,5 µl contendo 125 ng de NOTUM purificada em tampão de reação de 4X (CaCl<sub>2</sub> a 20 mM, MgCl<sub>2</sub> a 2 mM, Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4) foram adicionados a 12,5 µl de anticorpo purificado. Após a mistura, anticorpo e NOTUM foram incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos, seguidos de adição de 25µl de 1,25 µM de OPTS (Sigma, catalogue # 74875) em Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4. Após a mistura, a reação enzimática foi autorizada a proceder à temperatura ambiente por 10 minutos antes de ser parada pela adição de 25µl de SDS a 3%. As placas foram lidas em um leitor de placa Envision com um comprimento de onda de excitação de 485nm e comprimento de onda de emissão de 535 nm para quantificar a quantidade de produto de clivagem.

[00183] A triagem de 1.135 hibridomas imunorreativos de NOTUM humano de campanha 1 rendeu três anticorpos que mostraram mais do que 70% de inibição de NOTUM de humano. Estes três, juntamente com cinco hibridomas adicionais que exibem algum grau de neutralização no ensaio de OPTS foram selecionados para subclonagem, limitando a diluição e a produção de anticorpos purificados de pequena escala por cromatografia de afinidade de proteína A usando meio condicionado de 50 ml de hibridomas clonais.

[00184] A triagem do ensaio de OPTS de 1.056 hibridomas imunorreativos de NOTUM de camundongo identificados a partir da campanha 2 rendeu seis anticorpos que mostraram mais que 50% de inibição de NOTUM de camundongo. Desses seis, juntamente com seis hibridomas adicionais que exibem algum grau de neutralização no ensaio de OPTS foram selecionados para subclonagem, limitando a diluição e a produção de anticorpos purificados de pequena escala por cromatografia de afinidade de proteína A usando meio condicionado de 50 ml de hibridomas clonais.

#### 6.4.2. Ensaio de Sinalização de Wnt

[00185] NOTUM pode atuar como um regulador negativo de sinalização de Wnt. A atividade de anticorpos neutralizantes, determinada através do efeito de sinalização de Wnt, foi determinada em um ensaio de sinalização de Wnt, que utiliza a tecnologia CellSensor® e os meios condicionados preparados da seguinte forma. NOTUM de humano contendo plasmídeo em vetor pcDNA3.1(+) foi transfectado em células HEK293 e clones foram selecionados cultivando na presença de 400 µg/mL de G418. Os meios de condição destas células foram usados para o ensaio. A superexpressão e secreção de células L Wnt3a em meios condicionados foram compradas de ATCC.

[00186] O protocolo do ensaio foi o seguinte. Células de CellSensor®LEF/TCF-bla FreeStyle™ (Invitrogen) foram cultivadas para confluência próxima em placas de 15 cm em DMEM com FBS a 10% dializado, 5 µg/ml de Blastidin (Invitrogen, R210-01), TIMINA a 0,1 mM, HEPES a 25 mM e 1xGPS. As células foram tripsinizadas pela primeira lavagem com PBS, seguido pela adição de 5 ml de tripsina e incubação das placas à temperatura ambiente durante dois minutos. Um total de 10 mL de meios de ensaio (Opti-MEM, mais FBS dializado a 0,5%, NEAA a 0,1 mM, piruvato de sódio a 1mM, HEPES a 10 mM, 1xGPS), em seguida, foram adicionados por placa de 15 cm. As células foram contadas e suspensas em 50.000 células por mL. As células foram semeadas em placas de 384 poços Biocoat (Fisher, Catalogue #356663) com uma densidade de 10000 células por 20 µL por poço. Após incubação de células a 37°C por 3 horas, 10 µL de LiCl a 30 mM no meio de ensaio foram adicionados por poço, seguido de incubação a 37° C durante a noite. No dia seguinte, 15 µL de anticorpos e 15 µL de NOTUM purificado, em ambos os meio de ensaio, foram coincubados em um volume total de 45 µL de meio de ensaio à temperatura ambiente por 30 minutos em uma placa de 96 poços. NOTUM foi usado em uma operação de concentração previamente determinada para proporcionar 50% de inibição no ensaio, normalmente 25 nM. Após a incubação de 30 minutos, 15 µL

de meio condicionado de L-Wnt3a não diluído foram adicionados à mistura de anticorpo/NOTUM de 45 µL e 10 µL da mistura resultante foram adicionados às placas de 384 poços contendo as células de CellSensor®, em quatro exemplares. Os controles incluíram poços carentes de qualquer uma das células, poços carentes de NOTUM e poços carentes de meio condicionado de L-Wnt3a. A placa de ensaio foi incubada por 5 horas a 37°C, para permitir a alta regulação de beta-lactamase mediada por Wnt, e, em seguida, 8 µl de LiveBLAzer™-FRET B/Substrato G (CCF4-AM, Invitrogen) foram adicionados a cada poço e à placa incubada no escuro à temperatura ambiente por 3 horas. As placas, em seguida, foram lidas em um leitor de placa Envision usando um comprimento de onda de excitação de 400 nm e comprimento de onda de emissão de 460 nm e 535 nm.

#### 6.5. Caracterização de Anticorpos Neutralizantes de NOTUM

[00187] Anticorpos purificados de hibridomas clonais foram caracterizados em relação à sua reatividade cruzada de espécies por ELISA, sua capacidade de reconhecimento reduzida, proteína de NOTUM desnaturada por Western blot e sua potência de neutralização em ensaio de OPTS livre de células e com base em ensaio de sinalização de Wnt baseado em células, os quais são descritos acima no Exemplo 6.4.

[00188] Testes funcionais de anticorpos monoclonais de Campanha 1 revelaram três anticorpos, 1.802, 1.815, 1.846, que neutralizam NOTUM de humano em ensaios de OPTS livre de células e de sinalização de Wnt baseado em células com uma IC<sub>50</sub> na faixa de 1 a 10nM. Estes anticorpos não têm qualquer efeito sobre a atividade de NOTUM de camundongo e foram mostrados por ELISA se ligar a NOTUM de humano, mas não NOTUM de camundongo. Além disso, estes anticorpos reconheceram NOTUM de humano apenas fracamente quando proteína de NOTUM foi passivamente absorvida para a placa de ensaio e foram muito mais sensíveis à proteína de NOTUM de humano exibida anti-His.

[00189] A Tabela 1 mostra os resultados de diversas experiências de caracterização de determinados anticorpos de Campanha 1. Os dados na coluna de “Pré-classificação” foram gerados usando o método descrito no Exemplo 6.6 abaixo.

Tabela 1: Caracterização de determinados anticorpos elevados contra

NOTUM de humano

<u>Anticorpo</u>	<u>Isotipo</u>	<u>Pré-classificação</u>	<u>IC<sub>50</sub> de OPTS (NOTUM humano, nM;)</u>	<u>IC<sub>50</sub> de sinalização de Wnt (nM; NOTUM humano)</u>	<u>IC<sub>50</sub> de OPTS (NOTUM de camundongo, nM;)</u>	<u>IC<sub>50</sub> de sinalização de Wnt (NOTUM de camundongo nM;)</u>	<u>Ligação de NOTUM de camundongo</u>	<u>Ligação de Western blot</u>
1.802	IgG 1	1	6,44	5,71	Sem inibição	Sem inibição	Não	Não
1.815	IgG 1	1	7,62	6,88	Sem inibição	nd	Não	Não
1.846	IgG 2b	1	10,07	1,70	Sem inibição	nd	Não	Não
1.731	IgG 1	3	>166,67	15,52	196.74	Sem inibição	Sim	Sim
1.655	IgG 1	3	>166,67	nd	>166.67	nd	nd	Sim
1.168	IgG 2a	4	56,61	Sem inibição	Sem inibição	nd	Sim	Sim
1.712	IgG 2a	2	125,36	58,49	Sem inibição	nd	Sim	Sim
1.807	IgG 2a	2	nd	Sem inibição	Sem inibição	nd	Sim	Sim

[00190] Testes funcionais de anticorpos monoclonais de Campanha 2

revelaram interessantes perfis de atividade. Em particular, o MAb 2,78 neutralizou NOTUM de humano e de camundongo nos ensaios de OPTS e sinalização de Wnt com uma IC<sub>50</sub> na faixa de 3 a 50 nM enquanto MAb 2.1029 neutralizou NOTUM de humano e de camundongo no ensaio com um IC<sub>50</sub> na faixa de 5 a 30nM, mas apenas NOTUM de humano no ensaio de sinalização de Wnt com uma IC<sub>50</sub> de 14 nM. Esta última observação foi atribuída por haver alguma diferença na qualidade das proteínas de NOTUM de humano e de camundongo recombinantes. Uma diferença conhecida entre as proteínas é que NOTUM de camundongo recombinante existe como multímeros/agregados em muito mais extensão do que faz o NOTUM de humano recombinante. Nem 2.78 nem 2.1029 proteína de NOTUM desnaturada reconhecida, reduzida, por Western blotting e ambas foram substancialmente mais imunorreativas com NOTUM de anti-His exibido do que com NOTUM passivamente absorvido.

[00191] A Tabela 2 mostra os resultados de diversas experiências de caracterização de determinados anticorpos de Campanha 2. Os dados na coluna de “Pré-classificação” foram gerados usando o método descrito no Exemplo 6.6, abaixo.

Tabela 2: Caracterização de determinados anticorpos gerados contra NOTUM de camundongo

<u>Anticorpo</u>	<u>Isotipo</u>	<u>Pré-classificação</u>	<u>IC<sub>50</sub> de OPTS (NOTUM de camundongo, nM;)</u>	<u>Sinalização de Wnt IC<sub>50</sub> (nM; mouse NOTUM )</u>	<u>IC<sub>50</sub> de OPTS (NOTUM humano nM;)</u>	<u>Sinalização de Wnt de IC<sub>50</sub> (NOTUM humano; nM;)</u>	<u>Ligação de NOTUM Humano</u>	<u>Ligação de Western blot</u>
2.78	IgG2b	2	35,65	3.75	15,49	45,94	Sim	Não
2.1029	IgG2a	3	29,19	Sem inibição	5,77	14,02	Sim	Não
2.816	IgG2a	3	31,70	Sem inibição	Sem inibição	39,11	Sim	Não

					o			
2.856	IgG2b	3	37,70	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sim	Não
2.1001	IgG2b	3	>166,67	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Não	Sim
2.55	IgG2a	1	26,13	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sim	Sim
2.1002	IgG2a	1	42,39	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sim	Sim
2.497	IgG2a	1	54,95	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sim	Sim
2.341	IgG2a	1	56,95	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sim	Sim
2.236	IgG2a	1	64,54	Sem inibição	Sem inibição	Sem inibição	Sim	Sim
2.688	IgG2a	4	Sem inibição	Sem inibição	12,84 <sup>‡</sup>	Sem inibição	Sim	Não
2.1006	IgG2a	5	>166,67	Sem inibição	>166,67 <sup>‡</sup>	Sem inibição	Sim	Sim

<sup>‡</sup> Inibição máxima = 50%.

#### 6.6. Estudos de Competição de Ligação Usando Anticorpos Neutralizantes de NOTUM

[00192] Anticorpos de ambas as campanhas de imunização foram avaliados por sua capacidade de interferir com a ligação à proteína de NOTUM em um ensaio



de pré-classificação de epítopo. Esta foi realizada em um formato de ELISA usando proteína de NOTUM anti-His capturada. A proteína de NOTUM capturada foi incubada com um excesso de um anticorpo específico de NOTUM não marcado (o anticorpo de 'bloqueio') seguido pela adição de um anticorpo específico de NOTUM biotinilado (anticorpo de 'sonda'). A ligação do anticorpo de sonda foi medida usando conjugado de HRP com estreptavidina. Se os dois anticorpos competirem para ligação no mesmo espaço de epítopo ou se o anticorpo de bloqueio afetar a capacidade do anticorpo de sonda para ligar, por exemplo, a interferência alostérica, nenhum sinal será gerado. Se os dois anticorpos não interferirem uns com os outros, será gerado um sinal similar do anticorpo biotinilado testado na ausência do anticorpo de bloqueio. Anticorpos são testados em um formato de matriz recíproca. Normalmente, um par de anticorpos mostrará o mesmo nível de interferência, independentemente de qual dos dois é o anticorpo de bloqueio e qual é o anticorpo de sonda. Anticorpos que exibem perfis similares são atribuídos para à mesma 'pré-classificação' de epítopo.

[00193] Usando esta metodologia mostrou-se que MAbs 1.802, 1.815, 1.846 2,78 e 2.1029 todos interferem uns com os outros ligando-se a NOTUM de humano, enquanto eles não interferem com a ligação de diversos outros neutralizantes menos potente ou não neutralizantes.

#### 6.7. Mapeamento de Epítopo de Anticorpos Neutralizantes de NOTUM

[00194] Em um esforço para mapear os aminoácidos envolvidos na ligação de MAbs específicos de NOTUM de humano 1.802, 1.815 e 1.846, proteínas de NOTUM quiméricas de humano/camundongo foram produzidas por transfecção transiente em HEK293F de expressão de estruturas de leitura abertas de NOTUM codificando constructos com uma mistura de sequências de humano e camundongo. Por Western blotting com anticorpo anti-His e por ensaio de OPTS demonstrou-se que meios condicionados destas transfecções continham quimeras de NOTUM funcionais.

[00195] A Figura 5 mostra representações esquemáticas das proteínas de

NOTUM de humano/camundongo quiméricas utilizadas neste experimento. As sequências dessas proteínas são mostradas na Seção 7 (tabela de sequências). Os meios condicionados foram usados em formato de ELISA para determinar a especificidade do anticorpo. Com base na perda de MAb específico de humano se ligando a quimeras específicos determinou-se que MAbs 1.802, 1.815 e 1.846 (que são anticorpos de “Pré-classificação 1”) depende de aminoácidos de NOTUM de humano entre Q47 e M177 para ligação. Vide a Figura 5. Dentro desta região, NOTUM de humano e camundongo diferem em cinco posições (R115K, D141S, R150K, R154H e Y171H, com base na numeração de sequência humana). Mutantes de ponto de NOTUM de humano foram gerados pela transfecção transiente de NOTUM de humano expressando constructos com o aminoácido de camundongo em cada uma destas cinco posições e os mutantes do ponto foram mostrados ser funcionais no ensaio de OPTS. Por ELISA, MAbs 1.802, 1.815 e 1.846 ligaram todos os mutantes do ponto exceto NOTUM de humano D141S, que indica que este aminoácido é importante para a sua ligação com NOTUM de humano. NOTUM de camundongo com a mutação de ponto recíproca, NOTUM de camundongo S148D foi gerado pela transfecção transiente, demonstrado ser ativo em ensaio de OPTS e foi mostrado oferecer suporte para a ligação de MAbs específicos de NOTUM de humano. Portanto, a especificidade das espécies de MAbs 1.802, 1.815 e 1.846 parece ser dependente do aminoácido na posição 141 em NOTUM de humano, que é ácido aspártico em proteína de NOTUM de humano nativa.

[00196] O enfoque de quimera não poderia ser usado para mapear os aminoácidos envolvidos na ligação de MAbs 2,78 ou 2.1029, porque aqueles que reagem de forma cruzada com ambos NOTUM humano e camundongo. Com base na constatação que MAbs 1.802, 1.815, 1.846, 2,78 e 2.1029 interferem com ligação a outro, mutagênese de rastreamento de alanina de resíduos de aminoácidos carregados nas proximidades de D141 humano foi realizada. Cinco mutantes de

NOTUM de humano foram construídos, cada um com um par de resíduos carregados mudados por alaninas: NOTUM de humano N132A/R133A (SEQ ID NO: 96); NOTUM E134A/N135A (SEQ ID NO: 97); NOTUM de humano D137A/R139A (SEQ ID NO: 98); NOTUM de humano R144A/R145A (SEQ ID NO: 99); e NOTUM de humano R150A/D151A (SEQ ID NO: 100). Todos os cinco mutantes humanos foram efetivamente expressos e secretados após transfecção transiente. Quatro dos cinco mutantes exibiram atividade significativa no ensaio de OPTS enquanto o quinto (NOTUM de humano D137A/R139A) mostrou pouca ou nenhuma atividade. Todos os cinco mutantes foram detectados em formato de ELISA por pelo menos alguns dos MAb de campanha 1 e campanha 2. MAb 2.78 falhou ao ligar NOTUM de humano D137A/R139A e NOTUM de humano R144A/R145A, enquanto MAb 1.802, 1.815 e 1.846 falharam ao ligar apenas NOTUM R144A/R145A. MAb 2.1029 foi imunorreativo com todos os cinco dos mutantes de alanina.

#### 6.8. Afinidades de Ligação de Anticorpos Neutralizantes de NOTUM

[00197] Afinidades de ligação de determinados MAb anti-NOTUM foram determinadas usando um Biacore 3000. Para obter valores de afinidade significativa para ligação à proteína de NOTUM de camundongo multimérica, fragmentos FAb de anticorpos gerados pela digestão de todo IgG com a protease Ficin, seguida de remoção de IgG não digerido e fragmentos Fc por cromatografia de afinidade de proteína. Os valores de afinidade para ligação de FAb e todo IgG a NOTUM de humano correspondiam, e seus valores de afinidade foram a única faixa de nM baixa de dois dígitos, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Afinidade de ligação de determinados anticorpos gerados contra NOTUM de humano e camundongo

Afinidade para NOTUM humano			
<u>Anticorpo</u> ou <u>fragmento</u>	<u>K<sub>D</sub> (nM)</u>	<u>k<sub>on</sub> (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</u>	<u>k<sub>off</sub> (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</u>
1.802 IgG	1,42	2,57 x 10 <sup>5</sup>	3,65 x 10 <sup>-4</sup>

1.802 Fab	0,91	$8,99 \times 10^5$	$8,20 \times 10^{-4}$
2.78 IgG	17,6	$4,79 \times 10^4$	$8,41 \times 10^{-4}$
2.78 Fab	15,4	$8,77 \times 10^4$	$1,36 \times 10^{-3}$
2.1029 IgG	5,99	$1,51 \times 10^5$	$9,08 \times 10^{-4}$
Afinidade para NOTUM de camundongo			
<u>Anticorpo</u> ou <u>fragmento</u>	<u>K<sub>D</sub> (nM)</u>	<u>k<sub>on</sub> (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</u> 1)	<u>k<sub>off</sub> (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</u>
1.802 Fab	<i>Nenhuma ligação observada</i>		
2.78 Fab	4,99	$3,91 \times 10^4$	$1,95 \times 10^{-4}$

#### 6.9. Administração de Anticorpos Neutralizantes de NOTUM para Camundongos

6.9.1. Administração de anticorpos neutralizantes de NOTUM semanalmente durante 8 semanas

[00198] Camundongos híbridos de oito semanas de idade machos F1 (129 X C57) foram administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.1029 ou 2.78b, ou um anticorpo de controle, por injeção intraperitoneal de 30 mg/kg uma vez por semana durante oito semanas. Havia 12 camundongos por grupo. No final do estudo, os camundongos foram sacrificados. A massa e arquitetura ósseas foram determinadas por microCT após a necropsia, usando um Scanco  $\mu$ CT40 com um valor limite de 240, um tempo de integração de 200 milissegundos e uma tensão de tubo de raios-X de 55 keV.

[00199] Como mostrado na Figura 6, a espessura cortical do eixo médio do fêmur aumentou 12% ( $P < 0,001$ ) com administração de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.1029 e 16% ( $P < 0,001$ ) com administração de anticorpo neutralizante de NOTUM 2.78b, em comparação com o anticorpo de controle.

6.9.2. Administração de Anticorpos Neutralizantes de NOTUM 2.1029 semanalmente durante 4 semanas

[00200] Camundongos híbridos de oito semanas de idade machos F1 (129 X C57) foram administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.1029 por

injeção intraperitoneal em 3 mg/kg, 10 mg/kg ou 30 mg/kg uma vez por semana durante quatro semanas. Havia 10 camundongos por grupo. No final do estudo, os camundongos foram sacrificados. A massa e arquitetura ósseas foram determinadas por microCT após a necropsia, usando um Scanco  $\mu$ CT40 com um valor limite de 240, tempo de integração de 200 milissegundos e uma tensão de tubo de raios-X de 55 keV.

[00201] Como mostrado na Figura 7, a espessura cortical do eixo médio do fêmur aumentou 5% ( $P = 0,12$ ) com a administração de 30 mg/kg de anticorpo neutralizante de NOTUM 2.1029, em relação à administração do anticorpo de controle.

6.9.3. Administração de Anticorpos Neutralizantes de NOTUM 2.78b semanalmente durante 4 semanas

[00202] Camundongos híbridos de oito semanas de idade machos F1 (129 x C57) foram administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b por injeção intraperitoneal em 3 mg/kg, 10 mg/kg ou 30 mg/kg uma vez por semana durante quatro semanas. Havia 10 camundongos por grupo no primeiro experimento. Em um segundo experimento, anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b foram administrados por injeção intraperitoneal em 0,3 mg/kg, 1 mg/kg ou 3 mg/kg uma vez por semana durante quatro semanas. Havia 12 camundongos por grupo no segundo experimento. No final de cada estudo, os camundongos foram sacrificados. A massa e arquitetura ósseas foram determinadas por microCT após a necropsia, utilizando Scanco  $\mu$ CT40 com um valor limite de 240, tempo de integração de 200 milissegundos e uma tensão de tubo de raios-X de 55 keV.

[00203] Como mostrado na Figura 8A, a espessura cortical do eixo médio do fêmur aumentou 13% ( $P < 0,001$ ), 17% ( $P < 0,001$ ) e 16% ( $P < 0,001$ ) com administração de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente, de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b, em relação à administração do anticorpo de controle, no primeiro experimento. Como mostrado na Figura 8B, a espessura cortical do eixo

médio do fêmur aumentou de 3% ( $P = 0,46$ ), 7% ( $P = 0,01$ ) e 10% ( $P < 0,001$ ) com administração de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente, de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b, em relação à administração do anticorpo de controle, no segundo experimento.

#### 6.9.4. Administração de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b semanalmente durante 4 semanas com pré-tratamento de zoledronato

[00204] Camundongos híbridos de vinte e oito semanas de idade machos F1 (129 x C57) foram administrados uma dose única de 50 µg/kg de zoledronato por injeção intraperitoneal. Quatro semanas após a dose de zoledronato, os camundongos foram administrados 10 mg/kg de anticorpo neutralizante de NOTUM 2.78b por injeção i.p. semanalmente durante 4 semanas. No final de cada estudo, os camundongos foram sacrificados. Havia 11 ou 12 camundongos por grupo. A massa e arquitetura ósseas foram determinadas por microCT após a necropsia, utilizando um Scanco µCT40 com um valor limite de 240, tempo de integração de 200 milissegundos e uma tensão de tubo de raios-X de 55 keV. Além disso, os níveis séricos de PINP, que é um marcador da formação óssea, foram medidos usando um ensaio de ELISA disponível no mercado (Immunodiagnostic Systems, Scottsdale, AZ) no 7º dia após a primeira dose de Mab 2.78b.

[00205] Como indicado na Figura 9A, a espessura cortical do eixo médio do fêmur aumentou por 10 µm, ou 4% ( $P = 0,31$ ), camundongos administrados por anticorpo de controle e zoledronato, em relação a camundongos administrados por anticorpo de controle e solução salina. A espessura cortical do eixo médio do fêmur aumentou por 23 µm, ou 9% ( $P < 0,001$ ), em camundongos administrados por anticorpo neutralizante de NOTUM 2.78b sem pré-tratamento de zoledronato, em relação camundongos administrados por anticorpo de controle e solução salina, e aumentou por 14 µm, ou 5% ( $P = 0,06$ ), em camundongos administrados por anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b com pré-tratamento de zoledronato, em

relação a camundongos administrado por anticorpo de controle e zeledronato. A Figura 9B mostra que níveis séricos de PINP diminuíram 15 ng/mL, ou 50% ( $P < 0,001$ ) em camundongos administrados por tratamento de zolendronato e anticorpo controle, em relação a camundongos administrados por solução salina e anticorpo de controle. Níveis de PINP aumentaram 14 ng/mL, ou 47% ( $P < 0,001$ ) em camundongos administrados por anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b sem pré-tratamento de zoledronato, em relação a camundongos administrados por anticorpo de controle e solução salina, e aumentou 12 ng/mL, ou 79% ( $P < 0,001$ ) em camundongos administrados por anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b com pré-tratamento de zoledronato, em relação a camundongos administrados por anticorpo de controle e zolendronato.

#### 6.9.5. Administração de Anticorpos Neutralizantes de NOTUM 2.78a durante 4 semanas

[00206] Para este experimento, Mab 2,78 (também conhecido como “2.78b”), que é um anticorpo IgG2b, foi reformatado como um anticorpo IgG2a (anticorpos IgG2a muitas vezes têm meia-vida mais longa do que anticorpos IgG2b). Mab 2.78 reformatado é referido como “2.78a.”

[00207] Camundongos híbridos de treze semanas de idade machos F1 (129 X C57) foram administrados por anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78a por injeção intraperitoneal em 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg uma vez por semana durante quatro semanas. Havia 10 ou 12 camundongos por grupo. No final de cada estudo, os camundongos foram sacrificados. A massa e arquitetura ósseas foram determinadas por microCT após a necropsia, utilizando um Scanco  $\mu$ CT40 com um valor limite de 240, tempo de integração de 200 milissegundos e uma tensão de tubo de raios-X de 55 keV.

[00208] Como mostrado na Figura 10, a espessura cortical do eixo médio do fêmur aumentou de 3% ( $P = 0,57$ ), 7% ( $P = 0,02$ ), 9% ( $P = 0,002$ ) e 10% ( $P < 0,001$ )

com administração de 0,3 mg/gk 1 mg/kg, 3 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78a em tal experimento.

6.9.6. Administração de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78a semanalmente ou quinzenalmente durante 12 semanas

[00209] Camundongos híbridos de dez semanas de idade machos F1 (129 x C57) foram administrados com um anticorpo de controle, 0,3 mg/kg de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78a por injeção i.p. semanalmente durante 12 semanas ou 1 mg/kg de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78a por injeção i.p. quinzenalmente durante 12 semanas ou 24 semanas. Havia doze camundongos, por grupo de administração. No final de cada estudo, os camundongos foram sacrificados. A massa e arquitetura ósseas foram determinadas por microCT após a necropsia, utilizando um Scanco  $\mu$ CT40 com um valor limite de 240, um tempo de integração de 200 milissegundos e uma tensão de tubo de raios-X de 55 keV.

[00210] Como mostrado na Figura 11A, a espessura cortical do eixo médio do fêmur aumentou 6% ( $P < 0,001$ ) e 9% ( $P < 0,001$ ) em camundongos administrados por 0,3 mg/kg semanalmente e 1 mg/kg quinzenalmente, respectivamente, de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78a durante 12 semanas. De forma similar, como mostrado na Figura 11B, a espessura cortical do eixo médio do úmero aumentou 5% ( $P = 0,007$ ) e 7% ( $P < 0,001$ ) em camundongos administrados por 0,3 mg/kg semanalmente e 1 mg/kg quinzenalmente, respectivamente, de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78a durante 12 semanas.

[00211] Como mostrado na Figura 12A, a espessura cortical do eixo médio do fêmur aumentou 7% ( $P = 0,002$ ) e 9% ( $P < 0,001$ ) em camundongos administrados por 0,3 mg/kg semanalmente e 1 mg/kg quinzenalmente, respectivamente, de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78a durante 24 semanas. Como mostrado na Figura 12B, a espessura cortical do eixo médio do úmero aumentou de 3% ( $P = 0,09$ ) e 8% ( $P < 0,001$ ) em camundongos administrados por 0,3 mg/kg semanalmente e 1



mg/kg quinzenalmente, respectivamente, de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78a durante 24 semanas. Finalmente, como mostrado na Figura 12, a espessura cortical da nona costela 7% ( $P = 0,02$ ) e 9% ( $P = 0,003$ ) em camundongos administrados por 0,3 mg/kg semanalmente e 1 mg/kg quinzenalmente, respectivamente, de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78a durante 24 semanas.

#### 6.10. Administração de anticorpos neutralizantes de NOTUM para camundongos ovariectomizados

##### 6.10.1. Ovariectomia

[00212] Camundongos C57BL/6J de dezesseis semanas de idade albinos femininos foram submetidos a ovariectomia ou a cirurgia de controle. Níveis séricos de PINP, que é um marcador da formação óssea, e CTX, que é um marcador de reabsorção óssea, foram medidos utilizando um ensaio de ELISA disponível no mercado (sistemas de imunodiagnóstico, Scottsdale, AZ) no intervalo após ovariectomia e antes da administração de anticorpos neutralizantes de NOTUM, para confirmar que a remodelação óssea aumentada foi ocorrendo após a ovariectomia.

[00213] Após cirurgia e antes do início do tratamento, os camundongos ovariectomizados mostraram remodelação óssea aumentada em relação a camundongos de cirurgia de simulação, conforme mostrado na Tabela 4. Uma vez que o osso trabecular contém muitas células de osso mais do que o osso cortical, esses dados provavelmente refletem a remodelação óssea trabecular principalmente aumentada.

Tabela 4: Níveis de marcador ósseo após a cirurgia

<u>Marcador</u>	<u>Semanas após a cirurgia</u>	<u>Cirurgia de Controle</u> (N=10)	<u>Cirurgia de OVX</u> (N=10)	<u>Estatísticas</u>
PINP (ng/ml)	1	36,4 ± 0,9	50,6 ± 5,3	$\Delta = 39\%$ $P = 0,02$
CTX	2	10,5 ± 0,9	14,1 ± 0,9	$\Delta = 33\%$

(ng/ml)				P = 0,01
PINP (ng/ml)	4	41,2 ± 2,3	54,8 ± 2,5	$\Delta$ = 33% P = 0,001

6.10.2. Administração de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b para camundongos ovariectomizados

[00214] Os anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b ou um anticorpo de controle foi administrado em 10 mg/kg por injeção intraperitoneal uma vez por semana durante 4 semanas, a partir de 8 semanas após a cirurgia. O estudo incluiu os grupos de tratamento, mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Grupos de tratamento em estudo de ovariectomia (OVX)

<u>Número de Camundongos</u>	<u>Cirurgia</u>	<u>Anticorpo</u>
13	Simulação	Controle
13*	Simulação	NOTUM
10	OVX	Controle
11	OVX	NOTUM

\* Havia originalmente 14 camundongos neste grupo, mas um camundongo morreu durante o estudo.

[00215] Para avaliar a localização e a extensão da nova formação de osso, marcações de osso com fluorocromo foram administradas nos dias 7, 14 e 21 de tratamento (ou seja, com os 2º, 3º e 4º tratamentos). A calceína, que fluoresce verde, foi administrada no dia 7; alizarina, que fluoresce vermelho, foi administrada no dia 14; e tetraciclina, que fluoresce amarelo, foi administrada no dia 21. Os camundongos foram sacrificados no fim do tratamento de 4 semanas. O peso uterino na necropsia confirmou que a cirurgia de ovariectomia foi bem sucedida. (Dados não mostrados).

6.10.3. Massa e Arquitetura Ósseas em Camundongos Ovariectomizados tratados com anticorpos neutralizantes de NOTUM

[00216] A massa e arquitetura ósseas foram determinadas por microCT após a necropsia, usando um Scanco  $\mu$ CT40 com um valor de limite de 240, um tempo de

integração de 200 milissegundos e uma tensão de tubo de raio-x de 55 keV. O eixo médio do fêmur, corpo vertebral LV5 e colo do fêmur foram escaneados.

[00217] Como mostrado na Figura 13A, a espessura do eixo médio do fêmur cortical aumentou 22  $\mu\text{m}$ , ou 9%, em camundongos de cirurgia de simulação administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b, em relação à cirurgia de simulação de camundongos administrados com anticorpos controle, e aumentaram 26  $\mu\text{m}$ , ou 12%, camundongos ovariectomizados administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b, em relação aos camundongos ovariectomizados administrados com anticorpo de controle. Como mostrado na Figura 13B, a área do osso mineralizado do eixo médio do fêmur aumentou em 0,1  $\text{mm}^2$ , ou 11%, em camundongos de cirurgia de simulação administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b, em relação à camundongos de cirurgia de simulação administrados com anticorpo de controle e aumentaram por 0,08  $\text{mm}^2$ , ou 10%, nos camundongos ovariectomizados administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b em relação aos camundongos ovariectomizados administrads com o anticorpo de controle.

[00218] Como mostrado na Figura 14A, a proporção no corpo vertebral LV5 de volume ósseo total (cortical e trabecular) para o volume total aumentou 9% em camundongos de cirurgia de simulação administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b em relação aos camundongos de cirurgia de simulação administrados com o anticorpo de controle e aumentou de 3% em camundongos ovariectomizados administrados com anticorpo neutralizante de NOTUM 2.78b, em relação aos camundongos ovariectomizados administrados com anticorpo de controle. Como mostrado na Figura 14B, a proporção no corpo vertebral LV5 do volume ósseo cortical para o volume total aumentou 13% em camundongos de cirurgia de simulação administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b, em relação aos camundongos de cirurgia sham administrados com anticorpo de controle e aumentou

9% em camundongos ovariectomizados administrados com anticorpo neutralizante de NOTUM 2.78b, em relação aos camundongos ovariectomizados administrados com anticorpo de controle. Como mostrado na Figura 14C, a proporção do corpo vertebral LV5 de volume ósseo trabecular para o volume total não foi significativamente afetada pela administração de anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b nos camundongos de cirurgia de simulação ou camundongos ovariectomizados.

[00219] Finalmente, conforme mostrado na Figura 15, a proporção do volume ósseo do colo femoral para o volume total aumentou por 4% em camundongos de cirurgia de simulação administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b, em relação aos camundongos de cirurgia sham administrados com anticorpo de controle e aumentou 6% em camundongos ovariectomizados administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b, em relação aos camundongos ovariectomizados administrados com anticorpo de controle.

#### 6.10.4. Histomorfometria do Osso em Camundongos Ovariectomizados Tratados com Anticorpos Neutralizantes de NOTUM

[00220] Os eixos de fêmur foram incorporados em metilmetacrilato usando um protocolo de incorporação rápida. Consulte Brommage e Valle, *Calcified Tissue Int'l* 67:479 (2000). As seções transversais do eixo médio com uma espessura de cerca de 80 µm foram preparadas usando uma serra de osso Leica SP160O. As seções, em seguida, foram examinadas com um microscópio fluorescente Olympus BX60. Vários parâmetros de histomorfométrica do osso foram determinados utilizando o software OsteoMeasure™ (OsteoMetrics, Decatur, GA). Ambos os parâmetros estáticos (como a área do osso e espessura) e os parâmetros dinâmicos (como superfície de marcação única (SLS), taxa de aposição de minerais (MAR) e taxa de formação óssea (BFR)) foram medidos em 100 x de ampliação.

[00221] A Figura 16 mostra a porcentagem da superfície endocortical da seção transversal do eixo médio do fêmur que foram marcadas com calceína, que foi

administrada no dia 7, com alizarina, que foi administrada no dia 14, e com tetraciclina, que foi administrada no dia 21. A Tabela 6 mostra a análise estatística dos dados na Figura 16. Os camundongos administrados com anticorpos Neutralizantes de NOTUM 2.78b mostraram uma porcentagem significativamente maior de marcação de endocortical nos dias 7 e 14 em comparação com os camundongos administrados com anticorpos de controle.

**Tabela 6: ANOVA de Dois Fatores da % de Superfície de Marcação Única**

ANOVA de dois fatores	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Efeito da Ovariectomia	P = 0,16	P = 0,65	P = 0,28
Efeito do Tratamento	P < 0,001	P < 0,001	P = 0,02
Efeito da Interação	P = 0,66	P = 0,74	P = 0,77

[00222] A Figura 17 mostra a taxa aposicional de mineral (A) e a taxa de formação de osso referente ao volume (B) da cirurgia de simulação e camundongos ovariectomizados que foram administrados com anticorpo de controle ou anticorpo neutralizante de NOTUM 2.78b. A taxa aposicional de mineral (Figura 17A) foi determinada medindo a distância entre a marcação de calceína (dia 7) e a marcação de alizarina (dia 14) e dividindo por 7 para obter a “taxa dos dias 7 e 14” e medindo a distância entre a marcação de alizarina (dia 14) e a marcação de tetraciclina (dia 21) e dividindo por 7 para obter a “taxa dos dias 14 a 21”. A Tabela 7 mostra a análise estatística dos dados na Figura 17A. Os camundongos administrados com anticorpos neutralizantes de NOTUM 2.78b mostraram uma maior taxa de aposição mineral do que os camundongos administrados com anticorpo de controle durante o período de tempo de dias 7 e 14.

**Tabela 7: ANOVA de dois fatores de Taxa Aposicional de Mineral**

ANOVA de dois fatores	Dias 7 a 14	Dias 14 a 21
Efeito de Ovariectomia	P = 0,80	P = 0,70
Efeito de Tratamento	P < 0,001	P = 0,82
Efeito da Interação	P = 0,86	P = 0,02

[00223] A taxa de formação de osso referente ao volume (Figura 17B) foi determinada pelos cálculos padrões envolvendo a multiplicação da superfície de mineralização endocortical (porcentagem de superfície marcada em dobro mais uma metade da superfície marcada uma vez, derivado Figura 16), pela taxa de aposição mineral (ver Figura 17A). O resultado é a taxa de formação óssea dividida pelo volume ósseo, expresso em porcentagem por 7 dias. A Tabela 8 mostra a análise estatística de um dos dados na Figura 17B. Como é evidente na Figura 17B, a taxa de formação de osso por volume ósseo é significativamente maior em camundongos neutralizantes de NOTUM 2.78b do que em camundongos administrados com anticorpo de controle.

Tabela 8: ANOVA de dois fatores de Taxa de Formação Óssea Referente ao Volume

<u>ANOVA de dois fatores</u>	<u>Dias 7 a 14</u>	<u>Dias 14 a 21</u>
Efeito de Ovariectomia	P = 0,95	P = 0,80
Efeito de Tratamento	P < 0,001	P < 0,001
Efeito da Interação	P = 0,39	P = 0,30

#### 6.11. Identificação de Espécies apropriadas para Testes de anticorpos neutralizantes de NOTUM

[00224] Com base em alinhamentos de sequência de proteínas multiespécies retiradas de domínio público, foi previsto que o MAb 1.802, 1.815 e 1.846 se ligaria à NOTUM de porquinho da Índia e que esta espécie, portanto, poderia ser mais adequada para estudos pré-clínicos. Para testar essa hipótese, NOTUM de porquinho da Índia foi clonado e expresso por transfecção transiente e demonstrou ser ativo no ensaio de OPTS. Os MAb 1.802, 1.815 e 1.846 mostraram se ligar a NOTUM de porquinho da Índia por ELISA e o MAb 1.802 mostrou neutralizar a atividade de NOTUM de porquinho da Índia no ensaio de OPTS. O MAb 2.78 se ligou a NOTUM de porquinho da Índia com afinidade menor do que o MAb 1.802 e teve atividade de inibição correspondentemente menor no ensaio de OPTS. O MAb 2.1029 se ligou a NOTUM de porquinho da Índia apenas fracamente e não inibiu significativamente o

mesmo no ensaio de OPTS.

[00225] NOTUM de macaco cinomolgo e rhesus foram clonados a partir de preparações de cDNA dessas espécies. A análise de sequências revelou que o aminoácido na posição equivalente ao NOTUM D141 humano é uma asparagina, que é diferente do aminoácido naquela posição tanto no NOTUM de camundongo quanto no de humano. Proteínas de NOTUM de Cinomolgos e de rhesus ativas (conforme determinado pelo ensaio de OPTS) foram geradas por transfecção transiente e verificou-se que o MAb 1.802 não se liga nem inibe qualquer proteína. Um mutante pontual de NOTUM humano ativo, NOTUM de D141N humano, foi gerado por transfecção transiente, e verificou-se que o MAb 1.802 não se liga ao mutante pontual de NOTUM humano.

[00226] O MAb 2.78 se liga tanto ao NOTUM de Cinomolgos quanto de rhesus fracamente por ELISA, mas não inibe qualquer proteína significativamente no ensaio de OPTS. Em contraste, o MAb 2.1029 se liga tanto a NOTUM de macaco cinomolgo quanto Rhesus por ELISA bem como se liga a NOTUM de humano, e também inibiu ambas as proteínas no ensaio de OPTS bem como inibiu NOTUM de humano.

#### 6.12. Humanização e Sequenciamento de Anticorpo

[00227] As regiões variáveis de cadeia pesada e leve foram sequenciadas por RT-PCR específico usando o RNA total de linhagem de células de hibridoma relevantes seguido de sequenciamento do produto por PCR. As regiões variáveis de cadeia pesada e leve de quatro anticorpos de Campanha 1: 1.731, 1.802, 1.815 e 1.846 e três anticorpos de Campanha 2: 2.1029, 2.55 e 2.78, foram sequenciadas. As sequências da região variável, sem sequências sinais, para cada um desses anticorpos são mostradas na Seção 7 (Tabela de Sequências), abaixo. A Seção 7 também mostra as sequências para a cadeia leve e pesada de CDR1, CDR2 e CDR3 para cada um dos anticorpos. A Tabela a seguir mostra as SEQ ID NOs correspondentes para as regiões de variáveis de cadeia leve e pesada e para CDR1,

CDR2 e CDR3, para cada um dos anticorpos.

Tabela 9: SEQ ID NOs para regiões variáveis de cadeias pesadas e leves e

CDRs

<u>Anticorpo de</u> <u>camundongo</u>	<u>Região variável de</u> <u>cadeia pesada</u> <u>SEQ ID NO</u> <u>(CDR1, CDR2,</u> <u>CDR3 SEQ ID</u> <u>NOs)</u>	<u>Região variável de</u> <u>cadeia leve</u> <u>SEQ ID NO</u> <u>(CDR1, CDR2,</u> <u>CDR3 SEQ ID NOs)</u>
1.731	7 (9, 10, 11)	8 (12, 13, 14)
1.802	15 (17, 18, 19)	16 (20, 21, 22)
1.815	23 (25, 26, 27)	24 (28, 29, 30)
1.846	31 (33, 34, 35)	32 (36, 37, 38)
2.1029	39 (41, 42, 43)	40 (44, 45, 46)
2.55	47 (49, 50, 51)	48 (52, 53, 54)
2.78	55 (57, 58, 59)	56 (60, 61, 62)

[00228] Certas CDRs de cadeia leve e pesada foram verificadas como tendo alta homologia entre dois ou mais dos anticorpos sequenciados. Os MAb 1.802 e 1.846 compartilham uma CDR1 de cadeia pesada idêntica (GFTFSDYGMH; SEQ ID NOs: 17 e 33), enquanto a CDR1 de cadeia pesada do MAb 1.815 (GFTFSDFGMH; SEQ ID NO: 25) difere dos MAb 1.802 e 1.846 por apenas uma substituição conservativa de aminoácido fenilalanina (F) no lugar de Tirosina (Y). A sequência de consenso para a CDR1 de cadeia pesada desses anticorpos é, portanto, GFTFSDX<sub>1</sub>GMH (SEQ ID NO: 90), em que X<sub>1</sub> é F ou Y. A CDR3 de cadeia pesada dos MAb 1.802 e 1.846 diferem por apenas uma substituição conservativa de aminoácidos (histidina (H) versus asparagina (N)). A sequência de consenso para a CDR3 de cadeia pesada dos anticorpos é, portanto, KX<sub>2</sub>YNGGYFDV (SEQ ID NO: 91), em que X<sub>2</sub> é H ou N. Os MAb 1.802 e 1.846 compartilham uma CDR2 de cadeia leve idêntica (LASNLES; SEQ ID NO: 21 e 37), enquanto a CDR2 de cadeia leve do



MAB 1.815 (LASDLES; SEQ ID NO: 29) difere dos MABs 1.802 e 1.846 por apenas uma substituição conservativa de aminoácidos (ácido aspártico (D) no lugar de asparagina (N)). A sequência de consenso para a cadeia leve CDR2 desses anticorpos é, portanto, LASX6LES (SEQ ID NO: 93), em que X<sub>6</sub> é D ou N. Finalmente, uma sequência de consenso para a CDR1 de cadeia leve para os três anticorpos de Campanha 1, 1.802, 1.846 e 1.815, é RASKX<sub>3</sub>VSX<sub>4</sub>SGYSYX<sub>5</sub>H (SEQ ID NO: 92), onde X<sub>3</sub> é I ou S, X<sub>4</sub> é T ou E, e X<sub>5</sub> é M ou L.

[00229] A busca por BLAST foi realizada em bancos de dados públicos para identificar as sequências da região variável de linhagem germinativa com maior similaridade para cada uma das regiões variáveis de cadeia de leve e pesada de camundongo. Usando a definição de AbM, as CDRs das regiões variáveis de camundongo então foram enxertados *in silico* nessas sequências variáveis de linhagem germinativa no lugar da linhagem germinativa de CDRs. As regiões variáveis humanizadas resultantes dos anticorpos de camundongo (2.78, 2.1029, 1.802 1.815 e 1.846) foram sintetizadas com uma sequência líder 5' de codificação no peptídeo sinal na estrutura e clonadas a montante das regiões constantes IgG2 humana no caso das sequências variáveis de cadeia pesada ou região constante kappa humana no caso das sequências de variáveis de cadeia leve. As sequências para cada uma das regiões variáveis humanizadas são mostradas na Seção 7 (Tabela de Sequências), abaixo, juntamente com as sequências para as cadeias pesadas e leves humanizadas (sem o peptídeo sinal).

[00230] As sequências de codificação para cadeias pesadas e leves humanizadas de comprimento total foram subclonadas em vetores de expressão de mamíferos e os construtos de cadeia leve e pesada correspondentes foram cotransfectados em células de CHO-S. Os meios condicionados resultantes foram verificados por Western blotting com um anticorpo anti-humano secundário para confirmar a expressão e secreção de anticorpo humanizado intacto. Os meios

condicionados, em seguida, foram testados em formato de ELISA para determinar se os anticorpos humanizados mantiveram a capacidade para ligar a proteína de NOTUM humana. Os MAbs humanizados 1.802, 1.815, 1.846 e 2.1029 se ligaram a NOTUM humano enquanto o MAb 2.78 humanizado exibiu pouca ou nenhuma ligação quer a NOTUM de humano ou de camundongo.

[00231] Todas as referências citadas acima são incorporadas neste documento por referência em sua totalidade para qualquer finalidade.

#### 7.Tabela de Sequências

SEQ ID NO	Descrição	Sequência
1	NOTUM de humano	MGRGVRVLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRMLSSR DWPRTTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYP AIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLF D EAQLTVDNVH LTGQPVQEGL RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
2	NOTUM de camundongo	MGGEVRVLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QQPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFI PYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ

		YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN
3	NOTUM de humano S232A	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRMLSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SAAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLF D EAQLTVDNVH LTGQPVQEGL RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVQAP QGLEPSELLG MLSNGS
4	NOTUM de camun- dongo S239A mutante	MGGEVRVLLL LGLLHWVGGG EGRKTWRRRG QQPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFI PYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSAA GGTGVLLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN

5	NOTUM de porqui- nho-da- índia	MGRGVRVFL LGLLHWAGGG EGRKTWRRRG QQPAPAPLPP QRTEAAPGTG QPVESFPLDF TAVEGNMDSF MAQVKSLAQS LYPCSAQQLN EDLRLHLLLN TSVTCNDGSP AGYYLKESKG SRRWLLFLEG GWYCFSRENC DSRYDTMRRL MSSKDWPQTR TGTGILSSQP EENPYWWNAN MVFIPYCSD VWSGASSKSE KNEYVFMGAL IIREVVQELL GRGLSGAKVL LLAGSSAGGT GVLLNVDRVA EQLEQLGYPA IQVRGLADSG WFLDNKQYRR TDCVDTVTC PTEAIRRGIR YWNGMVERC RSQFKEGEEW NCFLGYKVYP TLRCPVFVQ WLFDEAQLTA DNAHLTGQPV QEGQWLYIQN LGHELRLNTLK DVPASFAPAC LSHEIIIRSH WTDVQVKGTS LPRALHCWDR SLHDSHKASK TPLKGCPIHL VDSCPWPHCN PSCPTIRDQF TGQEMNVAQF LMHMGFDVQT VAQQQGLEPS KLLGMLSSGS
	NOTUM de macaco cino- molgo	MGRGVRVLLL LGLLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY NTMRRLMSSR DWPRTTRTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE ELGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKIYPTLRC PVFVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQESQ RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKTSKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAAQ QGPEPSKLLG LPSDGS
6	NOTUM de macaco rhesus	MGRGVRVLLL LGLLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY NTMRRLMSSR DWPRTTRTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL

		NVDRVAEQLE ELGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKIYPTLRC PVFVWQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQESQ RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKNSKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAQQ QGPEPSKLLG LPSDGS
7	Região variável de cadeia pesada de MAb 1.731	EVQLQQSGPE LVKPGASVKV SCKASGYPFT DYFIHWVKQT HGKSLEWIGY FFPKNGANGY NQKFEGKVTL TVDKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARRY GNYYSMDYWG QGTSVTVSSA KTPP
8	Região variável de cadeia leve de MAb 1.731	SFVMTQTPKF LLVSAGDRV ITCKASQSVG DDVAWYQQKP GQSPTLLIYR VSNRYTGVPD RFTGSGYGTD FTFTINTVQA EDLAVYFCQQ DYSSPYTFGG GTQLEVKRAD AAP
9	CDR1 de cadeia pesada de MAb 1.731	GYPFTDYFIH
10	CDR2 de cadeia pesada de MAb 1.731	YFFPKNGANG
11	CDR3 de cadeia pesada de	RYGNYYSMDY

	MAb 1.731	
12	CDR1 de cadeia leve de MAb 1.731	KASQSVGDDVA
13	CDR2 de cadeia leve de MAb 1.731	RVSNRYT
14	CDR3 de cadeia leve de MAb 1.731	QQDYSSPYT
15	Região variável de cadeia pesada de MAb 1.802	EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DYGMHWFRQA PEKGLEWVAY ISSGSRTVYY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLS LQMTSLRSED TAMYYCARKH YNGGYFDVWG TGTTVTVSSA KTPP
16	Região variável de cadeia leve de MAb 1.802	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKIVS TSGYSYMHVY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIIH PVEEEDAATY YCQHSRELPP TFGSGTKLEI KRADAAP
17	CDR1 de cadeia pesada de	GFTFSDYGMH

	MAb 1.802	
18	CDR2 de cadeia pesada de MAb 1.802	YISSGSRTVY
19	CDR3 de cadeia pesada de MAb 1.802	KHYNGGYFDV
20	CDR1 de cadeia leve de MAb 1.802	RASKIVSTSGYSYMH
21	CDR2 de cadeia leve de MAb 1.802	LASNLES
22	CDR3 de cadeia leve de MAb 1.802	QHSRELPPT
23	Região variável de cadeia pesada de MAb	DVQLLESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS DFGMHWVRQA PEKGLEWVAY SSSGGTTVYY ADTVKGRLTL SRDNSKNTLF LEMTSLRSED TAMYYCARAS YDGGYFDCWG QGTSLTVSSA KTTTP

	1.815	
24	Região variável de cadeia levMAb 1.815 e	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYIHWY QQKPGQPPKL LIYLASDLES GVPARFSGSG SGAAFTLNIH PVEEEDAATY YCHHSRELPF TFGSGTKLEI KRADAAP
25	CDR1 de cadeia pesada de MAb 1.815	GFTFSDFGMH
26	CDR2 de cadeia pesada de MAb 1.815	YSSSGGTTVY
27	CDR3 de cadeia pesada de MAb 1.815	ASYDGGYFDC
28	CDR1 de cadeia leve de MAb 1.815	RASKSVSTSGYSYIH
29	CDR2 de cadeia leve de MAb 1.815	LASDLES
30	CDR3 de	HHSRELPFT



	cadeia leve de MAb 1.815	
31	Região variável de cadeia pesada de MAb 1.846	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DYGMHWLRQA PEKGLEWVAY ISSGSTTLSY ANTMKGRFTI SRDNAKKTLS LQMTSLRSED TAIYYCARKN YNGGYFDVWG TGTTVTVSSA KTPP
32	Região variável de cadeia leve de MAb 1.846	DIVLTQSPAS LVVSLGQRAT ISCRASKSVS ESGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEGDATTY YCQHSRVLPP TFGSGTKLEI KRADAAP
33	CDR1 de cadeia pesada de MAb 1.846	GFTFSDYGMH
34	CDR2 de cadeia pesada de MAb 1.846	YISSGSTTLS
35	CDR3 de cadeia pesada de MAb 1.846	KNYNGGYFDV
36	CDR1 de	RASKSVSESGYSYMH

	cadeia leve de MAb 1.846	
37	CDR2 de cadeia leve de MAb 1.846	LASNLES
38	CDR3 de cadeia leve de MAb 1.846	QHSRVLPPT
39	Região variável de cadeia pesada MAb 2.1029	QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT SYGVHWVRQP PGKGLEWLGV IWAGGSTNYN SALMSRLSIS KDNSKSQVFL KMNSLQTDDT AIYFCARDGD YGTIYAMDYW GQGTSVTVSS AKTTAPS
40	Região variável de cadeia leve MAb 2.1029	DIQMTQTTSS LSASLGDRV T ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFTGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GKTLPRTFGG GTMLEIKRAD AAP
41	CDR1 de cadeia pesada de MAb 2.1029	GFSLTSGVH
42	CDR2 de cadeia	VIWAGGSTN

	pesada de MAb 2.1029	
43	CDR3 de cadeia pesada de MAb 2.1029	DGDYGTIYAMDY
44	CDR1 de cadeia leve de MAb 2.1029	RASQDISNYLN
45	CDR2 de cadeia leve de MAb 2.1029	YTSRLHS
46	CDR3 de cadeia leve de MAb 2.1029	QQGKTLPR
47	Região variável de cadeia pesada de MAb 2.55	EVQLQQSGTV LARPGALVKM SCKASGYTFT SYWMHWVKQR PGQGLEWIGA IYPGKSDTRY NQKFKDKAKL TAVTSTSTAY MDLSSLTDED SAVYYCSRRY GNFYAMDYWG QGTSVTVSSA KTTAPS
48	Região variável de cadeia leve de	SIVMTQTPKF LLVSAGDRV TMTCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPELLIY ASDRYTGVPD RFTGSGYGTD FTLTISTVQA EDLAVYFCQQ DYSSPYTFGG GTKLETKRAD AAP

	MAb 2.55	
49	CDR1 de cadeia pesada de MAb 2.55	GYTFTSYWMH
50	CDR2 de cadeia pesada de MAb 2.55	AIYPGKSDTR
51	CDR3 de cadeia pesada de MAb 2.55	RYGNFYAMDY
52	CDR1 de cadeia leve de MAb 2.55	KASQSVSNDVA
53	CDR2 de cadeia leve de MAb 2.55	YASDRYT
54	CDR3 de cadeia leve de MAb 2.55	QQDYSSPYT
55	Região variável de cadeia pesada de MAb 2.78	DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY ITSGSGAIYY ADTVRGRFTI SRDTPKNTLF LQMTSLRSED TAMYYCARSA DGLDYWGQGT SVTVSSAKTT PPS
56	Região variável	DIQMTQSPAS LYVSVGETVT ITCRASENIY SNLAWYQQKQ GKSPQLLVYG ATNLADGVPS RFSGSGSGTQ YSLKINSLKS

	de cadeia leve de MAb 2.78	EDFGSYQCQH FWGTPFTFGS GTKLEIKRAD AAP
57	CDR1 de cadeia pesada de MAb 2.78	GFTFSSFGMH
58	CDR2 de cadeia pesada de MAb 2.78	YITSGSGAIY
59	CDR3 de cadeia pesada de MAb 2.78	SADGLDY
60	CDR1 de cadeia leve de MAb 2.78	RASENIYSNLA
61	CDR2 de cadeia leve de MAb 2.78	GATNLAD
62	CDR3 de cadeia leve de MAb 2.78	QHFWGTPFT
63	região variável de cadeia pesada Ab 2.78	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVS Y ITSGSGAIY ADSVKGRFTI SRD NAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSA DGLDYWGQGT TVTVSS

	(HumAb) huma- nizado	
64	Cadeia pesada de HumAb 2.78	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVSY ITSGSGAIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSA DGLDYWGQGT TVTVSSDVWG QGTTTVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFAVLQSSG LYSLSVTV TSSNFGTQTY TCNVDHKPSN TKVDKTVRK CCVECPPCPA PPVAGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VQFNWYVDGM EVHNAKTKPR EEQFNSTFRV VSVLTVVHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPAPI EKTISKTKGQ PREPQVYTL PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPMLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
65	Região variável de cadeia leve de HumAb 2.78	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SNLAWYQQKP GKAPKLLIYG ATNLADGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH FWGTPFTFGQ GTKVEI
66	Cadeia leve de HumAb 2.78	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SNLAWYQQKP GKAPKLLIYG ATNLADGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH FWGTPFTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
67	Região variável de cadeia pesada de HumAb	QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGFSLT SYGVHWIRQP PGKGLEWIGV IWAGGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDGD YGTIYAMDYW GQGTLVTVSS

	2.1029	
68	Cadeia pesada de HumAb 2.1029	QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGFSLT SYGVHWIRQP PGKGLEWIGV IWAGGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDGD YGTIYAMDYW GQGTLVTVSS DVWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVTSSNFG TQTYTCNVDH KPSNTKVDKT VERKCCVECP PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY VDGMEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVLTV VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
69	Região variável de cadeia leve de HumAb 2.1029	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ GKTLPRTFGG GTKVEI
70	Cadeia leve de HumAb 2.1029	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ GKTLPRTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
71	Região variável de cadeia pesada de HumAb 1.802	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWWSY ISSGSRTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKH YNGGYFDVWG QGTLVTVSS
72	Cadeia	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA

	pesada de HumAb 1.802	PGKGLEWWSY ISSGSRTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKH YNGGYFDVWG QGTLVTVSSD VWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVTSSNFGT QTYTCNVDPHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGMEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
73	Região variável de cadeia leve de MAb 1.802	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKIVS TSGYSYMHWWY QQKPGQPPKL LIYLAASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRELPP TFGQGTKLEI
74	Cadeia leve de HumAb 1.802	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKIVS TSGYSYMHWWY QQKPGQPPKL LIYLAASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRELPP TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLKADY EKHVKYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
75	Região variável de cadeia pesada de HumAb 1.815	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFGMHWIRQA PGKGLEWWSY SSSGGTTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAS YDGGYFDCWG QGTTVTVSS
76	Cadeia pesada de HumAb	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFGMHWIRQA PGKGLEWWSY SSSGGTTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAS YDGGYFDCWG QGTTVTVSSD



	1.815	VWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVTSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGMEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
77	Região variável de cadeia leve de HumAb 1.815	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS TSGYSYIHWY QQKPGQPPKL LIYLASDLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHSRELPF TFGQGTKLEI
78	Cadeia leve de HumAb 1.815	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS TSGYSYIHWY QQKPGQPPKL LIYLASDLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHSRELPF TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
79	Região variável de cadeia pesada de HumAb 1.846	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVS Y ISSGSTTLY ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKN YNGGYFDVWG QGTLVTVSS
80	Cadeia pesada de HumAb 1.846	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVS Y ISSGSTTLY ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKN YNGGYFDVWG QGTLVTVSSD VWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV

		VTVTSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGMEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
81	Região variável de cadeia leve de HumAb 1.846	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS ESGYSYMHWWY QKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRVLPP TFGQGKLEI
82	Cadeia leve de HumAb 1.846	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS ESGYSYMHWWY QKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRVLPP TFGQGKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
90	CDR1 de consenso de cadeia pesada de Campanha 1	GFTFSDX <sub>1</sub> GMH
91	CDR3 de consenso de cadeia pesada de Campanha 1	KX <sub>2</sub> YNGGYFDV
92	CDR1 de	RASKX <sub>3</sub> VSX <sub>4</sub> SGYSYX <sub>5</sub> H

	consenso de cadeia leve de Campa- nha 1	
93	CDR2 de consenso de cadeia leve de Campa- nha 1	LASX <sub>6</sub> LES
83	NOTUM quimé- rico de humano- camun- dongo	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYP AIQVR GLADSGWFLD NKQYRRSDCI DTINCAPTD A IRRGIRYWSG MVERCQRQF KEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGQ WLYIQNLGRE LRGTLKDVQA SFAPACLSHE IIRSYWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSFHD SHKASKTPMK GCPFHLVDSC PWPHCNPSCP TIRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAAQ QGMEPSKLLG MLSNGN
84	NOTUM quimé- rico de camun- dongo- humano	MGGEVRVLLL LGLLHWVGGG EGRKTWRRRG QQPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSTRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFI PYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRHTDCVDTI TCAPTAIRR GIRYWNGVVP ERCRRQFQEG

		EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGRLRY IQNLGRELRLH TLKDVPA SFA PACLSHEIII RSHWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSLHDSHK ASKTPLKGCP VHLVDSCPWP HCNPSCPTVR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD MQTVAQPQGL EPSELLGMLS NGS
85	NOTUM quimé- rico de humano- camun- dongo- humano	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRMLSSR DWPRTTRGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASPKSDKNEY AFMGSLIQE VVRELLGKGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAELLE ELGYPSIQVR GLADSGWFLD NKQYRRSDCI DTINCAPTD A IRRGIRYWSG MVERCQRQF KEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLF D EAQLTVDNVH LTGQPVQEG RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
86	NOTUM quimé- rico de camun- dongo- humano- camun- dongo	MGGEVRVLLL LGLLHWVGG S EGRKTWRRRG QQPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFI PYC SSDVWSGASS KSEKNEYAFM GALIQEVVR ELLGRGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAEQLEKLG YPAIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRHTDCVDTI TCAPTEAIRR GIRYWNGVVP ERCRRQFQEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGRELRLG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN
87	NOTUM	MPLLLLLPLL WAGALAQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV

	de humano ( $\Delta 1-46$ ); CD33 de peptídeo sinal em itálico	KSLAQSLYPC LKESRGSRRW DWPRTTRTGTG ASSKSEKNEY SSAGGTGVLL NKQYRHTDCV QEGEEWNCFF LTGQPVQEGL IIIRSHWTDV GCPVHLVDSC GFDMQTVAQP	SAQQLNEDLR LLFLEGGWYC ILSSQPEENP AFMGALIIQE NVDRVAEQLE DTITCAPTEA GYKVYPTLRC RLYIQNLGRE QVKGTSPLRA PWPHCNPSCP QGLEPSELLG	LHLLLNTSVT FNRENCDSRY YWWNANMVFI VVRELLGRGL KLGYP AIQVR IRRGIRYWNG PVFVVQWLFD LRHTLKD VPA LHCWDRSLHD TVRDQFTGQE MLSNGS	CNDGSPAGYY DTMRRLMSSR PYC SSDVWSG SGAKVLLLAG GLADSGWFLD VPERCRRQF EAQLTVDNVH SFAPACLSHE SHKASKTPLK MNVAQFLMHM
88	NOTUM de humano N96D	MGRGVRVLLL AAPAAGQPVE SAQQLNEDLR LLFLEGGWYC ILSSQPEENP AFMGALIIQE NVDRVAEQLE DTITCAPTEA GYKVYPTLRC RLYIQNLGRE QVKGTSPLRA PWPHCNPSCP QGLEPSELLG	LSLLHCAGGS SFPLDFTAVE LHLLLDTSVT FNRENCDSRY YWWNANMVFI VVRELLGRGL KLGYP AIQVR IRRGIRYWNG PVFVVQWLFD LRHTLKD VPA LHCWDRSLHD TVRDQFTGQE MLSNGS	EGRKTWRRRG GNMDSFMAQV CNDGSPAGYY DTMRRLMSSR PYC SSDVWSG SGAKVLLLAG GLADSGWFLD VPERCRRQF EAQLTVDNVH SFAPACLSHE SHKASKTPLK MNVAQFLMHM	QQPPPPPRTE KSLAQSLYPC LKESRGSRRW DWPRTTRTGTG ASSKSEKNEY SSAGGTGVLL NKQYRHTDCV QEGEEWNCFF LTGQPVQEGL IIIRSHWTDV GCPVHLVDSC GFDMQTVAQP
89	NOTUM de humano Q47-M177	QPVE SAQQLNEDLR LLFLEGGWYC ILSSQPEENP	SFPLDFTAVE LHLLLNTSVT FNRENCDSRY YWWNANM	GNMDSFMAQV CNDGSPAGYY DTMRRLMSSR	KSLAQSLYPC LKESRGSRRW DWPRTTRTGTG
94	NOTUM de humano	MGRGVRVLLL AAPAAGQPVE SAQQLNEDLR	LSLLHCAGGS SFPLDFTAVE LHLLLNTSVT	EGRKTWRRRG GNMDSFMAQV CNDGSPAGYY	QQPPPPPRTE KSLAQSLYPC LKESRGSRRW

	D141S	LLFLEGGWYC FNRENCDSRY STMRRMLSSR DWPRTTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYP AIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQP VQEGL RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTV AQP QGLEPSELLG MLSNGS
95	NOTUM de camun- dongo S148D	MGGEVRVLLL LGLLHWVGG S EGRKTWRRRG QQPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYDTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFI PYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGREL RG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAAQQQGM EPSKLLGMLS NGN
96	NOTUM de humano N132A/R1 33A	MGRGVRVLLL LSLHLCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FAAENCDSRY DTMRRMLSSR DWPRTTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYP AIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQP VQEGL

		RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
97	NOTUM de humano E134A/N1 35A	MGRGVRVLLL LSLLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRAACDSRY DTMRRMLSSR DWPRTTRTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYP AIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGL RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
98	NOTUM de humano D137A/R1 39A	MGRGVRVLLL LSLLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCASAY DTMRRMLSSR DWPRTTRTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYP AIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGL RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
99	NOTUM de	MGRGVRVLLL LSLLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC

	humano R144A/R1 45A	SAQQLNEDLR LLLLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMAALMSSR DWPRTTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGL RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
100	NOTUM de humano R150A/D1 51A	MGRGVRVLLL LSLLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LLLLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSA AWPRTTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGL RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
101	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia pesada	ATGGACTCCA GGCTCAATTT AGTTTTCTT GTCCTTATTT TAAAAGGTGT CCAGTGTGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTA GTGAAGCCTG GAGGGTCCCT GAAACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC TTTAGTGAC TATGGAATGC ACTGGTTTCG TCAGGCTCCA GAGAAGGGGC TGGAGTGGGT TGCATATATT AGTAGTGGCA GTAGAACCGT CTACTATGCA GACACAGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATG CCAAGAACAC CCTGTCCCTG CAAATGACCA GTCTGAGGTC



	1.802	TGAGGACACG GCCATGTATT ACTGTGCGAG GAAACATTAC AACGGTGGAT ACTTCGATGT CTGGGGCACA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGCCAAA ACGACACCCC CATCTGTCTA TCCACTGGCC CCTGGATCTG CTGCCCCAAC TAACTCCATG GTGACCCTGG GATGC
102	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia leve 1.802	ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CCTGTTATGG GTACTGCTGC TCTGGGTTCC AGGTTCCACT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCCTGCT TCCTTAGCTG TATCTCTGGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAATTGTC AGTACATCTG GCTATAGTTA TATGCACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCGCCCAA CTCCTCATCT ATCTTGCATC CAACCTAGAA TCTGGGGTCC CTGCCAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGAGGA TGCTGCAACC TATTACTGTC AGCACAGTAG GGAGCTTCCT CCCACGTTCT GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GT
103	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia pesada 1.815	TCTGACAGAG GAGCCAAGCC CTGGATTCCC AGGTCCTCAC ATTCAGTGAT CAGCACTGAA CACAGACCAC TCACCATGGA CTCCAGGCTC AATTTAGTTT TCCTTGTCCT TATTTTAAAA GGTGTCCAGT GTGATGTGCA ACTGCTGGAA TCTGGGGGAG GCTTAGTGCA GCCTGGAGGG TCCCGGAAAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACTTTCA GTGACTTTGG AATGCACTGG GTTTCGTCAGG CTCCAGAGAA GGGGCTGGAG TGGGTCGCAT ACAGTAGTAG TGGCGGTACT ACCGTCTACT ATGCAGACAC GGTGAAGGGC CGACTCACCC TCTCCAGAGA CAATTCCAAG AACACCCTGT TCCTGGAAAT GACCAGTCTA AGGTCTGAGG ACACGGCCAT GTATTACTGT GCAAGAGCGT CCTATGATGG AGGGTACTTT GACTGCTGGG GCCAAGGCAC CTCTCTCACA GTCTCCTCAG CCAAACGAC ACCCCCATCT GTCTATCCAC TGGCCCCTGG ATCTGCTGCC CAAACTAACT CCATGGTGAC

		CCTGGGATGC
104	Sequência de polinucleotídeos de região variável de cadeia leve 1.815	ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CCTGTTATGG GTACTGCTGC TCTGGGTTCC AGGTTCCACT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCCTGCT TCCTTAGCTG TATCTCTGGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAAAGTGTC AGTACATCTG GCTATAGTTA TATACACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCACCCAAA CTCCTCATCT ATCTTGATC CGACCTAGAA TCTGGGGTCC CTGCCAGGTT CAGTGGCAGT GGATCTGGGG CAGCCTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGAGGA TGCTGCAACC TATTACTGTC ACCACAGTAG GGAGCTTCCA TTCACGTTCTG GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GTGCCTCAGT CGTGTGC
105	Sequência de polinucleotídeos de região variável de cadeia pesada 1.846	AGAGGAGCCA AACCCTGGAT TCCCAGGTCC TCACATTCAG TGATCAGCAC TGAACACAGA CCACTCACCA TGGACTCCAG GCTCAATTTA GTTTTCCTTG TCCTTATTTT AAAAGGTGTC CAGTGTGAGG TGCAGCTGGT GGAGTCTGGG GGAGACTTAG TGAAGCCTGG AGGGTCCCTG AACTCTCCT GTGCAGCCTC TGGATTCACT TTCAGTGACT ATGGAATGCA CTGGCTTCGT CAGGCTCCAG AGAAGGGGCT GGAGTGGGTT GCATATATTA GTAGTGGCAG TACTACCCTC TCCTATGCAA ACACAATGAA GGCCGATTC ACCATCTCCA GAGACAATGC CAAGAAAACC CTGTCCCTGC AAATGACCAG TCTGAGGTCT GAGGACACGG CCATTTATTA CTGTGCGCGG AAAAATTACA ACGGTGGTTA CTTCGATGTC TGGGGCACAG GGACCACGGT CACCGTCTCC TCAGCCAAAA CAACACCCCC ATCAGTCTAT CCACTGGCCC CTGGGTGTGG AGATACAACT GGTTCCCTCTG TGA CTCTGGG ATGCCTGGTC AAGGG
106	Sequência de polinucleo	ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CCTGTTATGG GTACTGCTGC TCTGGGTTCC AGGTTCCACT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCCTGCT TCCTTAGTTG

	tídeos de região variável de cadeia leve 1.846	TATCTCTGGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAAAGTGTC AGTGAATCTG GCTATAGTTA TATGCACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCACCCAAA CTCCTCATCT ATCTTGATC CAACCTAGAG TCTGGGGTCC CTGCCAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGGGGA TGCTACAACC TATTACTGTC AGCACAGTAG GGTCTTCCT CCCACGTTCC GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GTGC
107	Sequência de polinucleo tídeos de região variável de cadeia pesada 2.78	GACAGAGGAG CCAAGCCCTG GATTCCCAGG TCCTCACATT CAGTGATCAG CACTGAACAC AGACCACTCA CCATGGACTC CAGGCTCAAT TTAGTTTTCC TTGTCCTTAT TTAAAAGGT GTCCAGTGTG ATGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCT TAGTGCAGCC TGGAGGGTCC CGGAAACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTC ACTTTCAGTA GCTTTGGCAT GCACTGGGTT CGTCAGGCTC CAGAGAAGGG ACTGGAGTGG GTCGCATACA TTACTAGTGG CAGTGGTGCC ATCTACTATG CAGACACAGT GAGGGGCCGA TTCACCATCT CCAGAGACAC TCCCAAGAAC ACCCTGTTCC TGCAGATGAC CAGTCTAAGG TCTGAGGACA CGGCCATGTA TTAGTGTGCA AGATCGGCTG ATGGTTTGGA CTACTGGGGT CAAGGAACCT CAGTCACCGT CTCCTCAGCC AAAACAACAC CCCCATCAGT CTATCCACTG GCCCCTGGGT GTGGAGATAC AACTG
108	Sequência de polinucleo tídeos de região variável de cadeia leve 2.78	CAGCCTCACA CTGATCACAC ACAGACATGA GTGTGGCCAC TCAGGTCCTG GGGTTGCTGC TGCTGTGGCT TACAGATGCC AGATGTGACA TCCAGATGAC TCAGTCTCCA GCCTCCCTAT ATGTATCTGT GGGAGAACT GTCACCATCA CATGTCGAGC AAGTGAGAAT ATTTACAGTA ATTTAGCATG GTATCAGCAG AAACAGGGAA AATCTCCTCA GCTCCTGGTC TATGGTGCAA CAAACCTAGC AGATGGTGTG CCATCAAGGT TCAGTGGCAG TGGATCAGGC ACACAGTATT CCCTCAAGAT CAACAGCCTG

		AAGTCTGAAG ATTTTGGGAG TTATTACTGT CAACATTTTT GGGGTACTCC ATTCACGTTT GGCTCGGGGA CAAAGTTGGA AATAAACGG GCTGATGCTG CACCAACTGT ATCCATCTTC CCACCATCCA GTGAGCAGTT AACATCTGGA GGTGCCTCAG TCGTGTGC
109	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia pesada 2.1029	ATCTCCTCAC TAGAGCCCC ATCAGAGCAT GGCTGTCCTG GTGCTGTTCC TCTGCCTGGT TGCATTTCCA AGCTGTGTCC TGTCCCAGGT GCAGCTGAAG GAGTCAGGAC CTGGCCTGGT GGCGCCCTCA CAGAGCCTGT CCATCACTTG CACTGTCTCT GGGTTTTCAT TAACCAGCTA TGGTGTACAC TGGGTTCCGC AGCCTCCAGG AAAGGGTCTG GAGTGGCTGG GAGTAATATG GGCTGGTGGA AGCACAAATT ATAATTCGGC TCTCATGTCC AGACTGAGCA TCAGCAAAGA CAACTCCAAG AGCCAAGTTT TCTTAAAAAT GAACAGTCTG CAACTGATG ACACAGCCAT CTACTTCTGT GCCAGAGATG GCGACTACGG TACTATCTAC GCTATGGACT ACTGGGGTCA AGGAACCTCA GTCACCGTCT CCTCAGCCAA AACACAGCC CCATCGGTCT ATCCACTGGC CCCTGTGTGT GGAGATACAA CTGGCTCCTC GGTGACTCTA GGATGCCTGG TCAAGG
110	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia leve 2.1029	ATTGAAGTCA AGACTCAGCC TGGACATGAT GTCCTCTGCT CAGTTCCTTG GTCTCCTGTT GCTCTGTTTT CAAGGTACCA GATGTGATAT CCAGATGACA CAGACTACAT CCTCCCTGTC TGCCTCTCTG GGAGACAGAG TCACCATCAG TTGCAGGGCA AGTCAGGACA TTAGCAATTA TTAAACTGG TATCAGCAGA AACCAGATGG AACTGTATAA CTCCTGATCT ACTACACATC AAGATTACAC TCAGGAGTCC CATCAAGGTT CACTGGCAGT GGGTCTGGAA CAGATTATTC TCTCACCATT AGCAACCTGG AGCAAGAAGA TATTGCCACT TACTTTTGCC AACAGGGTAA AACGCTTCCT CGGACGTTCT GTGGAGGCAC CATGCTGGAA ATCAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GTGCCTCAGT CGTGTGC

111	Sequência de polinucleotídeos de região variável de cadeia pesada de Ab humanizado (HumAb) 2.78 s	<p>gaggtgcagc tggaggagag cggcgggcgc ctggtgcagc ccggcggcag</p> <p>cctgagactg agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc agcttcggca tgcactgggt</p> <p>gagacaggcc cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac atcaccagcg</p> <p>gcagcggcgc catctactac gccgacagcg tgaagggcag attcaccatc</p> <p>agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag</p> <p>agccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaagcgcc gacggcctgg</p> <p>actactgggg ccagggcacc accgtgaccg tgagcagc</p>
112	Sequência de polinucleotídeos de cadeia pesada HumAb 2.78	<p>ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTTG</p> <p>CACTGCAGGC TCAAGCGGAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG</p> <p>CGGCGGCCTG GTGCAGCCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC</p> <p>TGCGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTCAGCAGC TTCGGCATGC</p> <p>ACTGGGTGAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT</p> <p>GAGCTACATC ACCAGCGGCA GCGGCGCCAT CTACTACGCC</p> <p>GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG</p> <p>CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGC</p> <p>CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AAGCGCCGAC</p> <p>GGCCTGGACT ACTGGGGCCA GGCACCACC GTGACCGTGA</p> <p>GCAGCGATGT GTGGGGCCAG GGCACCACCG TGACCGTGAG</p> <p>CAGCGCGTCG ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCG</p> <p>CCCTGCTCCA GGAGCACCTC CGAGAGCACA GCGGCCCTGG</p> <p>GCTGCCTGGT CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT</p> <p>GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC TGACCAGCGG CGTGACACC</p> <p>TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA</p> <p>GCAGCGTGGT GACCGTGACC TCCAGCAACT TCGGCACCCA</p> <p>GACCTACACC TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC</p> <p>AAGGTGGACA AGACAGTTGA GCGCAAATGT TGTGTCGAGT</p>

		GCCCACCCTG CCCAGCACCA CCTGTGGCAG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCCAGAGGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCATGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCACGTT CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCGTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAACCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACACCTCCCA TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTACA CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGA
113	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia leve HumAb 2.78	gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc atcacctgca gagccagcga gaacatctac agcaacctgg cctggtacca gcagaagccc ggcaaggccc ccaagctgct gatctacggc gccaccaacc ggccgacgg cgtgccagc agattcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc gaggacttcg ccacctacta ctgccagcac ttctggggca ccccttcac ctccggccag ggcaccaagg tggagatc
114	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de cadeia	ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTAATCCAGC TTGGGCAGAC ATCCAGATGA CCCAGAGCCC CAGCAGCCTG AGCGCCAGCG TGGGCGACAG AGTGACCATC ACCTGCAGAG CCAGCGAGAA CATCTACAGC AACCTGGCCT GGTACCAGCA GAAGCCCGGC AAGGCCCCCA AGCTGCTGAT

	leve HumAb 2.78	CTACGGCGCC ACCAACCTGG CCGACGGCGT GCCCAGCAGA TTCAGCGGCA GCGGCAGCGG CACCGACTTC ACCCTGACCA TCAGCAGCCT GCAGCCCGAG GACTTCGCCA CCTACTACTG CCAGCACTTC TGGGGCACCC CCTTCACCTT CGGCCAGGGC ACCAAGGTGG AGATCAAACG TACGGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTCACAG AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT GA
115	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia pesada de HumAb 2.1029	caggtgcagc tgcaggagag cggccccggc ctggtgaagc ccagcgagac cctgagcctg acctgcaccg tgagcggctt cagcctgacc agctacggcg tgcactggat cagacagccc cccggcaagg gcctggagtg gatcggcgtg atctggggccg gcggcagcac caactacaac cccagcctga agagcagagt gaccatcagc gtggacacca gcaagaacca gttcagcctg aagctgagca gcgtgaccgc cgccgacacc gccgtgtact actgcgccag agacggcgac tacggcacca tctacgcat ggactactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc
116	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de cadeia pesada HumAb 2.1029	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTTG CACTGCAGGC TCAAGCGCAG GTGCAGCTGC AGGAGAGCGG CCCCGGCCTG GTGAAGCCCA GCGAGACCCT GAGCCTGACC TGCACCGTGA GCGGCTTCAG CCTGACCAGC TACGGCGTGC ACTGGATCAG ACAGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGAT CGGCGTGATC TGGGCCGGCG GCAGCACCAA CTACAACCCC AGCCTGAAGA GCAGAGTGAC CATCAGCGTG GACACCAGCA AGAACCAGTT CAGCCTGAAG CTGAGCAGCG TGACCGCCGC CGACACCGCC GTGTACTACT GCGCCAGAGA CGGCGACTAC

		GGCACCATCT ACGCCATGGA CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT GAGCAGCGAT GTGTGGGGCC AGGGCACCCAC CGTGACCGTG AGCAGCGCGT CGACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GGCGTGACA CCTTCCCGGC TGTCTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGA CCTCCAGCAA CTTCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTCGA GTGCCCACCG TGCCCAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACGTGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCATGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTT CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACACAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA
117	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região	gacatccaga tgacccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc atcacctgca gagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagac tgcacagcgg cgtgcccagc agattcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccttca ccatcagcag cctgcagccc gaggacatcg



	variável de cadeia leve HumAb 2.1029	ccacctacta ctgccagcag ggcaagaccc tgcccagaac cttcggcggc ggcaccaagg tggagatc
118	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de cadeia leve HumAb 2.1029	ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTACTCCAGC TTGGGCAGAC ATCCAGATGA CCCAGAGCCC CAGCAGCCTG AGCGCCAGCG TGGGCGACAG AGTGACCATC ACCTGCAGAG CCAGCCAGGA CATCAGCAAC TACCTGAACT GGTACCAGCA GAAGCCCGGC AAGGCCCCCA AGCTGCTGAT CTACTACACC AGCAGACTGC ACAGCGGCGT GCCCAGCAGA TTCAGCGGCA GCGGCAGCGG CACCGACTTC ACCTTCACCA TCAGCAGCCT GCAGCCCGAG GACATCGCCA CCTACTACTG CCAGCAGGGC AAGACCCTGC CCAGAACCTT CGGCGGCGGC ACCAAGGTGG AGATCAAACG TACGGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTCACAG AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT GA
119	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia pesada HumAb	gaggtgcagc tgggtgagag cggcgggcggc ctgggtgcagc ccggcgggcag cctgagactg agctgcgccg ccagcggcctt caccttcagc gactacggca tgcactgggt gagacaggcc cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac atcagcagcg gcagcagaac cgtgtactac gccgacagcg tgaagggcag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag agacgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaaagcac tacaacggcg gctacttcga cgtgtggggc cagggcaccc tggtgaccgt

	1.802	gagcagc
120	Sequência de polinucleotídeos de cadeia pesada HumAb 1.802	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTTG CACTGCAGGC TCAAGCGGAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCCTG GTGCAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC TGCGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTAGCGAC TACGGCATGC ACTGGGTGAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACATC AGCAGCGGCA GCAGAACCGT GTACTACGCC GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AAAGCACTAC AACGGCGGCT ACTTCGACGT GTGGGGCCAG GGCACCCTGG TGACCGTGAG CAGCGATGTG TGGGGCCAGG GCACCACCGT GACCGTGAGC AGCGCGTCGA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG TCGTGGAAct CAGGCGCTCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCCGGCTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACCGTGACCT CCAGCAACTT CGGCACCCAG ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GACAGTTGAG CGCAAATGTT GTGTCGAGTG CCCACCGTGC CCAGCACCAC CTGTGGCAGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TGC GTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCATGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTTC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCGTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA

		ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CACCTCCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA
121	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia leve de HumAb 1.802	gacatcgtga tgacccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcca gagagccacc atcaactgca gagccagcaa gatcgtgagc accagcggct acagctacat gcactggtac cagcagaagc ccggccagcc cccaagctg ctgatctacc tggccagcaa cctggagagc ggcgtgcccg acagattcag cggcagcggc agcggcacccg acttcaccct gaccatcagc agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccagc acagcagaga gctgcccccc accttcggcc agggcaccaa gctggagatc
122	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de cadeia leve HumAb 1.802	ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTACTCCAGC TTGGGCAGAC ATCGTGATGA CCCAGAGCCC CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCGAGAG AGCCACCATC AACTGCAGAG CCAGCAAGAT CGTGAGCACC AGCGGCTACA GCTACATGCA CTGGTACCAG CAGAAGCCCG GCCAGCCCCC CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCAACCT GGAGAGCGGC GTGCCCCGACA GATTCAGCGG CAGCGGCAGC GGCACCGACT TCACCCTGAC CATCAGCAGC CTGCAGGCCG AGGACGTGGC CGTGTACTAC TGCCAGCACA GCAGAGAGCT GCCCCCACC TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTCAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC

		CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTGA
123	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia pesada HumAb 1.815	caggtgcagc tggaggagag cggcggcggc ctggtgaagc ccggcggcag cctgagactg agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc gacttcggca tgcactggat cagacaggcc cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac agcagcagcg gcggcaccac cgtgtactac gccgacagcg tgaagggcag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagccagc tacgacggcg gctacttcga ctgctggggc cagggcacca ccgtgaccgt gagcagc
124	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de cadeia pesada HumAb 1.815	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTTG CACTGCAGGC TCAAGCGCAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCCTG GTGAAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC TGCGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTAGCGAC TTCGGCATGC ACTGGATCAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACAGC AGCAGCGGCG GCACCACCGT GTACTACGCC GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AGCCAGCTAC GACGGCGGCT ACTTCGACTG CTGGGGCCAG GGCACCACCG TGACCGTGAG CAGCGATGTG TGGGGCCAGG GCACCACCGT GACCGTGAGC AGCGCGTCGA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG TCGTGGAACCT CAGGCGCTCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCCGGCTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACCGTGACCT CCAGCAACTT CGGCACCCAG ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GACAGTTGAG CGCAAATGTT GTGTCGAGTG CCCACCGTGC CCAGCACCAC CTGTGGCAGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAACC CAAGGACACC

		<p>CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TCGTG GTGG  TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG  GTACGTGGAC GGCATGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG  CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTTC CGTGTGGTCA  GCGTCCTCAC CGTCGTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA  GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCAGCC  CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAA GGGCAGCCCC  GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA  GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA  GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA  ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CACCTCCCAT  GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC  ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT  CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC  ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA</p>
125	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia leve HumAb 1.815	<p>gacatcgtga tgaccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcga  gagagccacc atcaactgca gagccagcaa gagcgtgagc accagcgggt  acagctacat ccactggtac cagcagaagc ccggccagcc cccaagctg ctgatctacc  tgccagcga cctggagagc ggcgtgcccg acagattcag cggcagcggc  agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc agcctgcagg ccgaggacgt  ggcgtgtac tactgccacc acagcagaga gctgcccttc accttcggcc agggcaccaa  gctggagatc</p>
126	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de cadeia leve HumAb	<p>ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT  CTACTCCAGC TTGGGCAGAC ATCGTGATGA CCCAGAGCCC  CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCGAGAG AGCCACCATC  AACTGCAGAG CCAGCAAGAG CGTGAGCACC AGCGGCTACA  GCTACATCCA CTGGTACCAG CAGAAGCCCG GCCAGCCCCC  CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCGACCT GGAGAGCGGC  GTGCCCGACA GATTCAGCGG CAGCGGCAGC GGCACCGACT</p>

	1.815	TCACCCTGAC CATCAGCAGC CTGCAGGCCG AGGACGTGGC CGTGTACTAC TGCCACCACA GCAGAGAGCT GCCCTTCACC TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCGTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTGA
127	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia pesada HumAb 1.846	gaggtgcagc tgggtggagag cggcgggcggc ctggtgcagc ccggcgggcag cctgagactg agctgcgccg ccagcgggtt caccttcagc gactacggca tgcactgggt gagacaggcc cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac atcagcagcg gcagcaccac cctgagctac gccgacagcg tgaagggcag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag agacgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaaagaac tacaacggcg gctacttoga cgtgtggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcagc
128	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de cadeia pesada HumAb 1.846	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTTG CACTGCAGGC TCAAGCGGAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCCTG GTGCAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC TGCGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTAGCGAC TACGGCATGC ACTGGGTGAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACATC AGCAGCGGCA GCACCACCCT GAGCTACGCC GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AAAGAACTAC AACGGCGGCT ACTTCGACGT GTGGGGCCAG GGCACCCTGG TGACCGTGAG CAGCGATGTG TGGGGCCAGG GCACCACCGT

		GACCGTGAGC AGCGCGTCGA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG TCGTGGAAGT CAGGCGCTCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCCGGCTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACCGTGACCT CCAGCAACTT CGGCACCCAG ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GACAGTTGAG CGCAAATGTT GTGTCGAGTG CCCACCGTGC CCAGCACACAC CTGTGGCAGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TCGGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCATGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTTC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCGTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CACCTCCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA
129	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de região variável de cadeia	gacatcgtga tgacccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcga gagagccacc atcaactgca gagccagcaa gagcgtgagc gagagcggct acagctacat gcaactgtac cagcagaagc ccggccagcc cccaagctg ctgatctacc tggccagcaa cctggagagc ggcggtcccg acagattcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccagc acagcagagt gctgcccccc accttcggcc agggcaccaa gctggagatc

	leve de HumAb 1.846	
130	Sequên- cia de polinucleo- tídeos de cadeia leve HumAb 1.846	<p>[00232] ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG</p> <p>TTTCTCTGTT CTA CTCTCCAGC TTGGGCAGAC ATCGTGATGA</p> <p>CCCAGAGCCC CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCGAGAG</p> <p>AGCCACCATC AACTGCAGAG CCAGCAAGAG CGTGAGCGAG</p> <p>AGCGGCTACA GCTACATGCA CTGGTACCAG CAGAAGCCCCG</p> <p>GCCAGCCCCC CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCAACCT</p> <p>GGAGAGCGGC GTGCCCCGACA GATTCAGCGG CAGCGGCAGC</p> <p>GGCACC GACT TCACCCTGAC CATCAGCAGC CTGCAGGCCG</p> <p>AGGACGTGGC CGTGTACTAC TGCCAGCACA GCAGAGTGCT</p> <p>GCCCCCACC TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA</p> <p>CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT</p> <p>CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG</p> <p>CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG</p> <p>TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG</p> <p>AGAGTGTCAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG</p> <p>CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG</p> <p>AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC</p> <p>TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG</p> <p>TTGA</p>



### REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que se liga a pectinacetilesterase de notum humano (NOTUM) e neutraliza pelo menos uma atividade de NOTUM, em que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve, em que:

a) a região variável da cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 10, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11, e em que a região variável da cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 13, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 14; ou

b) a região variável da cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 91, e em que a região variável da cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 92, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 93, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22; ou

c) a região variável da cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 17, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 19, e em que a região variável da cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22; ou

d) a região variável da cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a

sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27, e em que a região variável da cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 92, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 93, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30; ou

e) a região variável da cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27, e em que a região variável da cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 28, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 29, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30; ou

f) a região variável da cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 90, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 91, e em que a região variável da cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 92, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 93, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 38; ou

g) a região variável da cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 35, e em que a região variável da cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 38; ou

h) a região variável da cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 41, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 43, e em que a região variável da cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 45, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46; ou

i) a região variável da cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 49, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 50, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 51, e em que a região variável da cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 52, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 53, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 54; ou

j) a região variável da cadeia pesada compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 58, e uma CDR3 tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 59, e em que a região variável da cadeia leve compreende uma CDR1 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 60, uma CDR2 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 61, e uma CDR3 tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 62.

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo reduz a atividade de NOTUM em um ensaio *in vitro* de 8-octanóil-oxipireno-1,3,6-trissulfonato trissódico (OPTS) e/ou reduz a atividade de NOTUM em um ensaio *in vitro* de sinalização Wnt.

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é formulado para ser administrado a um indivíduo e aumenta

níveis de PINP no soro *in vivo*, aumenta a densidade mineral óssea *in vivo*, aumenta a espessura cortical de fêmur no meio eixo *in vivo*, aumenta a área óssea do fêmur no meio eixo *in vivo*, aumenta a espessura cortical do úmero no meio eixo *in vivo*, aumenta a formação óssea endocortical *in vivo*, aumenta a proporção de volume ósseo cortical no corpo vertebral LV5 *in vivo* e/ou aumenta a proporção do volume ósseo do colo femoral para o volume total do colo femoral *in vivo*.

4. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo se liga a um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 com  $K_D$  menor que 50 nM, preferivelmente menor que 20 nM, ou mais preferivelmente menor que 10 nM.

5. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é selecionado de um anticorpo de camundongo, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado e um anticorpo humano.

6. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que:

a) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 7 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8; ou

b) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 15 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16; ou

c) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 71 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73; ou

d) a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 72 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 74; ou

e) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 23 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24; ou

f) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 75 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 77; ou

g) a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 76 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 78; ou

h) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 32; ou

i) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 79 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 81; ou

j) a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 80 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 82; ou

k) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 39 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 40; ou

l) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 67 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 69; ou

m) a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 68 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70; ou

n) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 47 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 48; ou

o) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 55 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 56; ou

p) a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 63 e a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 65; ou

q) a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 64 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 66.

7. Molécula de ácido nucléico, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende as sequências de nucleotídeos dentre:

- a) SEQ ID NOs: 101 e 102;
- b) SEQ ID NOs: 103 e 104;
- c) SEQ ID NOs: 105 e 106;
- d) SEQ ID NOs: 107 e 108;
- e) SEQ ID NOs: 109 e 110;
- f) SEQ ID NOs: 111 ou 112, e 113 ou 114;
- g) SEQ ID NOs: 115 ou 116, e 117 ou 118;
- h) SEQ ID NOs: 119 ou 120, e 121 ou 122;
- i) SEQ ID NOs: 123 ou 124, e 125 ou 126; ou
- j) SEQ ID NOs: 127 ou 128, e 129 ou 130;

e sequências degeneradas das mesmas, as quais codificam uma cadeia pesada ou uma cadeia leve do anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, preferivelmente a molécula de ácido nucleico compreende uma primeira sequência de polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada e uma segunda sequência de polinucleotídeo que codifica a cadeia leve.

8. Célula hospedeira, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucléico, conforme definida na reivindicação 7, em que a célula

hospedeira é uma célula *E. coli*.

9. Método para produzir um anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende incubar uma célula hospedeira que compreende a molécula de ácido nucleico, conforme definida na reivindicação 7, sob condições suficientes para expressar o anticorpo.

10. Composição farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e um diluente, veículo, solubilizante, emulsificante, conservante e/ou adjuvante farmacêuticamente aceitável.

11. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para uso na estimulação da formação óssea endocortical em um paciente.

12. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para uso no tratamento, gerenciamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio definido por perda óssea em um paciente.

13. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a doença ou distúrbio é osteoporose.

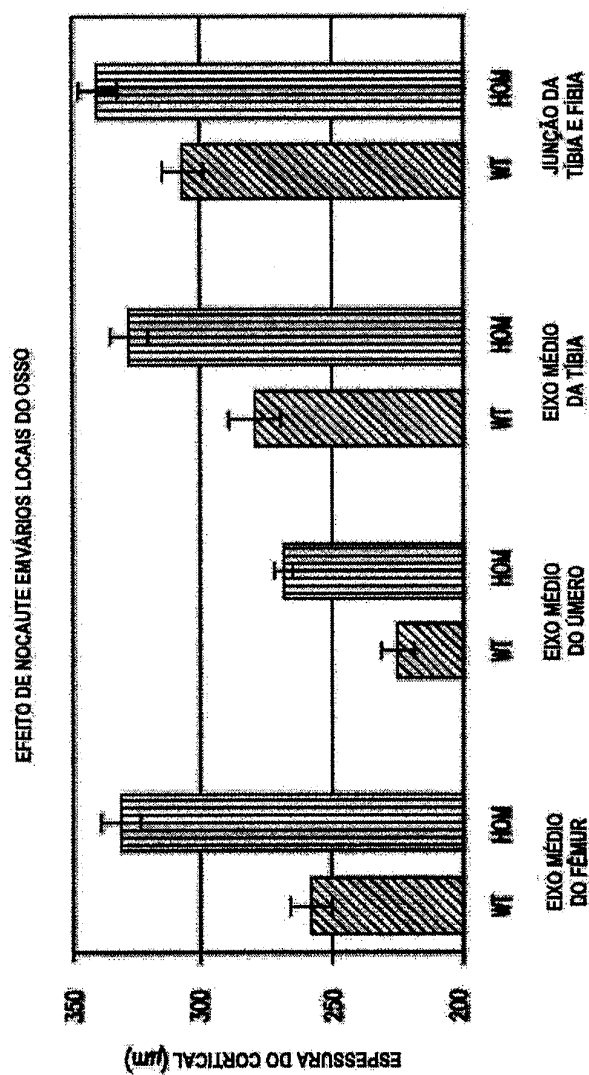


FIG. 1



ESPESSURA DO CORTICAL AUMENTADA EM CAMUNDONGOS HETEROZIGOTOS

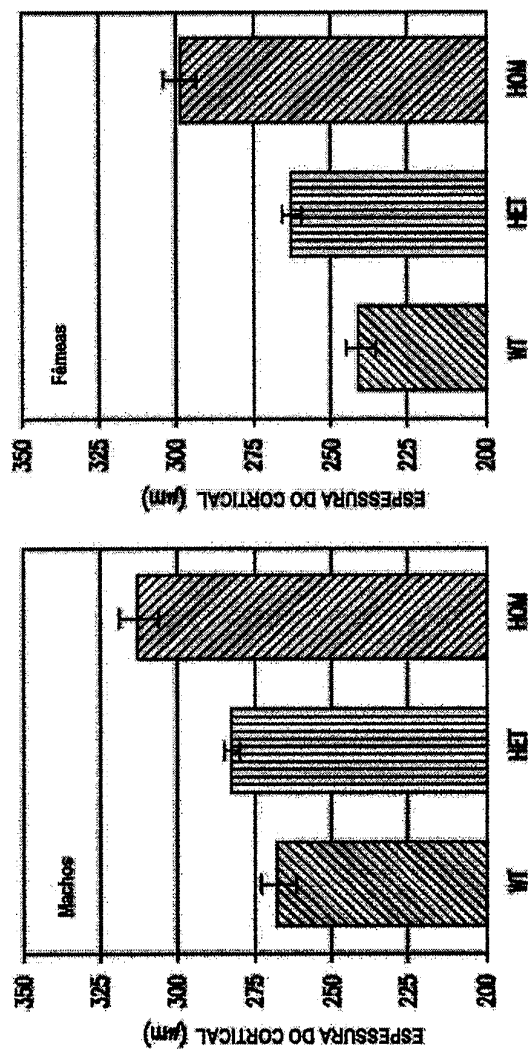


FIG. 2

## CAMUNDONGOS MACHOS APRESENTAM MAIOR RESISTÊNCIA À RUPTURA DO FÊMUR

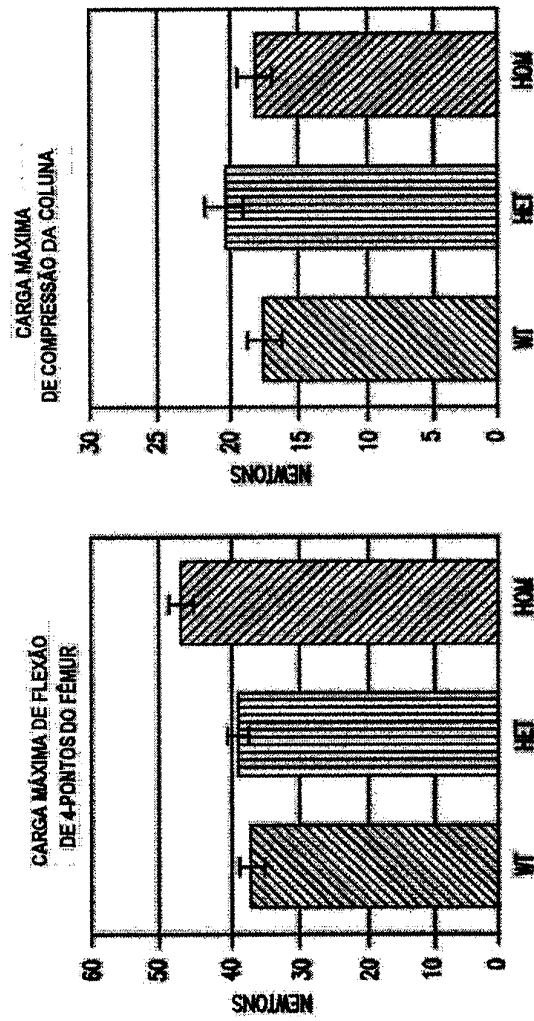


FIG. 3

## CAMUNDONGOS FÊMEAS APRESENTAM MAIOR RESISTÊNCIA À RUPTURA DO FÊMUR

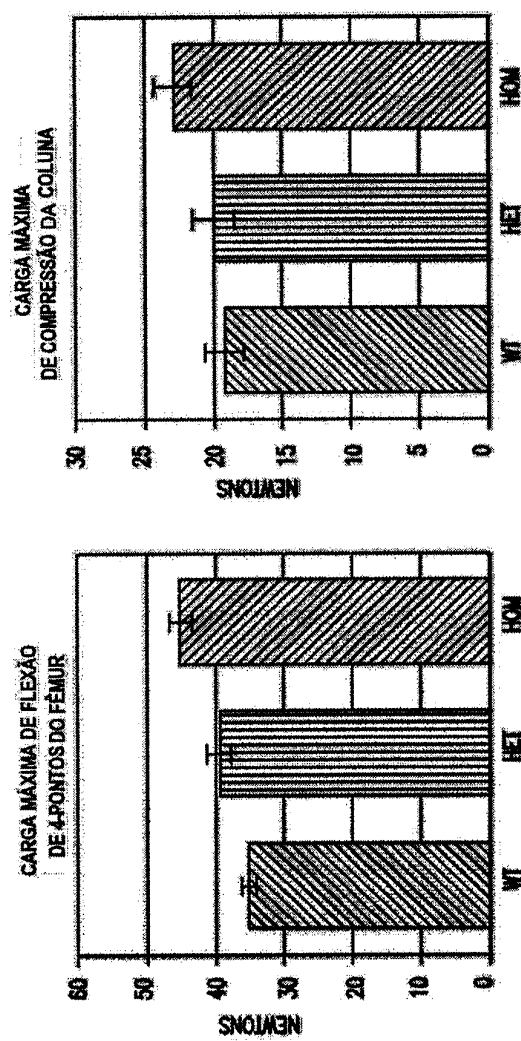


FIG. 4

LIGACÃO DE PRÉ-CLASSIFICAÇÃO 1			
NOTUM HUMANO			SIM
NOTUM DE CARBUNDONGO			NÃO
H-M			SIM
M-H			NÃO
H-M-H			SIM
M-H-M			NÃO
H(Q47)			SIM
H(S232A)			SIM
H(N96D)			SIM

Q47

M177

\* TRIADE CATALITICA

FIG. 5

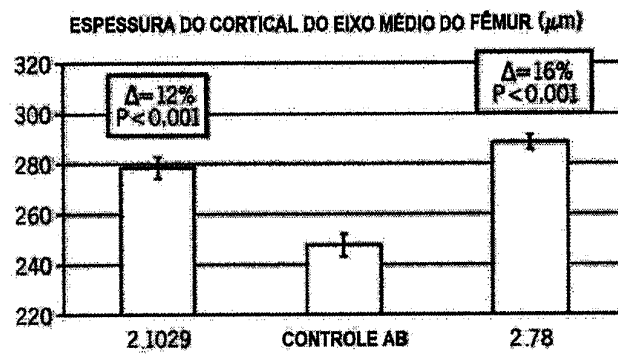


FIG. 6

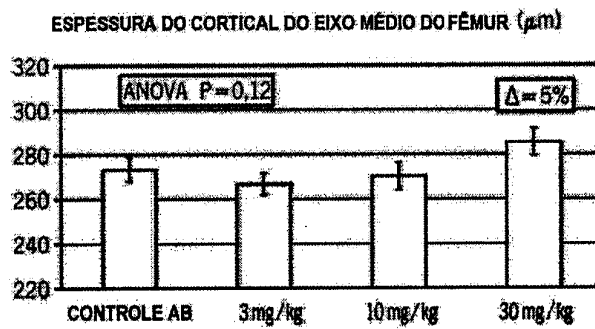


FIG. 7

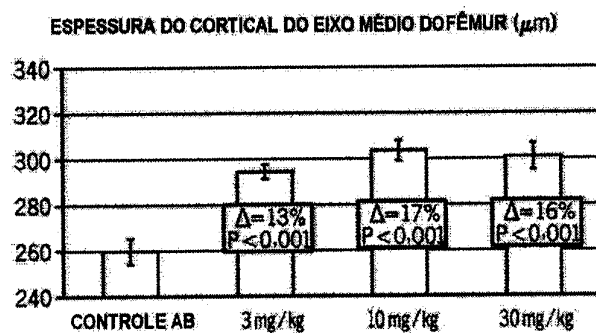


FIG. 8A

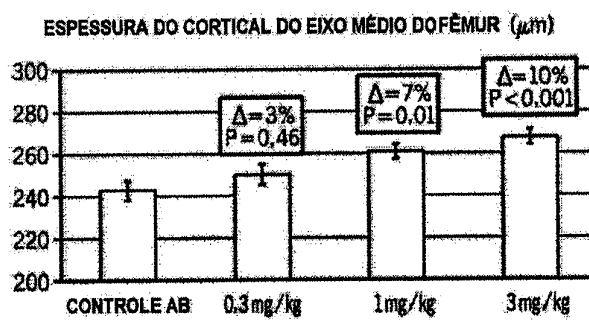
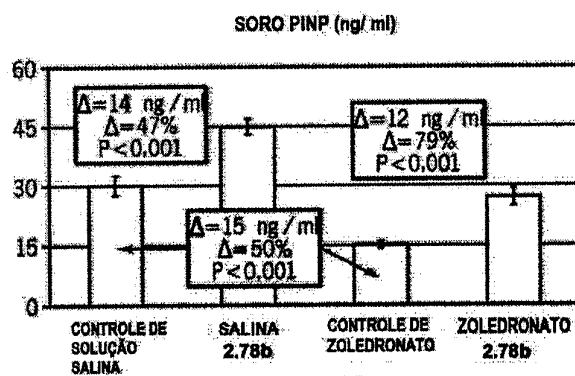
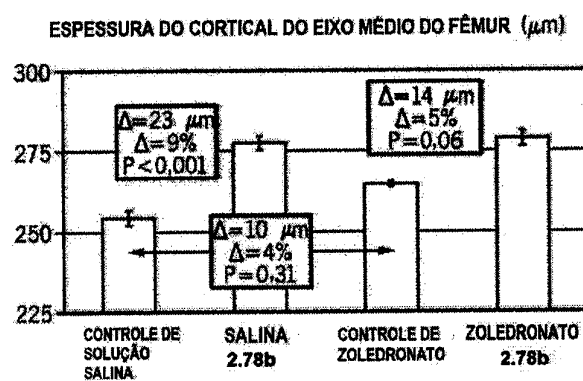


FIG. 8B



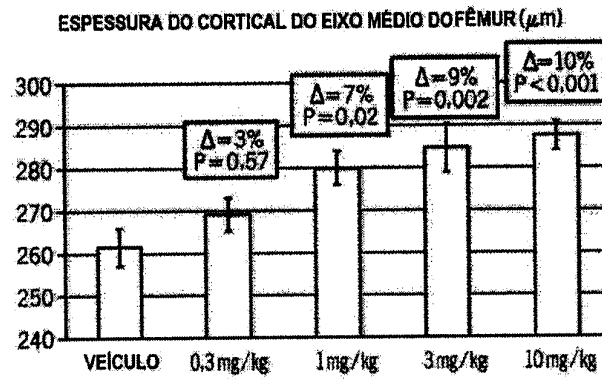


FIG. 10

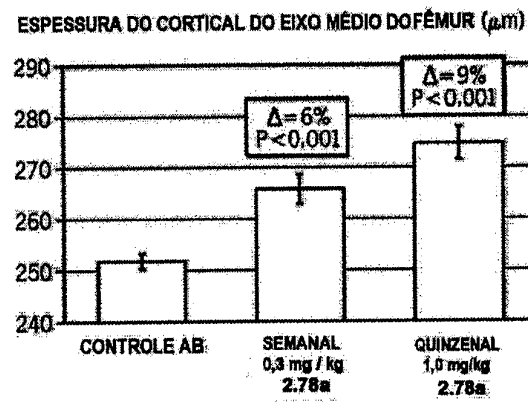


FIG. 11A



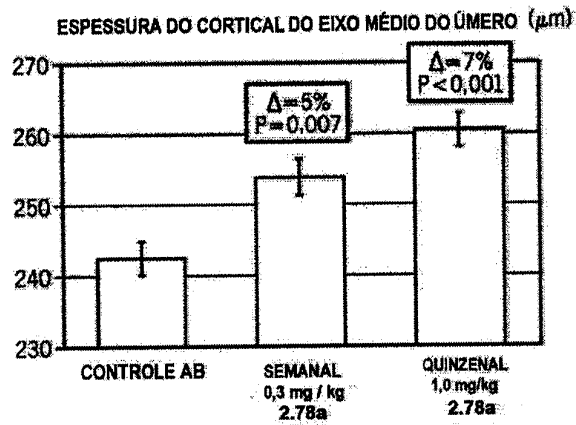


FIG. 11B

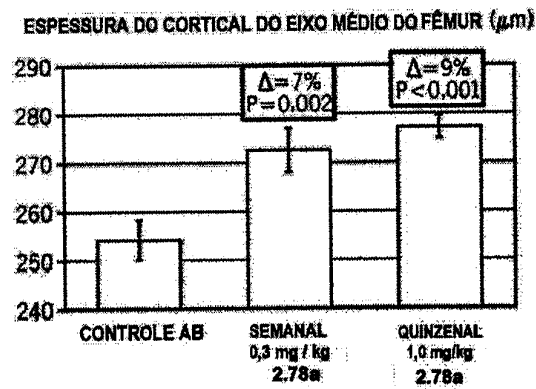


FIG. 12A

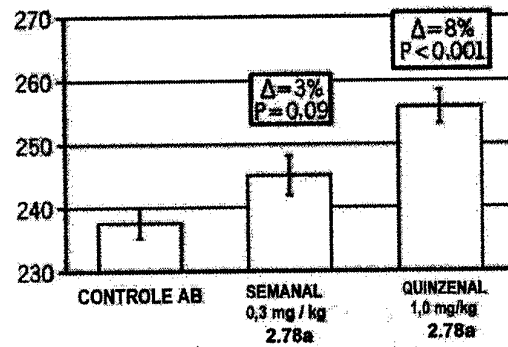
ESPESSURA DO CORTICAL DO EIXO MÉDIO DO ÚMERO ( $\mu\text{m}$ )

FIG. 12B

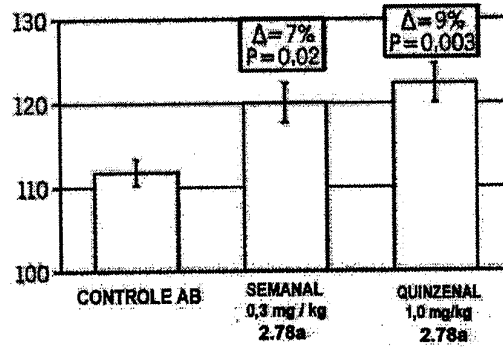
ESPESSURA DO CORTICAL DA 9ª COSTELA ( $\mu\text{m}$ )

FIG. 12C

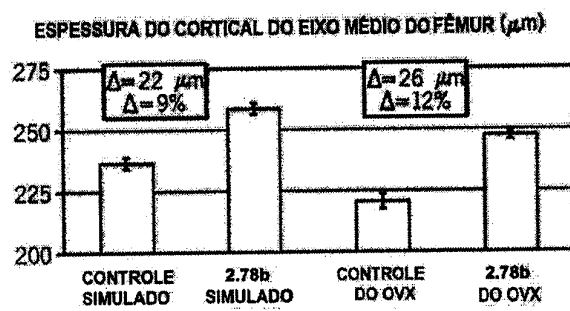


FIG. 13A

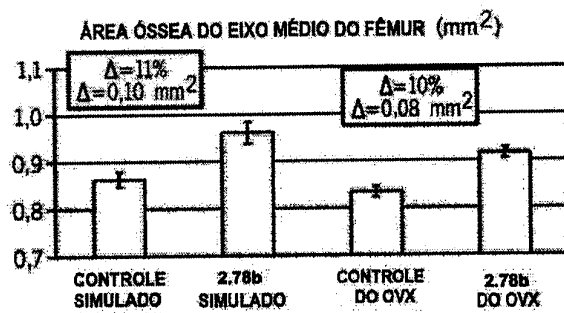
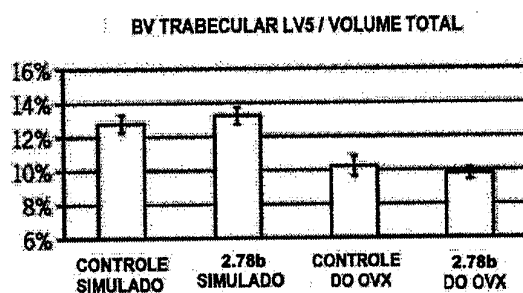
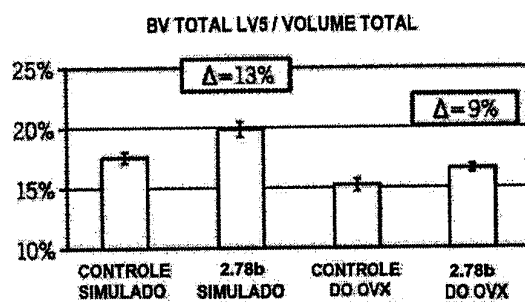
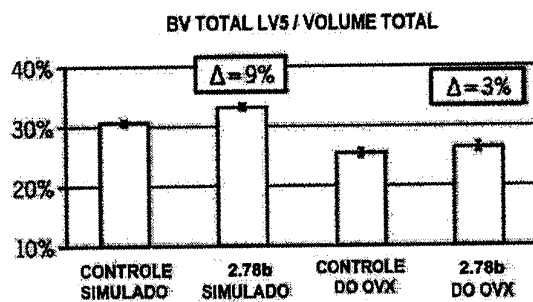


FIG. 13B



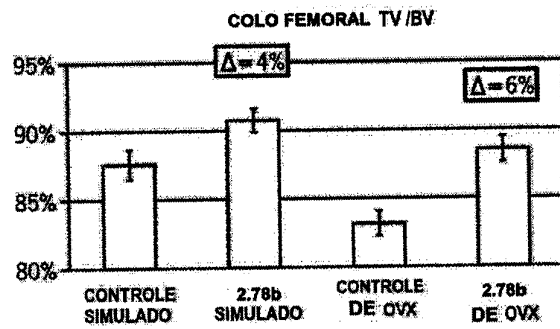


FIG. 15

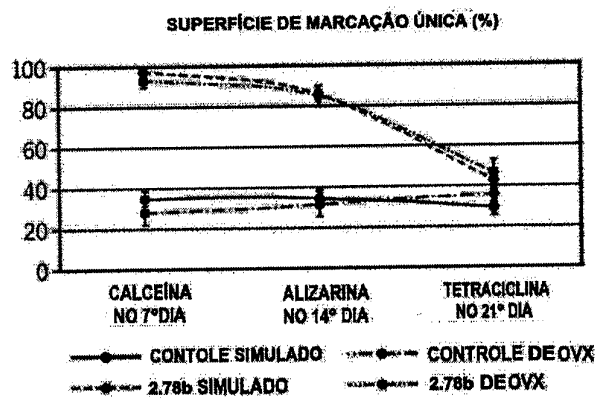


FIG. 16

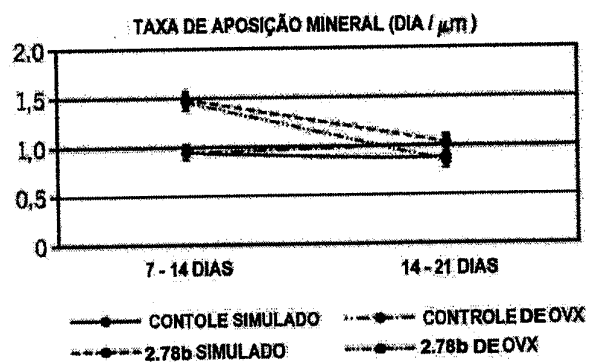


FIG. 17A

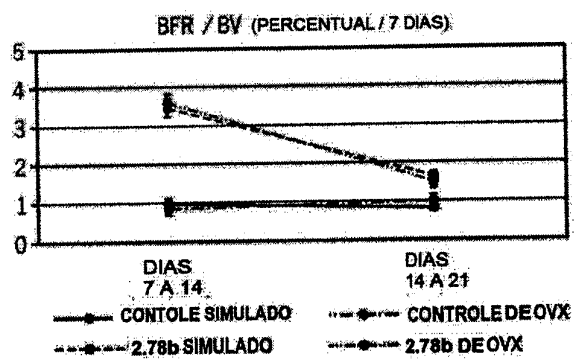


FIG. 17B