



(21) PI 0910622-7 A2



\* B R P I 0 9 1 0 6 2 2 A 2 \*

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

(42) Data da Publicação Nacional:

**(43) Data da Publicação Nacional:** 10/03/2020

**(54) Título:** ANTICORPOS CONTRA FCRN E USOS DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61P 37/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 25/04/2008 US 61/048.152; 28/04/2008 US 61/048.500.

(71) Depositante(es): DYAX CORP.; BIOGEN IDEC HEMOPHILIA INC..

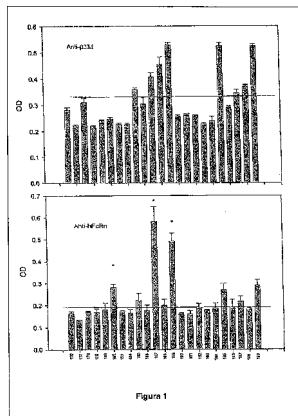
**(72) Inventor(es):** ALAN J. BITONTI; CHRISTOPHER TENHOOR; ARUMUGAM MURUGANANDAM; ROBERT CHARLES LADNER; CLIVE WOOD; JAMES STATTEL; KEVIN McDONNELL; LIMING LIU; JENNIFER DUMONT; AARON SATO.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2009002536 de 24/04/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/131702 de 29/10/2009

**(85) Data da Fase Nacional:** 22/10/2010

**(57) Resumo:** ANTICORPOS CONTRA FcRn E USOS DOS MESMOS Esta divulgação fornece, entre outras coisas, proteínas que se ligam a FcRn, por exemplo, imunoglobulinas, que inibem FcRn com alta afinidade e seletividade. As proteínas que se ligam a FcRn podem ser usadas para tratar uma variedade de distúrbios, incluindo distúrbios autoimunes.



## “ANTICORPOS CONTRA FcRn E USOS DOS MESMOS”

### PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício, sob o 35 U.S.C. § 119(e), do pedido provisório de patente US 61/048.152, depositado em 25 de abril de 2008, e do 5 pedido provisório US 61/048.500, depositado em 28 de abril de 2008, das divulgações em sua integridade, as quais são incorporadas aqui por referência em sua totalidade.

### FUNDAMENTOS

O isotipo de anticorpo mais abundante no soro é a IgG, e possui um papel fundamental na mediação da proteção contra patógenos, bem como na mediação das respostas alérgicas e inflamatórias que aceleram o recrutamento dos componentes do sistema imunológico para os tecidos, mucosas e superfícies dérmicas (*Junghans, Immunologic Research* 16(1):29 (1997)). Além disso, é também um componente chave de uma variedade de doenças autoimunes. Em 10 condições normais, a meia-vida da IgG no soro está na faixa de 5-7 dias em camundongos e 22-23 dias em humanos, o que constitui um período prolongado em relação à meia-vida do soro de outras proteínas plasmáticas. Em parte, isto ocorre porque o receptor neonatal FcRn (FcRn) resgata a IgG pinocitada a partir de lisossomos degradados e a recicla para o compartimento extracelular (*Junghans and 15 Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5512 (1996), *Roopenian et al. J. Immunology* 170:3528 (2003)).

20

O FcRn se liga à porção Fc da IgG. A interação entre a região Fc da IgG e o FcRn é dependente de pH. Após a entrada nas células por endocitose de fase fluida, a IgG é sequestrada nos endossomas e se liga ao FcRn com alta afinidade, 25 em pH ácido (6~6,5); quando o complexo IgG-FcRn é ciclado para a membrana plasmática, a IgG é dissociada rapidamente do FcRn na corrente sanguínea, em um pH ligeiramente básico (~7,4). Por meio deste mecanismo de reciclagem mediada por receptor, o FcRn resgata efetivamente a IgG a partir da degradação dos lisossomos, prolongando, dessa maneira, a meia-vida da IgG circulante.

30 O FcRn é um heterodímero não covalente, que normalmente é encontrado nos endossomas de células endoteliais e epiteliais. É um receptor ligado à membrana com uma transmembrana de passagem única que contém três domínios alfa de cadeia pesada ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ ) e um domínio único  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ M) de cadeia leve solúvel. Estruturalmente, pertence a uma família de moléculas de classe 35 1 do complexo principal de histocompatibilidade que possuem  $\beta_2$ M como uma cadeia leve comum. A cadeia  $\alpha$  do FcRn é uma proteína de 46 kD composta por um domínio extracelular que contém os domínios de cadeia pesada  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , uma

região transmembrana e uma cauda citoplasmática relativamente curta (*Burmeister et al. Nature* 372:366 (1994)).

O FcRn foi identificado pela primeira vez no intestino de ratos neonatos, onde media a absorção de anticorpos IgG a partir do leite materno e facilita o seu transporte para o sistema circulatório (*Leach et al. J Immunol* 157:3317 (1996)). O FcRn também foi isolado da placenta humana, onde também media a absorção e o transporte da IgG materna para a circulação fetal. Em adultos, o FcRn é expresso em vários tecidos, incluindo os tecidos epiteliais do pulmão, rim, intestino, bem como as superfícies nasal, vaginal e das árvores das vias biliares (Patentes US 6.030.613 e 6.086.875; *Israel et al. Immunology* 92:69 (1997); *Kobayashi et al. Am J Physiol* (2002); *Renal Physiol* 282:F358 (2002)).

A fim de estudar as contribuições do FcRn para a homeostase da IgG, os camundongos foram engenherados para que pelo menos parte dos genes que codificam a  $\beta$ 2M e as cadeias pesadas do FcRn fosse "nocauteada", de modo que essas proteínas não fossem expressas. (WO 02/43658; *Junghans and Anderson, Proc Natl Acad Sci US* 93:5512 (1996)). Nestes camundongos, a meia-vida sérica e as concentrações de IgG foram drasticamente reduzidas, sugerindo um mecanismo dependente de FcRn para a homeostase da IgG.

Foi sugerido ainda que os anticorpos FcRn anti-humanos podem ser gerados nos camundongos "knockout" com FcRn, e que estes anticorpos podem impedir a ligação da IgG ao FcRn. No entanto, estes anticorpos não foram gerados ou testados (WO 02/43658).

A inibição da ligação da IgG ao FcRn altera negativamente a meia-vida sérica da IgG, impedindo a reciclagem da IgG. Este princípio demonstrou ser terapeuticamente eficaz em um modelo de camundongo para doenças cutâneas bolhosas autoimunes (*Li et al. J Clin Invest* 115:3440-3450 (2005)). Portanto, os agentes que bloqueiam ou antagonizam a ligação da IgG ao FcRn podem ser usados em um método para tratar ou prevenir doenças ou distúrbios autoimunes e inflamatórios caracterizados pela presença de anticorpos IgG inapropriadamente regulados.

## SUMÁRIO

Esta invenção se refere, *inter alia*, a anticorpos que se ligam ao FcRn, e a métodos de identificação e uso desses anticorpos.

Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que compreende uma sequência de domínio variável de imunoglobulina de cadeia pesada (HC) e uma sequência de domínio variável de imunoglobulina de cadeia leve (LC),

em que as sequências de domínio variável de imunoglobulina de cadeia pesada e de cadeia leve formam um sítio de ligação ao antígeno que se liga ao FcRn humano; e, em que o anticorpo inclui uma ou mais das características a seguir:

5 (a) uma CDR humana ou região estrutural humana;

(b) a sequência de domínio variável de imunoglobulina de cadeia leve compreende uma ou mais CDRs que são pelo menos 85% idênticas a uma CDR de um domínio variável de M0171-A03, M0171-A01, M0159-A07, M0161-B04, M0090-F11 ou DX2500 de cadeia leve;

10 (c) a sequência de domínio variável de imunoglobulina de cadeia pesada compreende uma ou mais CDRs que são pelo menos 85% idênticas a uma CDR de um domínio variável de M0171-A03, M0171-A01, M0159-A07, M0161-B04, M0090-F11 ou DX2500 de cadeia pesada;

15 (d) a sequência de domínio variável de imunoglobulina de cadeia leve é pelo menos 85% idêntica a um domínio variável de M0171-A03, M0171-A01, M0159-A07, M0161-B04, M0090-F11 ou DX2500 de cadeia leve;

(e) a sequência de domínio variável de imunoglobulina de cadeia pesada é pelo menos 85% idêntica a um domínio variável de M0171-A03, M0171-A01, M0159-A07, M0161-B04 M0090-F11 ou DX2500 de cadeia pesada; e

20 (f) o anticorpo se liga a um epítopo que se sobrepõe a um epítopo ligado a M0171-A03, M0171-A01, M0159-A07, M0161-B04, M0090-F11 ou DX2500.

Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que é pelo menos 85% idêntico a um anticorpo selecionado em um grupo constituído por M0171-A03, M0171-A01, M0159-A07, M0161-B04, M0090-F11 e DX2500.

25 Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado selecionado em um grupo constituído por M0171-A03, M0171-A01, M0159-A07, M0161-B04, M0090-F11 e DX2504.

Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que compreende as CDRs de M0161-B04. Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que é pelo menos 85% idêntico a M0161-B04. As CDRs de M0161-B04 estão representadas na Tabela 17A.

30 Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que compreende as CDRs de M0171-A03. Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que é pelo menos 85% idêntico a M0171-A03. As CDRs de M0171-A03 estão representadas na Tabela 17A.

35 Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que compreende as

CDRs de M0171-A01. Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que é pelo menos 85% idêntico a M0171-A01. As CDRs de M0171-A01 estão representadas na Tabela 17A.

Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que compreende as 5 CDRs de M0159-A07. Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que é pelo menos 85% idêntico a M0159-A07. As CDRs de M0159-A07 estão representadas na Tabela 17A.

Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que compreende as 10 CDRs de M0090-F11. Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que é pelo menos 85% idêntico a M0090-F11. As CDRs de M0090-F11 estão representadas na 15 Tabela 17A.

Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que compreende as 20 CDRs de DX-2500. Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado que é pelo menos 85% idêntico a DX-2500. As CDRs de DX-2500 estão representadas na 15 Tabela 17A.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, a sequência de domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de domínio variável de M0161-B04, e a sequência de domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de domínio variável de M0161-B04.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, a sequência de domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de domínio variável de M0171-A03, e a sequência de domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de domínio variável de M0171-A03.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, a sequência de domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de domínio variável de M0171-A01, e a sequência de domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de domínio variável de M0171-A01.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, a sequência de domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de domínio variável de M0159-A07, e a sequência de domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de domínio variável de M0159-A07.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, a sequência de domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de domínio variável de M0090-F11, e a sequência de domínio variável de cadeia leve compreende uma 35 sequência de domínio variável de M0090-F11.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, a sequência de

domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de domínio variável de DX2500, e a sequência de domínio variável de cadeia leve compreende uma sequência de domínio variável de DX2500.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo se liga a um epítopo do FcRn ligado a M0171-A03, M0171-A01, M0159-A07, M0161-B04, M0090-F11 ou DX2500.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo compete com M0171-A03, M0171 A01, M0159-A07, M0161-B04, M0090-F11 ou DX2500 pela ligação ao FcRn.

Conforme usado aqui, M0171-A03 também é referido como M171-A03 e M00171-A03. Conforme usado aqui, M0171-A01 também é referido como M171-A01 e M00171-A01. Conforme usado aqui, M0159-A07 também é referido como M159-A07 e M00159-A07. Conforme usado aqui, M0161-B04 também é referido como M161-B04, M00161-B04 e DX-2504. Conforme usado aqui, M0090-F11 também é referido como M090-F11 e M90-F11.

Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado, ou seu fragmento, que se liga ao FcRn humano, em que o anticorpo é gerado contra a cadeia pesada do FcRn humano ou seu fragmento, em que o anticorpo funciona como um inibidor não competitivo da ligação da IgG ao FcRn humano e, em que o anticorpo não se liga à β2-microglobulina.

Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo isolado, ou seu fragmento, que se liga ao FcRn humano, em que o anticorpo é gerado contra a cadeia pesada do FcRn humano ou seu fragmento, em que o anticorpo não se liga à β2-microglobulina quando esta não forma um complexo com o FcRn e, em que o anticorpo não é produzido a partir de um camundongo *knockout* -/- FcRn.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo é selecionado em um grupo constituído por 3B3.11, 31.1, 4B4.12 e 17D3.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo se liga ao FcRn humano em uma faixa de pH de cerca de 5-7,4, com uma constante de dissociação ( $K_D$ ) menor que 100 nM.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o sítio de ligação ao antígeno se liga especificamente ao FcRn humano.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo se liga a uma linhagem celular estável com expressão de FcRn.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo modula (por exemplo, inibe) a ligação do FcRn a uma região constante do(a)

anticorpo/imunoglobulina.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo se liga à subunidade alfa do FcRn.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo se liga 5 ao domínio  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ou  $\alpha 3$  da cadeia alfa do FcRn.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo não se liga a uma subunidade beta do FcRn, ou seja, a proteína se liga somente a uma subunidade alfa.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo se liga 10 a uma subunidade beta do FcRn, em que a subunidade beta é associada com uma subunidade alfa.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, as subunidades alfa e beta estão corretamente agregadas no FcRn.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo se liga 15 a um FcRn que contém uma subunidade alfa e uma subunidade beta, e está corretamente agregado.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo inibe a ligação do IgG-Fc com um  $IC_{50}$  menor que cerca de 800 nM, menor que cerca de 600 nM, menor que cerca de 300 nM, menor que cerca de 100 nM, menor que cerca 20 de 50 nM, menor que cerca de 25 nM, menor que cerca de 10 nM, ou menor que cerca de 5 nM, em pH de cerca de 6.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo é um Fab solúvel.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo se liga 25 ao FcRn por meio do seu domínio de ligação ao antígeno, e também por meio da sua região Fc.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, a ligação do anticorpo ao FcRn é substancialmente independente de pH na faixa de 2-10.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, a ligação do 30 anticorpo ao FcRn é substancialmente independente de pH na faixa de 6-8.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo possui uma  $k_{off}$  menor que 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001 s<sup>-1</sup>, em pH 7,5.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, a ligação do anticorpo ao FcRn é substancialmente dependente de pH.

35 Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo se liga preferencialmente ao FcRn humano, em comparação com o FcRn de rato, de forma

dependente de pH ou independente de pH.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo se liga ao FcRn em endossomas ou em condições endossomais.

5 Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo não libera FcRn em pH 7,5.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo provoca uma melhora dos sintomas associados a um distúrbio autoimune quando administrado a um indivíduo.

10 Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, as sequências de domínio variável de cadeia pesada e de cadeia leve são componentes da mesma cadeia polipeptídica.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, as sequências de domínio variável de cadeia pesada e de cadeia leve são componentes de cadeias polipeptídicas diferentes.

15 Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo é um anticorpo completo.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo é um anticorpo humano ou humanizado, ou é não imunogênico em um humano.

20 Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo comprehende uma região estrutural de anticorpo humano.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo comprehende um domínio Fc.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo é um anticorpo murino.

25 Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo é químérico ou humanizado.

30 Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, o anticorpo é selecionado em um grupo constituído por Fab, F(ab)'2, Fv e ScFv.

Em algumas modalidades dos anticorpos aqui fornecidos, a ligação do anticorpo ao FcRn é independente de pH, em uma faixa de pH de 6,0 a 8,0.

35 Em um aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica que comprehende qualquer um dos anticorpos fornecidos aqui e um transportador farmaceuticamente aceitável.

Em um aspecto, a invenção fornece um ácido nucleico isolado que

compreende uma sequência que codifica um polipeptídeo que inclui uma sequência pelo menos 80% idêntica à sequência de um domínio variável de M0171-A03, M0171-A01, M0159-A07 ou M0161-B04.

Em um aspecto, a invenção fornece um ácido nucleico isolado que  
5 compreende uma sequência que codifica um polipeptídeo que compreende o primeiro e/ou segundo domínio variável de imunoglobulina de qualquer um dos anticorpos fornecidos aqui.

Em um aspecto, a invenção fornece um vetor ou célula hospedeira que compreende a sequência de ácido nucleico fornecida aqui.

10 Em um aspecto, a invenção fornece um método de detecção de um FcRn em uma amostra, sendo que o método compreende: o contato da amostra com qualquer um dos anticorpos fornecidos aqui, e a detecção da interação entre o anticorpo e o FcRn, caso presente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende ainda um marcador detectável.

15 Em um aspecto, a invenção fornece um método de detecção de FcRn em um indivíduo, sendo que o método compreende: a administração de qualquer um dos anticorpos fornecidos aqui, que compreenda também um marcador detectável, a um indivíduo; e a detecção do marcador no indivíduo. Em algumas modalidades, a detecção compreende a imagiologia do indivíduo.

20 Em um aspecto, a invenção fornece um método de modulação de uma atividade de FcRn, sendo que o método compreende: o contato de um FcRn com qualquer um dos anticorpos fornecidos aqui, modulando, dessa maneira, a atividade do FcRn. Em algumas modalidades, o FcRn está presente em um indivíduo humano. Em algumas modalidades, o anticorpo impede a ligação do FcRn com uma 25 Ig endógena. Em algumas modalidades, o anticorpo impede a ligação do FcRn com um anticorpo terapêutico. Em algumas modalidades, o FcRn está presente em um endossoma de célula epitelial. Em algumas modalidades, o FcRn está presente em um endossoma de célula endotelial. Em algumas modalidades, o FcRn está presente na superfície celular.

30 Em um aspecto, a invenção fornece um método de tratamento de um distúrbio autoimune e/ou de sintomas modulantes de um distúrbio autoimune, sendo que o método compreende: a administração de qualquer um dos anticorpos fornecidos aqui em uma quantidade suficiente para modular os sintomas. Em algumas modalidades, o distúrbio autoimune é um distúrbio selecionado em um grupo 35 constituído por: artrite reumatoide (AR), lúpus eritematoso sistêmico (LES), miastenia gravis (MG), doença de Graves, púrpura trombocitopênica idiopática (PTI),

- síndrome de Guillain-Barre, miocardite autoimune, glomerulonefrite membranosa, diabetes mellitus, diabetes tipo I ou tipo II, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, tireoidite autoimune, gastrite, doença celíaca, vitiligo, hepatite, cirrose biliar primária, doença inflamatória intestinal, espondiloartropatias, encefalomielite autoimune
- 5 experimental, neutropenia imune, diabetes juvenil, e respostas imunogênicas associadas com a hipersensibilidade tardia mediada por citocinas, linfócitos T tipicamente encontrados em tuberculose, sarcoidose, e polimiosite, poliarterite, vasculite cutânea, pênfigo, penfigoide, síndrome de Goodpasture, doença de Kawasaki, esclerose sistêmica, síndrome antifosfolipídio, e síndrome de Sjogren.
- 10 Em algumas modalidades, o pênfigo é o pênfigo vulgar, pênfigo foliáceo ou pênfigo paraneoplásico.

Em algumas modalidades, o anticorpo diminui a meia-vida da IgG endógena.

- Em um aspecto, a invenção fornece um método de modulação da meia-vida/níveis de IgG circulante, sendo que o método compreende: a identificação de
- 15 um indivíduo que necessite de meia-vida/níveis de IgG circulante modulada(os); e a administração de qualquer um dos anticorpos fornecidos aqui ao indivíduo, em uma quantidade eficaz para modular a(os) meia-vida/níveis de IgG circulante no indivíduo. Em algumas modalidades, o método reduz a(os) meia-vida/níveis de IgG circulante. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano. Em algumas
- 20 modalidades, o anticorpo é administrado para diminuir a(os) meia-vida/níveis de IgG circulante e é combinado com um agente ou terapia anti-distúrbio autoimune que não seja nenhum dos anticorpos fornecidos aqui. Em algumas modalidades, o agente ou terapia anti-distúrbio autoimune, que não é nenhum dos anticorpos fornecidos aqui, compreende a terapia intravenosa com Ig; drogas anti-inflamatórias
- 25 não esteróides (DAINE); corticosteroides; ciclosporinas, rapamicinas, ascomicinas, ou seus análogos imunossupressores, por exemplo, ciclosporina A, ciclosporina G, FK-506, rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etyl-rapamicina; ciclofosfamida; azatioprina; metotrexato; brequinar; FTY 720; lefunomida; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato mofetil; 15-deoxispergualina; anticorpos monoclonais
- 30 imunossupressores, por exemplo, anticorpos monoclonais para receptores de leucócitos, por exemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD25, CD28, B7, CD45 ou CD58, ou seus ligantes; outros compostos imunomoduladores, por exemplo, CTLA4Ig; ou outros inibidores de moléculas de adesão, por exemplo, mAbs ou inibidores de baixo peso molecular, incluindo antagonistas de selectina e
- 35 antagonistas de VLA-4.

Em um aspecto, a invenção fornece um método de tratamento ou prevenção

de um distúrbio autoimune, sendo que o método compreende: a administração de qualquer um dos anticorpos fornecidos aqui a um indivíduo que possua o distúrbio ou apresente o risco de desenvolver o distúrbio. Em algumas modalidades, o distúrbio autoimune é caracterizado pela IgG circulante indesejada. Em algumas 5 modalidades, o anticorpo diminui a meia-vida da IgG endógena. Em algumas modalidades, o distúrbio autoimune é um distúrbio selecionado dentre artrite reumatoide (AR), lúpus eritematoso sistêmico (LES), miastenia gravis (MG), doença de Graves, púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), síndrome de Guillain-Barre, miocardite autoimune, glomerulonefrite membranosa, diabetes mellitus, diabetes tipo 10 I ou tipo II, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, tireoidite autoimune, gastrite, doença celíaca, vitiligo, hepatite, cirrose biliar primária, doença inflamatória intestinal, espondiloartropatias, encefalomielite autoimune experimental, neutropenia imune, diabetes juvenil, e respostas imunogênicas associadas com a hipersensibilidade tardia mediada por citocinas, linfócitos T tipicamente encontrados em tuberculose, 15 sarcoidose, e polimiosite, poliarterite, vasculite cutânea, pênfigo, penfigoide, síndrome de Goodpasture, doença de Kawasaki, esclerose sistêmica, síndrome antifosfolipídio, e síndrome de Sjogren. Em algumas modalidades, o pênfigo é o pênfigo vulgar, pênfigo foliáceo ou pênfigo paraneoplásico.

Em um aspecto, a invenção fornece um método de tratamento ou prevenção 20 de um distúrbio autoimune, sendo que o método compreende: a administração de qualquer um dos anticorpos fornecidos aqui, em combinação com uma segunda terapia para tratamento ou prevenção do distúrbio, a um indivíduo que possua o distúrbio ou apresente o risco de desenvolver o distúrbio. Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende a terapia intravenosa com Ig; drogas anti- 25 inflamatórias não esteróides (DAINS); corticosteroides; ciclosporinas, rapamicinas, ascomicinas, ou seus análogos imunossupressores, por exemplo, ciclosporina A, ciclosporina G, FK-506, rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; brequinar; FTY 720; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato mofetil; 15-deoxispergualina; anticorpos monoclonais 30 imunossupressores, por exemplo, anticorpos monoclonais para receptores de leucócitos, por exemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD25, CD28, B7, CD45 ou CD58, ou seus ligantes; outros compostos imunomoduladores, por exemplo, CTLA4Ig; ou outros inibidores de moléculas de adesão, por exemplo, mAbs ou inibidores de baixo peso molecular, incluindo antagonistas de selectina e 35 antagonistas de VLA-4.

Em um aspecto, a invenção fornece um método de redução da concentração

de anticorpos indesejados em um indivíduo, que compreende as etapas de administração ao indivíduo de uma dose terapeuticamente eficaz de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos fornecidos aqui. Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento é administrado em um transportador farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano.

5 Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento é administrado com um adjuvante. Em algumas modalidades, o anticorpo indesejado é o natalizumab. Em algumas modalidades, o anticorpo indesejado é o antígeno leucocitário humano não próprio. Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento administrado  
10 é administrado em conjunto com o transplante de órgãos.

Em um aspecto, a invenção fornece um método de redução da ligação da IgG ao FcRn em um indivíduo, que compreende as etapas de fornecimento de um anticorpo ou seu fragmento que se liga ao FcRn humano, e que é gerado contra a cadeia pesada do FcRn humano ou seu fragmento, sendo um inibidor não competitivo da ligação da IgG ao FcRn humano e não se ligando à β2-microglobulina; e administração do anticorpo ou seu fragmento a um indivíduo em uma quantidade suficiente para reduzir a ligação da IgG ao FcRn no indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo possui uma doença autoimune ou aloimune. Em algumas modalidades, o indivíduo é um receptor de transplante de órgãos. Em  
15 algumas modalidades, o indivíduo recebeu administração de um anticorpo terapêutico. Em algumas modalidades, a doença autoimune é a trombocitopenia imune. Em algumas modalidades, a doença autoimune é o pênfigo imune. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano. Em algumas modalidades, o anticorpo é administrado em uma dosagem de 1 mg/kg a 2 g/kg. Em algumas  
20 modalidades, o anticorpo é administrado em uma dosagem de 1 mg/kg a 200 mg/kg.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para supressão do nível de um anticorpo de IgG em um indivíduo, que compreende as etapas de fornecimento de um anticorpo ou seu fragmento que se liga ao FcRn humano, e que é gerado contra a cadeia pesada do FcRn humano ou seu fragmento, sendo um inibidor não competitivo da ligação da IgG ao FcRn humano e não se ligando à β2-microglobulina; e administração do anticorpo ou seu fragmento a um indivíduo em uma quantidade suficiente para suprimir o nível de um anticorpo de IgG em um indivíduo. Em algumas modalidades, o anticorpo de IgG é um anticorpo de IgG terapêutico. Em algumas modalidades, o anticorpo de IgG terapêutico é o  
30 natalizumab. Em algumas modalidades, o anticorpo de IgG é o antígeno leucocitário humano não próprio. Em algumas modalidades, o método compreende ainda uma  
35

etapa de troca plasmática.

Em um aspecto, a invenção se refere a anticorpos que inibem a região constante de uma molécula de IgG de se ligar ao FcRn. A invenção se refere, portanto, a um anticorpo que compreende pelo menos uma região variável que se liga especificamente a um epítopo da molécula de FcRn. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção se ligam ao FcRn humano. Em outras modalidades, os anticorpos se ligam ao FcRn de roedores ou macacos. Alguns anticorpos exemplares da invenção incluem, por exemplo, 4B4.12, 3B3.11, 31.1 e 17D3.

Em um aspecto, a divulgação caracteriza um anticorpo (por exemplo, um anticorpo isolado) que inclui uma sequência de domínio variável de imunoglobulina de cadeia pesada (HC) e uma sequência de domínio variável de imunoglobulina de cadeia leve (LC). A primeira e segunda sequências de domínio variável de imunoglobulina formam um sítio de ligação ao antígeno que se liga ao FcRn (por exemplo, FcRn humano). Em uma modalidade, o anticorpo possui uma ou mais das características a seguir:

(a) a sequência de domínio variável de imunoglobulina de cadeia leve é pelo menos 85% idêntica a um domínio variável de cadeia leve de 3B3.11, 31.1, 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11, ou sua(s) CDRs;

(b) a sequência de domínio variável de imunoglobulina de cadeia pesada é pelo menos 85% idêntica a um domínio variável de cadeia pesada de 3B3.11, 31.1, 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11, ou sua(s) CDRs; e

(c) o anticorpo se liga a um epítopo que se sobrepõe a um epítopo ligado a 3B3.11, 31.1, 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11.

Em uma modalidade, o anticorpo se liga ao FcRn (por exemplo, FcRn humano), por exemplo, em uma faixa de pH de cerca de 5-8, por exemplo, com uma constante de dissociação ( $K_D$ ) menor que 100, 50, 10, 5, 1 ou 0,1 nM. Em uma modalidade, o sítio de ligação ao antígeno se liga especificamente ao FcRn humano. Conforme usado aqui, "ligação específica" ou "se liga especificamente" refere-se à capacidade de um anticorpo de ligação à FcRn de se ligar preferencialmente ao FcRn humano, com uma afinidade que é pelo menos 2 vezes, 10 vezes, 50 vezes, 100 vezes, ou maior ( $K_D$  menor) que a sua afinidade de ligação a um antígeno não específico (por exemplo, actina, caseína) diferente de FcRn. Em uma modalidade, o

anticorpo se liga ao FcRn humano com uma  $k_{off}$  menor que 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001 s<sup>-1</sup>.

Em uma modalidade, o anticorpo se liga ao domínio extracelular do FcRn; por exemplo, uma das subunidades alfa do FcRn, ou seja, o domínio  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ou  $\alpha_3$  da cadeia alfa do FcRn. Em uma modalidade, o anticorpo não se liga à subunidade beta ( $\beta 2M$ ) do FcRn, por exemplo, o anticorpo se liga somente à subunidade alfa. Em uma modalidade, o anticorpo não se liga à subunidade beta do FcRn, e sim, somente quando a  $\beta 2M$  está em associação com a subunidade alfa. Por exemplo, o anticorpo não se liga nem à subunidade alfa nem à subunidade beta, a menos que ambas estejam presentes e corretamente agregadas no FcRn. Em uma modalidade, o anticorpo se liga ao FcRn que contém ambas as subunidades alfa e beta e que está corretamente agregado.

Em uma modalidade, o anticorpo modula (por exemplo, inibe) a ligação do FcRn a uma região constante do(a) anticorpo/imunoglobulina. Por exemplo, o anticorpo pode possuir uma  $K_i$  maior que (por exemplo, numericamente inferior) 5 nM, 500 pM, 200 pM, 150 pM, 100 pM ou 75 pM, por exemplo, entre 50 nM e 1pM, ou 200 pM e 5 pM.

Em uma modalidade, o anticorpo se liga ao FcRn, e diminui ou previne a ligação do FcRn a uma região constante do(a) anticorpo/imunoglobulina. Por exemplo, o anticorpo pode se ligar ao FcRn (por exemplo, FcRn humano) com uma afinidade ( $K_D$ ) maior que (ou seja, numericamente inferior)  $1 \times 10^{-8}$  M. Em uma modalidade, o anticorpo é um Fab que se liga ao FcRn de forma substancialmente independente de pH ou substancialmente dependente de pH, com uma  $K_D$  na faixa de cerca de 3,0-82 nM, em pH 6. Em uma modalidade, o anticorpo é um Fab que se liga ao FcRn de forma substancialmente independente de pH ou substancialmente dependente de pH, com uma  $K_D$  na faixa de cerca de 9,7-cerca de 39,7 nM, em pH 7,5. Em uma modalidade, o anticorpo é uma IgG que se liga ao FcRn de forma substancialmente independente de pH ou substancialmente dependente de pH, com uma  $K_D$  na faixa de cerca de 0,409-cerca de 29,5 nM, cerca de 2,44-cerca de 29,5 nM, cerca de 0,13-cerca de 1,03 nM, cerca de 6,43-cerca de 30,2 nM, cerca de 0,2-cerca de 2,87 nM, cerca de 0,34-cerca de 2,87 nM, ou cerca de 0,2-cerca de 30,2 nM, em pH 6. Em uma modalidade, o anticorpo é uma IgG que se liga ao FcRn de forma substancialmente independente de pH ou substancialmente dependente de pH, com uma  $K_D$  na faixa de cerca de 0,675-24,2 nM; 2,1-24,2 nM; 0,158-10 nM; ou cerca de 2,04-cerca de 80 nM, em pH 7,5.

Em uma modalidade, o anticorpo inibe a ligação do FcRn ao IgG-Fc com um

IC<sub>50</sub> menor que 800 nM, 600 nM ou 300 nM, 200 nM, 100 nM, 1 nM, 50 pM, em pH de cerca de 6. Em uma modalidade, o anticorpo é um Fab que inibe a ligação do FcRn ao IgG-Fc de forma substancialmente independente de pH ou substancialmente dependente de pH, com um IC<sub>50</sub> na faixa de cerca de 13-754 nM 5 ou cerca de 13-80 nM, em pH 6. Em uma modalidade, o anticorpo é uma IgG que inibe a ligação do FcRn de forma substancialmente independente de pH ou substancialmente dependente de pH, com um IC<sub>50</sub> na faixa de cerca de 1,2-36 nM, 36-20 nM, 120-562 nM, 1,5-5,4 nM, 5,4-50 nM, 51-161 nM, em pH 6.

Em uma modalidade, o anticorpo é, por exemplo, um anticorpo de cadeia 10 única, um Fab, um fragmento sFab, um F(ab')2, um fragmento Fd, um fragmento Fv, um scFv ou um fragmento dAb.

Em algumas modalidades, o anticorpo monoespecífico, por exemplo, um anticorpo monoclonal ou anticorpo recombinante. O termo “anticorpo monoespecífico” se refere a um anticorpo que exibe uma única especificidade e 15 afinidade de ligação com um alvo específico, por exemplo, um epítopo. Este termo inclui um “anticorpo monoclonal” ou uma “composição de anticorpo monoclonal,” que, conforme usado aqui, se refere a uma preparação de um anticorpo de uma única composição molecular.

Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo anti-FcRn recombinante ou 20 modificado, por exemplo, um anticorpo quimérico, humanizado, desimunizado ou gerado *in vitro*. O termo anticorpo humano “recombinante” ou “modificado”, conforme usado aqui, é destinado a incluir todos os anticorpos que sejam preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, como anticorpos expressos por um vetor de expressão recombinante transfetado em uma 25 célula hospedeira, anticorpos isolados a partir de uma biblioteca combinatória de anticorpos recombinantes, anticorpos isolados a partir de um animal (por exemplo, um camundongo) que seja transgênico para anticorpos ou genes de imunoglobulina humana, preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva a excisão de sequências gênicas de imunoglobulina humana a outras 30 sequências de DNA. Esses anticorpos recombinantes incluem anticorpos humanizados, CDR-enxertados, quiméricos, desimunizados, gerados *in vitro*, e podem incluir, opcionalmente, regiões constantes derivadas de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Em uma modalidade, o anticorpo não induz a uma resposta antiglobulínica em um humano.

35 São também divulgados anticorpos (incluindo anticorpos completos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno) que se ligam a epítópos sobrepostos, ou inibem

competitivamente, a ligação dos anticorpos anti-FcRn divulgados aqui ao FcRn, por exemplo, anticorpos que se ligam a epítopos sobrepostos, ou inibem competitivamente, a ligação dos sFabs 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, 5 M0073-E10 ou M0090-F11 ao FcRn. É possível ainda usar uma combinação de anticorpos anti-FcRn, por exemplo, dois ou mais anticorpos que se ligam a regiões diferentes do FcRn, por exemplo, anticorpos que se ligam a dois epítopos diferentes no domínio extracelular do FcRn. Alternativamente, um anticorpo biespecífico pode ser usado. Um anticorpo biespecífico é uma molécula com dois domínios pesados 10 variáveis e dois domínios leves variáveis, de modo que uma única molécula abrange duas capacidades de ligação específicas; um ou mais domínios ou especificidades variáveis podem pertencer a um anticorpo descrito aqui e se ligarem ao FcRn.

Em uma modalidade, o anticorpo anti-FcRn (por exemplo, um anticorpo completo ou seu fragmento de ligação ao antígeno) inclui pelo menos uma 15 sequência de domínio variável de cadeia leve ou pesada (por exemplo, pelo menos uma imunoglobulina de cadeia leve e pelo menos uma imunoglobulina de cadeia pesada). Em algumas modalidades, cada imunoglobulina inclui uma sequência de domínio variável de cadeia leve ou pesada com pelo menos duas ou três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) substancialmente idênticas a uma 20 CDR de uma sequência de domínio variável de cadeia leve ou pesada de um anticorpo que interage com o FcRn, por exemplo, um sFab descrito aqui, por exemplo, 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11.

Em uma modalidade, o anticorpo se liga ao FcRn por meio do seu domínio de 25 ligação ao antígeno e também por meio da sua região Fc. Em uma modalidade, o anticorpo se liga ao FcRn apenas por meio do seu domínio de ligação ao antígeno. Por exemplo, o anticorpo não inclui uma região Fc, ou inclui uma região Fc modificada que não interage com o FcRn. Em uma modalidade, o anticorpo se liga 30 ao FcRn pelo menos 1000 vezes mais firmemente por meio dos seus domínios de ligação ao antígeno do que por meio dos seus domínios Fc.

Em uma modalidade, a ligação do anticorpo ao FcRn é substancialmente independente de pH na faixa de 2-10, 4-9, 5-8, 6-8 ou 6-7,5. O termo “independente 35 de pH” se refere à capacidade do anticorpo para se ligar e/ou se manter ligado ao FcRn em uma faixa de pH de 2-10, 4-9, 5-8, 6-8, ou 6-7,5. A afinidade pode variar em diferentes valores de pH. Em algumas modalidades, a  $K_D$  não é maior que 200 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM ou 100 pM em qualquer valor dentro da faixa. Por

exemplo, o anticorpo pode se ligar ao FcRn em pH 6 e se manter ligado em pH 7,5. Em uma modalidade, a ligação do anticorpo ao FcRn é substancialmente dependente de pH. O termo “independente de pH” se refere à capacidade do anticorpo para se ligar e/ou se manter ligado ao FcRn em um primeiro pH, e à sua

- 5 capacidade para se ligar ou se manter ligado ao FcRn em um segundo pH, em que o segundo pH está dentro de um número determinado de unidades de pH (por exemplo, 6; 5; 4; 3; 2; 1,5 unidades) do primeiro pH. Por exemplo, o anticorpo pode se ligar ao FcRn em pH 6, e pode ainda se ligar ou se manter ligado ao FcRn em pH 7,5. O termo “dependente de pH” se refere à capacidade do anticorpo para se ligar  
10 e/ou se manter ligado ao FcRn em um primeiro pH, e à sua incapacidade para se ligar ou se manter ligado ao FcRn em um segundo pH, em que o segundo pH está dentro de um número determinado de unidades de pH (por exemplo, 6; 5; 4; 3; 2; 1,5 unidades) do primeiro pH. Por exemplo, o anticorpo pode se ligar ao FcRn em pH 6, e não pode se ligar ou se manter ligado ao FcRn em pH 7,5.

- 15 Em uma modalidade, o anticorpo se liga preferencialmente ao FcRn humano, em comparação com o FcRn de rato ou macaco, de forma dependente de pH ou independente de pH. Em uma modalidade, o anticorpo se liga ao FcRn humano e ao FcRn de um animal experimental apropriado (por exemplo, rato ou macaco) com afinidades que diferem em não mais que duas, cinco ou dez vezes. Em uma  
20 modalidade, o anticorpo se liga ao FcRn humano e ao FcRn de um animal experimental apropriado, com uma  $K_D \leq 5$  nM, na faixa de pH de 6,0-7,5. Em uma modalidade, o anticorpo se liga ao FcRn em endossomas ou em condições endossomais. Por exemplo, o anticorpo se liga ao FcRn em condições ácidas, por exemplo, em pH 6. Em uma modalidade, o anticorpo se liga ao FcRn em pH 6, por  
25 exemplo, pelo menos 1,5; 2; 5; 8; 10; 20 ou 50 vezes mais que em pH 7,5. Em uma modalidade, o anticorpo libera FcRn em pH 7,5, por exemplo, pelo menos 1,5; 2; 5; 8; 10; 20 ou 50 vezes mais rapidamente, em pH 6. Em uma modalidade, o anticorpo se liga ao FcRn em pH 7,5, por exemplo, pelo menos 1,5; 2; 5; 8; 10; 20 ou 50 vezes mais que em pH 6. Em uma modalidade, o anticorpo libera FcRn em pH 6, por  
30 exemplo, pelo menos 1,5; 2; 5; 8; 10; 20 ou 50 vezes mais rapidamente, em pH 7,5. Em uma modalidade, o anticorpo não libera FcRn em pH 7,5. Em uma modalidade, o anticorpo não libera FcRn em pH 6.

- Em uma modalidade, a interação com o FcRn estende a meia-vida do anticorpo. Em uma modalidade, o anticorpo diminui a meia-vida de outras moléculas de IgG, por exemplo, em pelo menos 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90%. Por exemplo, uma redução de 90% pode alterar a meia-vida de um anticorpo de 20 dias

para 2 dias.

Em uma modalidade, o anticorpo provoca uma melhora dos sintomas associados com um distúrbio autoimune quando administrado a um indivíduo. Por exemplo, o anticorpo pode aliviar ou diminuir a gravidade de sintomas como inchaço das articulações, dor ou rigidez; níveis de anticorpos circulantes como auto-anticorpos; dores nas articulações (artralgia); febre; fadiga extrema; erupções da pele; anemia; dor no peito ou respiração profunda; erupção em forma de borboleta pelo nariz e bochechas; fotossensibilidade; perda de cabelo; convulsões; úlceras na boca ou nariz; fenômeno de Raynaud; eritema leve; manifestações neuropsiquiátricas; trombocitopenia; e derrame pleural.

Em uma modalidade, as sequências de domínio variável de cadeia pesada e de cadeia leve são componentes da mesma cadeia polipeptídica, ou seja, são parte de um anticorpo de cadeia única. Em uma modalidade, as sequências de domínio variável de cadeia pesada e de cadeia leve são componentes de cadeias polipeptídicas diferentes.

Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo completo. Por exemplo, o anticorpo pode ser um anticorpo humano ou humanizado e/ou pode ser não imunogênico em um humano. Em uma modalidade, o anticorpo comprehende uma região estrutural de anticorpo humano. Em uma modalidade, o anticorpo comprehende um domínio Fc.

Em uma modalidade, a sequência de domínio variável de cadeia pesada comprehende uma sequência de domínio variável de 3B3.11, 31.1, 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11, e a sequência de domínio variável de cadeia leve comprehende uma sequência de domínio variável de 3B3.11, 31.1, 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11. Em uma modalidade, o anticorpo se liga a um epítopo do FcRn ligado a 3B3.11, 31.1, 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11. Em uma modalidade, o anticorpo compete com 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11 pela ligação ao FcRn.

Em um aspecto, a invenção se refere a um método de produção de um anticorpo monoclonal que comprehende: a imunização de um roedor com uma proteína FcRn ou pelo menos um fragmento, ou com uma sequência polinucleotídica

- que codifique uma molécula de FcRn ou seu fragmento; a obtenção de células B a partir do roedor; a fusão das células B com uma linhagem celular de mieloma para a obtenção de uma célula de hibridoma; a cultura da célula de hibridoma sob condições em que esta secrete um anticorpo monoclonal, em que o anticorpo
- 5       compreende pelo menos uma região variável que se ligue especificamente a uma molécula FcRn, em que a molécula de FcRn comprehende um domínio com capacidade de ligação a pelo menos uma parte de uma região constante da IgG, em que a ligação do anticorpo à molécula de FcRn iniba a ligação da parte de uma região constante da IgG à molécula de FcRn; e o isolamento do anticorpo.
- 10      Em um aspecto, a divulgação caracteriza um método de identificação de um anticorpo que se liga ao FcRn, por exemplo, FcRn humano, e inclui: o fornecimento de um antígeno de FcRn ou seu fragmento; o fornecimento de uma biblioteca de anticorpos, por exemplo, uma biblioteca de apresentação; e a identificação de um membro presente na biblioteca que se ligue ao antígeno de FcRn, em que cada
- 15      membro da biblioteca exiba um componente de anticorpo heterólogo na sua superfície, e cada membro inclua um ácido nucleico que codifique o componente de anticorpo heterólogo, sendo o componente de anticorpo heterólogo um membro de um conjunto de diversos componentes de anticorpos. O método pode incluir o isolamento de uma molécula de ácido nucleico do membro identificado, e a molécula
- 20      de ácido nucléico codifica o polipeptídeo que se liga especificamente ao antígeno de FcRn. Em uma modalidade, o anticorpo se liga especificamente ao FcRn humano.

Em uma modalidade, a biblioteca é uma biblioteca de fagos, por exemplo, uma biblioteca de apresentação de fagos. Em uma modalidade, o fago identificado é eluído com um ligante competidor, por exemplo, um Fc de IgG que se liga ao FcRn e/ou a um anticorpo competidor anti-FcRn humano.

Em outro aspecto, a divulgação caracteriza um método de detecção de um FcRn em uma amostra, sendo que o método inclui: o contato da amostra com um anticorpo de ligação ao FcRn (por exemplo, um anticorpo descrito aqui) e a detecção de uma interação entre o anticorpo e um FcRn, caso presente. Em uma modalidade, o anticorpo inclui um marcador detectável, como um marcador fluorescente (por exemplo, bodipy, fluoresceína-5-isotiocianato, rodamina, e peroxidase ou fosfatase alcalina, que são detectados na presença de substratos cromogênicos ou quimioluminescentes).

Em um aspecto, a divulgação caracteriza um método de modulação de uma atividade de FcRn, sendo que o método inclui: o contato de um FcRn com um anticorpo de ligação ao FcRn (por exemplo, um anticorpo descrito aqui), modulando,

portanto, a atividade (por exemplo, ligação ao Fc da IgG) do FcRn. Em uma modalidade, o FcRn está presente em um indivíduo humano; o FcRn pode estar presente em uma célula epitelial ou endotelial, ou no sangue (por exemplo, solúvel no sangue ou em células circulantes no sangue) de um indivíduo humano. Em uma modalidade, o anticorpo impede a ligação do FcRn a um substrato, por exemplo, um substrato endógeno, como Fc de IgG e/ou albumina sérica. Em uma modalidade, o FcRn está presente em um endossoma de célula epitelial ou endotelial.

Em um aspecto, a divulgação caracteriza um método de tratamento, prevenção e/ou modulação dos sintomas de um distúrbio, por exemplo, um distúrbio autoimune ou um distúrbio associado com a atividade anômala de FcRn. O método inclui: a administração de um anticorpo de ligação ao FcRn (por exemplo, um anticorpo descrito aqui) a um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que possua o distúrbio ou apresente o risco de desenvolver o distúrbio. Em uma modalidade, o ligante é administrado em uma quantidade e/ou por um tempo suficiente para modular os sintomas do distúrbio.

Em uma modalidade, o distúrbio autoimune é um distúrbio selecionado no grupo constituído por: artrite reumatoide (AR), lúpus eritematoso sistêmico (LES), miastenia gravis (MG), doença de Graves, púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), síndrome de Guillain-Barre, miocardite autoimune, glomerulonefrite membranosa, diabetes mellitus, diabetes tipo I ou tipo II, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, tireoidite autoimune, gastrite, doença celíaca, vitiligo, hepatite, cirrose biliar primária, doença inflamatória intestinal, espondiloartropatias, encefalomielite autoimune experimental, neutropenia imune, diabetes juvenil, e respostas imunogênicas associadas com a hipersensibilidade tardia mediada por citocinas, linfócitos T tipicamente encontrados em tuberculose, sarcoidose, e polimiosite, poliarterite, vasculite cutânea, pênfigo, penfigoide, síndrome de Goodpasture, doença de Kawasaki, esclerose sistêmica, síndrome antifosfolipídio, e síndrome de Sjogren.

Em uma modalidade, os anticorpos da invenção podem ser usados para inibir o transporte da IgG através da barreira hematoencefálica. Em outra modalidade, os anticorpos da invenção podem ser usados para tratar tumores cerebrais ou a doença de Alzheimer.

Em uma modalidade, o anticorpo diminui a meia-vida da IgG endógena. Em uma modalidade, o distúrbio autoimune é caracterizado pela IgG circulante indesejada, por exemplo, IgG patogênica circulante indesejada.

Em um aspecto, a divulgação caracteriza um método de detecção de FcRn em um indivíduo, sendo que o método inclui: a administração de um anticorpo de

ligação ao FcRn (por exemplo, um anticorpo descrito aqui), que inclua um marcador detectável, a um indivíduo; e a detecção de um marcador em um indivíduo. O método pode incluir a imagiologia do indivíduo, por exemplo, por tomografia, por exemplo, a IRM.

- 5 Em um aspecto, a divulgação caracteriza um método de modulação da(os) meia-vida/níveis de IgG circulante, sendo que o método inclui: a identificação de um indivíduo, por exemplo, um humano, que necessite de meia-vida/níveis de IgG circulante modulada(os); e a administração de um anticorpo de ligação ao FcRn (por exemplo, um anticorpo descrito aqui) a um indivíduo em uma quantidade eficaz para  
10 modular a(os) meia-vida/níveis de IgG circulante no indivíduo. Em uma modalidade, o método reduz a(os) meia-vida/níveis de IgG circulante. Em uma modalidade, o anticorpo é administrado para diminuir a(os) meia-vida/níveis de IgG circulante e é combinado com outro agente ou terapia anti-distúrbio autoimune. A combinação da  
15 administração do anticorpo do FcRn com o outro agente ou terapia anti-distúrbio autoimune pode resultar em uma diminuição no nível de outro agente ou terapia anti-distúrbio autoimune necessário(a) para modular ou reduzir a meia-vida/nível de IgG circulante.

Em outro aspecto, a divulgação caracteriza um ácido nucléico isolado que inclui uma primeira sequência que codifica um primeiro polipeptídeo que inclui uma  
20 sequência pelo menos 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% idêntica à sequência de uma primeira sequência de domínio variável de 3B3.11, 31.1, 532A-M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11, ou uma  
25 sequência que hibridiza (por exemplo, em condições estringentes) com um ácido nucléico que codifica a sequência de um domínio variável de 3B3.11, 31.1, 532A-M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11. Em uma modalidade, o ácido nucleico inclui ainda uma segunda sequência que codifica um  
30 segundo polipeptídeo que inclui uma segunda sequência de domínio variável (de um domínio variável correspondente), por exemplo, uma sequência pelo menos 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% idêntica à sequência de uma segunda sequência de domínio variável de 3B3.11, 31.1, 532A-M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11, ou uma sequência que hibridiza (por  
35 exemplo, em condições estringentes) com um ácido nucleico que codifica a sequência de um domínio variável de 3B3.11, 31.1, 532A-M0090-F09, M0084-B03,

M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11. Em uma modalidade, o ácido nucleico inclui ainda sequências reguladoras (por exemplo, uma sequência promotora, uma região 5' não traduzida e uma região 3' não traduzida) e/ou sequências vetoriais.

- 5 Por exemplo, o ácido nucleico constitui um vetor.

Em ainda outro aspecto, a divulgação caracteriza uma célula hospedeira que pode expressar um anticorpo. A célula hospedeira inclui um ou mais ácidos nucleicos que incluem coletivamente: (1) uma primeira sequência que codifica uma primeira sequência de domínio variável que inclui uma sequência pelo menos 80, 85, 10 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% idêntica à sequência de uma primeira sequência de domínio variável de 3B3.11, 31.1, 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11, ou uma sequência que hibridiza (por exemplo, em condições estringentes) com um ácido nucleico que codifica a 15 sequência de um domínio variável de 3B3.11, 31.1, 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11; e (2) uma segunda sequência que codifica uma segunda sequência de domínio variável que inclui uma segunda sequência de domínio variável (de um domínio variável correspondente), por exemplo, uma 20 sequência pelo menos 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% idêntica à sequência de uma segunda sequência de domínio variável de 3B3.11, 31.1, 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11, ou uma sequência que hibridiza (por exemplo, em condições estringentes) com um ácido 25 nucleico que codifica a sequência de um domínio variável de 532A- M0090-F09, M0084-B03, M0056-G05, M0084-B11, M0092-D02, M0055-G12, M0057-F02, M0062-C09, M0064-H04, M0073-E10 ou M0090-F11.

Em um aspecto, a divulgação caracteriza um método de tratamento ou prevenção de um distúrbio autoimune, sendo que o método compreende: a 30 administração de um anticorpo de ligação ao FcRn (por exemplo, um anticorpo descrito aqui), por exemplo, em combinação com uma segunda terapia, a um indivíduo que possua um distúrbio autoimune ou apresente o risco de desenvolver o distúrbio. Por exemplo, a segunda terapia pode ser uma terapia apropriada para o tratamento ou prevenção do distúrbio. Em uma modalidade, a segunda terapia pode 35 incluir: terapia intravenosa com Ig; drogas anti-inflamatórias não esteróides (DAINS); corticosteroides; ciclosporinas, rapamicinas, ascomicinas, ou seus análogos

imunossupressores, por exemplo, ciclosporina A, ciclosporina G, FK-506, rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina; ciclofosfamida; azatioprina; metotrexato; brequinar; FTY 720; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato mofetil; 15-deoxispergualina; anticorpos monoclonais imunossupressores, por exemplo,

5 anticorpos monoclonais para receptores de leucócitos, por exemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD25, CD28, B7, CD45 ou CD58, ou seus ligantes; outros compostos imunomoduladores, por exemplo, CTLA4Ig; ou outros inibidores de moléculas de adesão, por exemplo, mAbs ou inibidores de baixo peso molecular, incluindo antagonistas de selectina.

10 Em outro aspecto, a divulgação caracteriza um método de tratamento de um feto, sendo que o método inclui: a conjugação de uma droga de molécula pequena ou droga macromolecular, por exemplo, um antibiótico ou vacina (por exemplo, vacina viral), com um anticorpo de ligação ao FcRn; e a administração do conjugado a uma mulher gestante que carregue o feto *in utero*. Em uma modalidade, o feto

15 possui um distúrbio ou apresenta o risco de desenvolver um distúrbio. Distúrbios exemplares incluem um distúrbio imunológico (por exemplo, um distúrbio autoimune, um distúrbio metabólico, ou um distúrbio infeccioso, por exemplo, uma infecção bacteriana ou viral, por exemplo, uma infecção entérica (por exemplo, infecção por *Helicobacter pylori*).

20 Em outro aspecto, a divulgação caracteriza um método de tratamento de uma criança, sendo que o método compreende: a conjugação de uma droga de molécula pequena ou droga macromolecular com um anticorpo que se ligue ao FcRn, por exemplo, um anticorpo descrito aqui; e a introdução do anticorpo conjugado no leite materno. O leite materno pode ser administrado à criança. Em uma modalidade, o

25 anticorpo conjugado é administrado a uma mulher, e a mulher está em processo de fornecimento de leite materno para a criança, de forma direta, por exemplo, por amamentação, ou indiretamente.

Embora a invenção seja discutida primeiramente em termos de uma modalidade de anticorpos recomendada, uma pessoa versada na técnica irá

30 reconhecer facilmente que ligantes ou proteínas de ligação diferentes de anticorpos estão dentro do escopo da divulgação.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 ilustra o resultado de uma análise por ELISA para anticorpos em soros de camundongo obtidos 56 dias após imunização de animais imunizados com

35 DNA que codifica hFcRn ou hFcRn ligado a GPI; bem como com DNA que codifica β2M humana para reatividade com hFcRn ou β2M humana. Camundongos #180-

184 foram imunizados com hFcRn codificado por plasmídeo; camundongos #185-189 com hFcRn codificado por plasmídeo e h $\beta$ 2M codificada por plasmídeo; camundongos #190-194 foram imunizados com hFcRn ligado a GPI codificado por plasmídeo; camundongos #195-199 foram imunizados com hFcRn ligado a GPI codificado por plasmídeo e h $\beta$ 2M codificada por plasmídeo.

A **Figura 2** ilustra o resultado de uma análise por ELISA para anticorpos em soros de camundongo obtidos 94 dias após imunização de animais imunizados com DNA que codifica hFcRn ou hFcRn ligado a GPI; bem como com DNA que codifica  $\beta$ 2M humana para reatividade com hFcRn ou  $\beta$ 2M humana.

A **Figura 3** ilustra os resultados de uma análise por FACS que foi realizada para determinar se os sobrenadantes dos clones derivados de camundongos #182 foram capazes de bloquear a ligação da hIgG ao hFcRn em células 293C11 (células HEK 293 engenheradas para superexpressar FcRn). As células 293C11 foram incubadas com sobrenadantes de hibridoma durante 60-90 minutos e, então, foram lavadas com PBS, seguido pela incubação com hIgG marcada com Alexa Fluor-488. Os resultados estão expressos em termos de (A) intensidade total média de fluorescência (ITMF) ou (B) porcentagem de alteração (inibição ou ativação) na ligação da IgG humana ao FcRn.

A **Figura 4** ilustra os resultados de uma análise por FACS que foi realizada para determinar a atividade de bloqueio dos sobrenadantes de hibridoma derivados de camundongos #187 com o método descrito no Exemplo 6. Os resultados estão expressos em termos de (A) intensidade total média de fluorescência (ITMF) ou (B) porcentagem de alteração (inibição ou ativação) na ligação da IgG humana ao FcRn.

A **Figura 5** ilustra os resultados de uma análise por FACS que foi realizada para determinar a potência da atividade de bloqueio do FcRn em várias concentrações de (A) mAb 31.1, mAb 4.13 e hIgG1; ou (B) mAb 3B3.11, mAb 4B4.12 e hIgG1, por meio do exame da marcação da superfície celular de células 293 C11 (células HEK 293 engenheradas para superexpressar FcRn) que foram incubadas na presença de hIgG marcada com Alexa Fluor-488 e hIgG1 ou anticorpos monoclonais de bloqueio anti-FcRn. Os resultados estão expressos como percentagens de ligação da hIgG às células 293C11 definidas como ITMF em várias concentrações divididas pela ITMF de amostras sem competidores vezes 100%.

A **Figura 6** ilustra os histogramas de uma análise por FACS que foi realizada para determinar a ligação de mAb 3B3.11, mAb 31.1, mAb 4.13, mAb 4B4.12 e mAb 15B6.1 à superfície celular de células 293 C11 com expressão de hFcRn (células HEK 293 engenheradas para superexpressar hFcRn).

A **Figura 7** ilustra os histogramas de uma análise por FACS que foi realizada para determinar a ligação de mAb 3B3.11, mAb 31.1, mAb 4.13 e mAb 4B4.12 à superfície celular de células com expressão de FcRn de rato (fibroblastos de rato engenherados para superexpressar FcRn de rato).

5 A **Figura 8** ilustra os histogramas de uma análise por FACS que foi realizada para determinar a ligação de mAb 3B3.11, mAb 4.13, mAb 31.1, mAb 4B4.12 e mAb 15B6.1 à superfície celular de células 3T3 de camundongo com expressão de FcRn (células NIH 3T3 engenheradas para superexpressar FcRn de camundongo).

10 A **Figura 9** ilustra os histogramas de uma análise por FACS que foi realizada para determinar a ligação de mAb 3B3.11, mAb 4.13, mAb 31.1, mAb 4B4.12 e mAb 15B6.1 ao hFcRn expresso de forma intracelular em células THP (uma linhagem 15 celular monocítica humana).

15 A **Figura 10** ilustra os histogramas de uma análise por FACS que foi realizada para determinar a ligação de mAb 3B3.11, mAb 4.13, mAb 31.1, mAb 4B4.12 e mAb 15B6.1 ao hFcRn expresso de forma intracelular em células Caco-2 (uma linhagem 20 celular do epitélio intestinal humano).

20 A **Figura 11** ilustra a porcentagem da (A) população de macrófagos de baço de camundongo e a (B) população total de células de baço de camundongo, que são reativas na superfície ou de forma intracelular com mAb 4B4.12 ou o controle isotípico, mIgG2a (1813).

25 A **Figura 12** ilustra o peso médio do (A) baço e dos (B) linfonodos inguinais de camundongos imunizados com OVA/CFA e tratados com mAb 4B4.12, o controle isotípico, mIgG2a (1813) ou PBS. Os camundongos foram imunizados com OVA/CFA e tratados com 10 injeções IP de 1mg de 4B4.12 ou controle isotípico 1813.

30 A **Figura 13** ilustra o efeito nos níveis séricos da IgG antiovalbumina (OVA) de camundongos Balb/c, que foram imunizados com OVA, e então tratados com mAb 4B4.12, o controle positivo, mIgG2a (1813) ou PBS. O tratamento com anticorpos consistiu em três injeções intraperitoneais (IP) diárias de anticorpos, seguido por 10 injeções IP de anticorpos em dias alternados. Os resultados mostrados foram obtidos após 9 dias de tratamento com anticorpos (5 injeções).

35 A **Figura 14** ilustra o efeito nos níveis séricos da IgG humana de camundongos CD-1, que receberam injeção intraperitoneal (IP) com 1 mg/kg de IgG humana (Synagis), e foram então tratados após 72 horas com injeção IP única de 20 mg/kg de mAb 4B4.12, 20 mg/kg de controle isotípico, mIgG2a (1813) ou PBS. As amostras de soro foram obtidas imediatamente antes da injeção de mAB (72 horas

após a injeção de Synagis), 72 e 168 horas após a injeção de mAB. Os resultados mostrados foram obtidos a partir do soro extraído 24 horas após o tratamento com anticorpos.

A Figura 15 ilustra o mesmo experimento, conforme descrito na Figura 14, 5 com dois pontos extras de amostragem de soro (72 e 168 horas). Os resultados foram expressos como porcentagem de Synagis restante, em comparação com o nível de Synagis antes da injeção de mAB.

A Figura 16 ilustra um tempo de curso do efeito do tratamento com mAb 4B4.12, o controle isotípico, mIgG2a (1813) ou PBS na gravidade dos sintomas da 10 miastenia gravis autoimune experimental (MGAE). A gravidade da doença foi avaliada pela atribuição de uma escala de zero a quatro sintomas graves progressivos, conforme a seguir: 0, nenhum sintoma; 1, dor moderada repentina, fatigabilidade e, ocasionalmente, respiração dificultosa ou ruidosa; 2, fraqueza geral, postura arqueada em repouso, diminuição do peso corporal, tremores; 15 3, fraqueza severa, estado agonizante; e 4, morte.

A Figura 17 ilustra o efeito do tratamento com mAb 4B4.12, o controle isotípico, mIgG2a (1813) ou PBS na perda de peso, expresso em gramas (conforme mostrado no eixo y), como um resultado da miastenia gravis autoimune experimental (MGAE).

20 A Figura 18 ilustra uma comparação da cinética de liberação da IgG humana biotinilada (biotina-hIgG) versus a IgG humana não marcada (hIgG) para camundongos Tg32B (hFcRn<sup>+/+</sup>, h $\beta$ 2M<sup>+/+</sup>, mFcRn<sup>-/-</sup>, m $\beta$ 2M<sup>-/-</sup>). Os animais receberam injeção intravenosa (IV) com 5 mg/kg de IgG humana biotinilada (Synagis) e 495 mg/kg de hIgG não marcada. Os soros foram coletados nos pontos 25 temporais mostrados na figura, e as concentrações de biotina-hIgG sérica foram determinadas por meio do uso de placas de avidina (Pierce Chemicals), e a hIgG não marcada foi avaliada por ELISA.

A Figura 19 ilustra a cinética de liberação da IgG humana biotinilada (biotina-hIgG) para camundongos Tg32B (hFcRn <sup>+/+</sup>, h $\beta$ 2M<sup>+/+</sup>, mFcRn <sup>-/-</sup>, m $\beta$ 2M <sup>-/-</sup>), 30 seguido pelo tratamento dos animais com mAb 3B3.11. Os animais receberam injeção intravenosa (IV) com 5 mg/kg de IgG humana biotinilada (Synagis) e 495 mg/kg de hIgG não marcada. Após 24 horas, injeções IV diárias de 50 mg/kg de mAb 3B3.11 foram iniciadas e então mantidas por um período de 5 dias. Os soros foram coletados nos pontos temporais mostrados na figura, e as concentrações de 35 biotina-hIgG sérica foram determinadas por meio do uso de placas de avidina (Pierce Chemicals).

A **Figura 20** ilustra um gráfico de barras de uma análise por FACS que foi realizada para determinar a ligação de mAb 3B3.11, mAb 4.13, mAb 31.1, mAb 4B4.12 e mAb 15B6.1 às células COS 1 transfectadas com FcRn/β2M de macaco. Os resultados estão expressos como ITMF.

5 A **Figura 21** ilustra um método Western Blot que foi realizado para determinar a ligação específica de mAB3B3.11, 15B6.1, 4.13 e 31.1 à cadeia alfa do hFcRn e a ligação específica de mAb 3B5.4 e 5A4.9 à β2M.

A **Figura 22** ilustra uma análise de epítopos Biacore que foi realizado para determinar os epítopos reconhecidos pelos mABs.

10 A **Figura 23** ilustra os efeitos de quatro doses intravenosas diárias consecutivas de M90-F11, M84-B11 e M55-G12 no catabolismo da biotina-IgG em camundongos TG32B.

A **Figura 24** ilustra uma resposta à dose de M90-F11 no catabolismo da hIgG em camundongos Tg hFcRn (quatro doses intravenosas diárias consecutivas).

15 A **Figura 25** ilustra uma resposta à dose única de M90-F11 no catabolismo da hIgG em camundongos Tg hFcRn.

A **Figura 26** ilustra abordagens usadas para maturar por afinidade a linhagem germinativa M90-F11.

20 A **Figura 27** ilustra o efeito da IgG maturada por afinidade e do FAB solúvel na aceleração do catabolismo da hIgG em camundongos Tg32B em uma dose intravenosa de 20 mg/kg (biotina-IgG & IgG total).

A **Figura 28** ilustra o efeito da IgG maturada por afinidade e do FAB solúvel na aceleração do catabolismo da hIgG em camundongos Tg32B em uma dose intravenosa de 5 mg/kg (biotina-IgG & IgG total).

25 A **Figura 29** ilustra as mudanças na linhagem germinativa M90-F11 (destacadas em **negrito**) introduzidas na cadeia leve, mas não na cadeia pesada.

A **Figura 30** ilustra a variação alotípica da IgG.

A **Figura 31** ilustra o efeito dos anticorpos anti-FcRn administrados por via intravenosa no catabolismo da hIgG em camundongos Tg32B.

30 A **Figura 32** ilustra o efeito do anticorpo anti-FcRn M161-B04 (DX2504) administrado por via subcutânea no catabolismo da hIgG em camundongos Tg32B.

A **Figura 33** ilustra o efeito dos anticorpos anti-FcRn no catabolismo da hIgG em macacos cynomolgus. A Figura 33A ilustra os momentos em que uma amostra de sangue foi coletada. A Figura 33B ilustra o nível total de IgG sérica quando 35 nenhum anticorpo anti-FcRn M161-B04 foi administrado.

A **Figura 34** ilustra o efeito do anticorpo anti-FcRn M161-B04 administrado

por via intravenosa (Figura 34A) e por via subcutânea (Figura 34B) a 5 mg/kg em macacos. Os dados de cada macaco estão representados.

A Figura 35 ilustra o efeito do anticorpo anti-FcRn M161-B04 administrado por via intravenosa (Figura 35A) e por via subcutânea (Figura 35B) a 20 mg/kg em 5 macacos. Os dados de cada macaco estão representados.

A Figura 36 ilustra o efeito do anticorpo anti-FcRn M161-B04 administrado por via intravenosa e por via subcutânea em várias concentrações em macacos (dados normalizados na pré-dose).

A Figura 37 ilustra o efeito do anticorpo anti-FcRn M161-B04 administrado 10 por via intravenosa e por via subcutânea na concentração de IGA sérica (Figura 37A), IgM sérica (Figura 37B) e albumina sérica (Figura 37C) em macacos (dados normalizados na pré-dose).

A Figura 38 ilustra as sequências do DX-2504 e seus alinhamentos.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

15 Em circunstâncias normais, o FcRn pode estender a meia-vida da IgG circulante. Os anticorpos que se ligam ao FcRn podem ser usados para modular a função do FcRn, por exemplo, por meio da prevenção da interação com a IgG. Em particular, os anticorpos que bloqueiam a interação do FcRn com a IgG podem ser usados para reduzir a meia-vida das moléculas de IgG.

20 Estes anticorpos e estratégias relacionadas podem ser usados para tratar e, ainda, prevenir distúrbios autoimunes mediados por anticorpos, como esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide (AR) e lúpus eritematoso sistêmico (LES), ou outro distúrbio autoimune descrito aqui. Um antagonista de 25 anticorpo monoclonal (mAb)1G3 anti-FcRn de rato previu com êxito a miastenia gravis autoimune experimental (MGAE) em um modelo de rato passivo em uma dose de 30 mg/kg; que é cerca de 100 vezes inferior à IgG intravenosa (IVIG) usada no tratamento de MG, LES e PTI. Além disso, os camundongos com deficiência de FcRn, geneticamente predispostos a desenvolverem um distúrbio autoimune, como lúpus ou artrite, apresentam uma redução significativa na gravidade da doença. 30 Portanto, os anticorpos de bloqueio anti-FcRn humano possuem potencial terapêutico para tratamento de distúrbios autoimunes em humanos.

35 Esta divulgação fornece ainda, *inter alia*, antagonistas humanos de anticorpos anti-FcRn humano que estão disponíveis para o tratamento de distúrbios autoimunes e para a redução dos níveis de IgGs circulantes. Também divulgada está a identificação de Fabs solúveis de alta afinidade (sFab) capazes de se ligarem por meio do domínio de ligação ao antígeno e bloquearem a interação entre o IgG-Fc e

- o FcRn humano ou FcRn de rato (conforme avaliado em ambos os ensaios de ligação de células vivas e de proteínas solúveis com o uso de uma linhagem celular engenherada para superexpressar FcRn humano ou FcRn de rato). Os sFabs podem se ligar e se bloquear de forma independente de pH ou dependente de pH,
- 5 por exemplo, em um pH ácido, como o pH 6. Os sFabs podem ser convertidos em anticorpos de IgG.

## DEFINIÇÕES

- O termo “proteína de ligação” se refere a uma proteína que pode interagir com uma molécula-alvo. Este termo é usado alternadamente com “ligante.” Uma
- 10 “proteína de ligação ao FcRn” ou “ligante de ligação ao FcRn” se refere a uma proteína que pode interagir com um FcRn, e inclui, em particular, proteínas que interagem preferencialmente com um FcRn, por exemplo, uma IgG.

Conforme usado aqui, o termo “anticorpo” se refere a uma proteína que inclui pelo menos um domínio variável de imunoglobulina ou uma sequência de domínio variável de imunoglobulina. Por exemplo, um anticorpo pode incluir uma região variável de cadeia pesada (H) (abreviado aqui como VH), e uma região variável de cadeia leve (L) (abreviado aqui como VL). Em outro exemplo, um anticorpo inclui duas regiões variáveis de cadeia pesada (H) e duas regiões variáveis de cadeia leve (L). O termo “anticorpo” compreende fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos (por exemplo, anticorpos de cadeia única, Fab e fragmentos sFab, F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fd, fragmentos Fv, scFv e fragmentos dAb), bem como de anticorpos completos.

As regiões VH e VL podem ser subdivididas ainda em regiões de hipervariabilidade, denominadas “regiões determinantes de complementaridade” (“CDR”), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas “regiões estruturais” (“FR”). A extensão das regiões estruturais e das CDRs foi precisamente definida (consulte, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequências of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242*, and Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 30 consulte também <http://www.hgmp.mrc.ac.uk>). As definições de Kabat são usadas aqui. Cada VH e VL é composta tipicamente por três CDRs e quatro FRs, dispostas de amino-terminal a carboxi-terminal, na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

O termo “fragmento de ligação ao antígeno” de um anticorpo completo (ou, 35 simplesmente, “parte do anticorpo” ou “fragmento”), conforme usado aqui, se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo completo que retêm a capacidade de

ligação específica a um alvo de interesse. Os exemplos de fragmentos de ligação abrangidos pelo termo “fragmento de ligação ao antígeno” de um anticorpo completo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')<sub>2</sub>, um fragmento bivalente que inclui dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de articulação; (iii) um fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste nos domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (*Ward et al., (1989) Nature 341:544-546*), que consiste em um domínio VH; e (vi) uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada que retém uma funcionalidade. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, estes podem ser ligados, pelo uso de métodos recombinantes, por uma molécula de ligação sintética que os permita ser produzidos como uma única cadeia proteica, em que as regiões VL e VH se pareiam para formar moléculas monovalentes, conhecidas como Fv de cadeia única (scFv). Consulte, por exemplo, *Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883.*

Os fragmentos de anticorpos podem ser obtidos por meio do uso de qualquer técnica apropriada, incluindo técnicas convencionais conhecidas por aqueles versados na técnica. O termo “anticorpo monoespecífico” se refere a um anticorpo que exibe uma única especificidade e afinidade de ligação para um alvo específico, por exemplo, um epítopo. Este termo inclui um “anticorpo monoclonal” ou “composição de anticorpos monoclonais,” que, conforme usado aqui, se refere a uma preparação de anticorpos ou seus fragmentos de composição molecular única. Conforme usado aqui, “isótipo” se refere à classe do anticorpo (por exemplo, IgM ou IgG) que é codificada por genes da região constante da cadeia pesada.

Conforme usado aqui, “afinidade de ligação” se refere à constante de associação aparente ou  $K_a$ . A  $K_a$  é o recíproco da constante de dissociação ( $K_d$ ). Uma proteína de ligação pode, por exemplo, possuir uma afinidade de ligação de pelo menos  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  e  $10^{-11}$  M para uma molécula-alvo específica. A maior afinidade de ligação de um ligante de ligação a um primeiro alvo em relação a um segundo alvo pode ser indicada por uma  $K_a$  (ou um menor valor numérico para  $K_d$ ) para ligação do primeiro alvo maior do que a  $K_a$  (ou um valor numérico para  $K_d$ ) para ligação do segundo alvo. Nesses casos, a proteína de ligação possui especificidade para o primeiro alvo (por exemplo, uma proteína em uma primeira conformação ou sua mímica) em relação ao segundo alvo (por exemplo, a mesma proteína em uma segunda conformação ou sua mímica; ou uma

segunda proteína). As diferenças na afinidade de ligação (por exemplo, para especificidade ou outras comparações) podem ser de pelo menos 1,5; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 50; 70; 80; 100; 500; 1000 ou  $10^5$  vezes.

A afinidade de ligação pode ser determinada por meio de uma variedade de métodos, incluindo diálise de equilíbrio, equilíbrio de ligação, filtração em gel, ELISA, ressonância de plásmons de superfície ou espectroscopia (por exemplo, por meio do ensaio de imunofluorescência). As condições exemplares para a avaliação da afinidade de ligação estão no PBS (tampão fosfato salino), em pH 7,2, a 30°C. Estas técnicas podem ser usadas para avaliar a concentração de proteínas de ligação ligadas e livres como uma função da concentração de proteínas de ligação (ou alvo). A concentração de proteínas de ligação ligadas ([Ligadas]) é relacionada com a concentração de proteínas de ligação livres ([Livres]) e com a concentração de sítios de ligação das proteínas de ligação no alvo, em que ( $N$ ) é o número de sítios de ligação por molécula-alvo, por meio da seguinte equação:

$$[Ligadas] = N \cdot [Livres] / ((1/K_a) + [Livres]).$$

Nem sempre é necessário efetuar uma determinação exata da  $K_a$ , ainda que, embora às vezes seja suficiente obter uma medição quantitativa da afinidade, por exemplo, determinada pelo uso de um método como a análise por ELISA ou por FACS, que seja proporcional à  $K_a$ , e, portanto, que possa ser usada para realizar comparações, como determinar se uma maior afinidade é, por exemplo, 2 vezes maior, para obter uma medição qualitativa da afinidade, ou para obter uma inferência da afinidade, por exemplo, pela atividade em um ensaio funcional, por exemplo, um ensaio *in vitro* ou *in vivo*.

O termo “ligante cognato” se refere a um ligante de ocorrência natural de um FcRn, incluindo seus variantes de ocorrência natural (por exemplo, variantes de *splice*, mutantes de ocorrência natural e isoformas).

Uma “substituição conservadora de aminoácido” é uma em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral semelhante. As famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina, triptofano), cadeias laterais com ramificação beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais

aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Muitos resíduos de aminoácidos de estruturas e de CDRs podem incluir uma ou mais substituições conservadoras.

As sequências consenso para biopolímeros podem incluir posições em que estas podem variar entre vários aminoácidos. Por exemplo, o símbolo "X" nesse contexto geralmente se refere a qualquer aminoácido (por exemplo, qualquer um dos vinte aminoácidos naturais ou qualquer um dos dezenove aminoácidos não-cisteína). Outros aminoácidos possíveis também podem ser indicados, por exemplo, por meio do uso de parênteses e barras. Por exemplo, "(A/W/F/N/Q)" significa que alanina, triptofano, fenilalanina, asparagina e glutamina são permitidas em uma posição específica.

Uma região variável de imunoglobulina "efetivamente humana" é uma região variável de imunoglobulina que inclui um número suficiente de posições de aminoácidos de estrutura humana, de modo que a região variável de imunoglobulina não induza a uma resposta imunogênica em um humano normal. Um anticorpo "efetivamente humano" é um anticorpo que inclui um número suficiente de posições de aminoácidos humanos, de modo que o anticorpo não induza a uma resposta imunogênica em um humano normal.

Um "epítopo" se refere ao sítio em um composto-alvo que é ligado por uma proteína de ligação (por exemplo, um anticorpo como um Fab ou um anticorpo completo). Na hipótese em que o composto-alvo for uma proteína, o sítio pode ser inteiramente composto por componentes de aminoácidos, inteiramente composto por modificações químicas dos aminoácidos da proteína (por exemplo, frações glicosila) ou composto por suas combinações. Os epítopos sobrepostos incluem pelo menos um resíduo de aminoácido comum.

Os cálculos de "homologia" ou "identidade de sequência" entre duas sequências (os termos são usados aqui alternadamente) são realizados conforme a seguir. As sequências são alinhadas para fins de comparação ideal (por exemplo, espaços podem ser introduzidos em uma ou em ambas uma primeira e uma segunda sequência de aminoácidos ou ácidos nucleicos para o alinhamento ideal, e as sequências não homólogas podem ser desprezadas para fins de comparação). O alinhamento ideal é determinado como a melhor pontuação, por meio do uso do programa GAP do pacote de software GCG com uma matriz de pontuação Blosum 62 contendo uma penalidade para espaços de 12, uma penalidade por extensão de espaços de 4, e uma penalidade para espaços por mudança de leitura de 5. Os resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos em posições de aminoácidos ou posições

de nucleotídeos correspondentes são então comparados. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelo mesmo resíduo ou nucleotídeo de aminoácido como a posição correspondente na segunda sequência, as moléculas são idênticas nessa posição (conforme usado aqui, a “identidade” do aminoácido ou ácido nucléico é equivalente à “homologia” do aminoácido ou ácido nucléico). A porcentagem de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências.

Em uma modalidade, o comprimento de uma sequência de referência alinhada para fins de comparação é pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, 80%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% ou 100% do comprimento da sequência de referência. Por exemplo, a sequência de referência pode ser o comprimento da sequência de domínio variável de imunoglobulina.

Uma região variável de imunoglobulina “humanizada” é uma região variável de imunoglobulina que é modificada para incluir um número suficiente de posições de aminoácidos de estrutura humana, de modo que a região variável de imunoglobulina não induza a uma resposta imunogênica em um humano normal. As descrições de imunoglobulinas “humanizadas” incluem, por exemplo, US 6.407.213 e US 5.693.762.

Conforme usado aqui, o termo “se hibridiza em condições de baixa estringência, média estringência, alta estringência, ou estringência muito alta” descreve as condições para hibridização e lavagem. Diretrizes para a realização de reações de hibridização podem ser encontradas em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, que são incorporadas por referência. Métodos aquosos e não aquosos são descritos nessa referência e também podem ser usados. As condições de hibridização específicas mencionadas aqui são conforme a seguir: (1) condições de hibridização de baixa estringência em cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) 6X a cerca de 45°C, seguido por duas lavagens em SSC 0,2X, 0,1% de SDS a pelo menos 50°C (a temperatura das lavagens pode ser aumentada para 55°C em condições de baixa estringência); (2) condições de hibridização de média estringência em SSC 6X a cerca de 45°C, seguido por uma ou mais lavagens em SSC 0,2X, 0,1% de SDS a 60°C; (3) condições de hibridização de alta estringência em SSC 6X a cerca de 45°C, seguido por uma ou mais lavagens em SSC 0,2X, 0,1% de SDS a 65°C; e (4) condições de hibridização de estringência muito alta em 0,5M de fosfato de sódio, 7% de SDS a 65°C, seguido por uma ou mais lavagens a SSC 0,2X, 1% de SDS a 65°C. As

condições de hibridização de estringência muito alta (4) são as condições recomendadas e aquelas que devem ser usadas, salvo disposição em contrário. A divulgação inclui ácidos nucleicos que se hibridizam com estringência baixa, média, alta ou muito alta a um ácido nucleico descrito aqui ou seu complemento, por exemplo, ácidos nucleicos que codificam uma proteína de ligação descrita aqui. Os ácidos nucleicos podem ser do mesmo comprimento ou 30, 20 ou 10% do comprimento do ácido nucléico de referência. O ácido nucleico pode corresponder à região que codifica uma sequência de domínio variável de imunoglobulina.

Uma proteína de ligação ao FcRn pode possuir mutações (por exemplo, pelo menos uma, duas ou quatro, e/ou menos de 15, 10, 5 ou 3) em relação a uma proteína de ligação descrita aqui (por exemplo, uma substituição de aminoácido conservadora ou não essencial), que não possui um efeito substancial nas funções proteicas. O fato de uma substituição particular ser tolerada ou não, isto é, não irá afetar adversamente as propriedades biológicas, de modo que a atividade de ligação pode ser prevista, por exemplo, por meio do uso do método de Bowie, *et al.* (1990) *Science* 247:1306-1310.

Um “domínio de imunoglobulina” se refere a um domínio variável ou constante das moléculas de imunoglobulina. Os domínios de imunoglobulina contêm tipicamente duas folhas  $\beta$  formadas por cerca de sete filamentos  $\beta$ , e uma ligação dissulfeto conservada (consulte, por exemplo, A. F. Williams and A. N. Barclay 1988 *Ann. Rev Immunol.* 6:381-405).

Conforme usado aqui, uma “sequência de domínio variável de imunoglobulina” se refere a uma sequência de aminoácidos que pode formar a estrutura de um domínio variável de imunoglobulina, de modo que uma ou mais regiões CDR sejam posicionadas em uma conformação apropriada para um sítio de ligação ao antígeno. Por exemplo, a sequência pode incluir uma parte ou toda a sequência de aminoácidos de um domínio variável de ocorrência natural. Por exemplo, a sequência pode omitir um, dois ou mais aminoácidos N- ou C-terminais, aminoácidos internos, pode incluir uma ou mais inserções ou aminoácidos terminais adicionais, ou pode incluir outras alterações. Em uma modalidade, um polipeptídeo que inclui uma sequência de domínio variável de imunoglobulina pode se associar a outra sequência de domínio variável de imunoglobulina para formar uma estrutura-alvo de ligação (ou “sítio de ligação ao antígeno”), por exemplo, uma estrutura que interaja preferencialmente com uma estrutura do FcRn.

A cadeia VH ou VL do anticorpo pode ainda uma parte ou toda região constante de uma cadeia pesada ou leve, e assim formar uma cadeia pesada ou

leve de imunoglobulina, respectivamente. Em uma modalidade, o anticorpo é um tetrâmero de duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina, onde as cadeias pesadas e leves de imunoglobulina são interconectadas através, por exemplo, de ligações de dissulfeto. A região constante da cadeia pesada inclui três domínios, CH1, CH2 e CH3. A região constante da cadeia leve inclui um domínio CL. A região variável das cadeias leves e pesadas contém um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos tipicamente mediam a ligação do anticorpo em tecidos hospedeiros ou fatores, incluído várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efetoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema complementar clássico. O termo “anticorpo” inclui imunoglobulinas intactas dos tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (como também subtipos das mesmas). As cadeias leves da imunoglobulina podem ser dos tipos: kappa ou lambda. Em uma modalidade, o anticorpo é glicosilado. Um anticorpo pode ser funcional para uma citotoxicidade dependente de anticorpo e/ou citotoxicidade mediada por complemento.

Uma ou mais regiões de um anticorpo podem ser humanas ou efetivamente humanas. Por exemplo, uma ou mais das regiões variáveis podem ser humanas ou efetivamente humanas. Por exemplo, um ou mais dos CDRs podem ser humanos, por exemplo, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, e LC CDR3. Cada um dos CDRs de cadeia leve pode ser humano. CDR3 de cadeia pesada pode ser humano. Uma ou mais das regiões de estrutura podem ser humanas, por exemplo, FR1, FR2, FR3, e FR4 de cadeia pesada ou cadeia leve. Em uma modalidade, todas as regiões de estrutura são humanas, por exemplo, derivadas de uma célula somática humana, por exemplo, uma célula hematopoietica que produz imunoglobulinas ou uma célula não-hematopoietica. Em uma modalidade, as seqüências humanas são seqüências de linhas germinativas, por exemplo, codificadas por uma linha germinativa de ácido nucleico. Uma ou mais das regiões constantes podem ser humanas ou efetivamente humanas. Em uma modalidade, ao menos 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, ou 98% de, ou a totalidade do anticorpo podem ser humanas ou efetivamente humanas.

Um anticorpo inteiro ou parte dele pode ser codificado dentro de um gene de imunoglobulina ou segmento do mesmo. Exemplos de genes de imunoglobulina humana incluem os genes de regiões constantes kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gama (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon e mu, bem como os genes miríades de imunoglobulina de regiões variáveis. “Cadeias leves” de imunoglobulinas completas (cerca de 25 KDa ou 214 aminoácidos) são codificadas por um gene de região

variável no terminal NH<sub>2</sub>- (cerca de 110 aminoácidos) e um gene de região constante kapa ou lambda no terminal COOH--. "Cadeias pesadas" de imunoglobulinas completas (cerca de 50 KDa ou 446 aminoácidos) são similarmente codificadas por um gene de região variável (cerca de 116 aminoácidos) e um dos outros genes de região constante já mencionados, por exemplo, gama (codificando cerca de 330 aminoácidos).

Uma "composição isolada" se refere a uma composição que é removida de no mínimo 90% de ao menos um componente de uma amostra natural da qual a composição isolada pode ser obtida. As composições produzidas artificialmente ou naturalmente podem ser "composições de ao menos" um certo grau de pureza se a espécie ou população de espécies de interesse for ao menos 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98, ou 99% pura em uma base peso-peso.

O termo "mímica" no contexto de uma mímica de uma conformação de uma estrutura FcRn ou porção da mesma se refere a uma estrutura modificada de FcRn que possui uma propensão para ao menos uma conformação particular relativa ao FcRn de ocorrência natural, ou porção do mesmo.

Um resíduo de aminoácido "não essencial" é um resíduo que pode ser alterado a partir da seqüência do tipo selvagem do agente de ligação, por exemplo, o anticorpo, sem anular ou sem alterar substancialmente uma atividade biológica, considerando que um resíduo de aminoácido "essencial" resulta em tal mudança.

As frases "administração parenteral" e "administrado parenteralmente" conforme usadas aqui significam os modos de administração diferentes da administração enteral e tópica, normalmente por injeção, e incluem sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtracheal, subcutânea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnóidea, medular, peridural.

Os termos "polipeptídeo" ou "peptídeo" (que pode ser usado alternadamente) se refere a um polímero de três ou mais aminoácidos unidos por uma ligação de peptídeo, por exemplo, entre 3 e 30, 12 e 60, ou 30 e 300, ou mais de 300 aminoácidos no comprimento. O polipeptídeo pode incluir um ou mais aminoácidos não naturais. Tipicamente, o polipeptídeo inclui apenas aminoácidos naturais. Uma "proteína" pode incluir uma ou mais cadeias de polipeptídeo. De acordo com isso, o termo "proteína" engloba polipeptídeos. A proteína ou o polipeptídeo pode ainda incluir uma ou mais modificações, por exemplo, uma glicosilação, amidação, fosforilação, nitrosilação, e assim por diante. O termo "peptídeo pequeno" pode ser usado para descrever um polipeptídeo que está entre 3 e 30 aminoácidos no

comprimento, por exemplo, entre 8 e 24 aminoácidos no comprimento.

Uma “quantidade profilaticamente aceitável” se refere a uma quantidade eficiente, em dosagens por períodos necessários de tempo, para obter o resultado profilático desejado. Tipicamente, porque uma dose profilática seja usada em 5 indivíduos antes de, ou em um estágio anterior da doença em quantidade profilaticamente aceitável será menos do que a quantidade terapeuticamente eficaz.

Conforme usados aqui, o termo “substancialmente idêntico” (ou “substancialmente homólogo”) conforme usados aqui para se referirem para um primeiro aminoácido ou seqüência de ácido nucleico que contém um número 10 suficiente de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos idênticos ou equivalentes (por exemplo, com uma cadeia lateral similar, por exemplo, substituições de aminoácidos conservados) para um segundo aminoácido ou seqüência de ácido nucleico de forma que o primeiro e o segundo aminoácido ou seqüência de ácido nucleico possuam (ou codifiquem proteínas que possuam) atividades similares, por 15 exemplo, uma atividade de ligação, um preferência de ligação, ou uma atividade biológica. No caso de anticorpos, o segundo anticorpo possui a mesma especificidade e possui ao menos 50% de afinidade relativa ao mesmo antígeno.

Seqüências similares ou homólogas (por exemplo, seqüência ao menos 85% idêntica) para as seqüências divulgadas aqui também fazem parte desta aplicação. 20 Em algumas modalidades, a seqüência pode ser até 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idêntica ou mais. Além disso, essa forma substancialmente idêntica existe quando os segmentos de ácido nucleico se hibridizam sob condições seletivas de hibridização (por exemplo, condições de hibridização altamente rigorosas), para o complemento da cepa. Os ácidos nucléicos 25 podem estar presentes em células inteiras, em células lisadas, ou em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura.

A significância estatística pode ser determinada por qualquer método conhecido da técnica. Exemplos de testes estatísticos incluem: o teste *Students T*, teste não paramétrico Mann Whitney U, e teste estatístico não paramétrico Wilcoxon. 30 Algumas relações de significância estatística possuem um valor P menor do que 0,05 ou 0,02. Específicas proteínas de ligação podem apresentar uma diferença, por exemplo, na especificidade ou na ligação, que são estatisticamente significantes (por exemplo, valor de  $P < 0,05$  ou 0,02). Os termos “induzir”, “inibir”, “potenciar”, “elevar”, “aumentar”, “diminuir” ou similares, por exemplo, que denotam diferenças 35 qualitativa ou quantitativamente distinguíveis entre dois estados, e podem se referir a uma diferença, por exemplo, uma diferença estatisticamente significante entre

estes dois estados.

Uma "dosagem terapeuticamente efetiva" modula um parâmetro mensurável, por exemplo, níveis dos anticorpos IgG em circulação por um grau estatisticamente significante ou ao menos cerca de 20%, por ao menos cerca de 40%, por ao menos

- 5 cerca de 60%, ou por ao menos cerca de 80% em relação aos indivíduos não tratados. A capacidade de um composto para modular um parâmetro mensurável, por exemplo, auto-imunidade, pode ser avaliada em um sistema de modelo animal preditivos da eficácia em distúrbio da auto-imunidade humana. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada através do exame da
- 10 capacidade do composto para modular um parâmetro *in vitro*, por exemplo, por ensaios conhecidos por aqueles versados na técnica com experiência prática.

Outras características e vantagens da presente invenção s tornarão mais aparentes a partir das seguintes descrições detalhadas e reivindicações. As modalidades desta invenção podem incluir qualquer combinação de características 15 aqui descritas. Em nenhum dos casos o termo "modalidade" exclui uma ou mais outras características aqui dispostas.

#### SEQÜÊNCIAS DE FCRN

O seguinte alinhamento de seqüência é de uma seqüência de aminoácido de cadeia alfa de FCRn humano com uma seqüência de aminoácido de cadeia alfa de FCRn de rato. Um exemplo de proteína FcRn pode incluir uma dessas duas seqüência, ou fragmento das mesmas, por exemplo, um fragmento sem a seqüência-sinal:

	Seqüência-sinal	Domínio $\alpha_1$
$\alpha$ _HUMANO :	MGVPRPQPWALGLLFLLPGSLG AESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQYLS	
$\alpha$ _RATO :	MGMSQPGV-LLSLLLVLLPQTWG AEPRLPLMYHLAAVSDLSTGLPSFWATGWLGAQQYLT	

	Domínio $\alpha_1$	Domínio $\alpha_2$
$\alpha$ _HUMANO :	YNSLRGEAEP CGAWV WENQV SWYWEKETTD LRIKEKL FLEAF KALGGK--GP	YTLQGLLG
$\alpha$ _RATO :	YNNL RQEAD PCGAWI WENQV SWYWEKETTD LKSKEQLF LEAIR TLEN QINGT	FTLQGLLG

	Domínio $\alpha_2$
30 $\alpha$ _HUMANO :	CEL GDPNT SVPTAKF ALNGEE FMNF DLK QGT WGGD WPE ALA ISQRW QQODKA ANKE LTFL
$\alpha$ _RATO :	CEL APDN SSI LPTA VF ALNGEE FMRF NPRT GNWS GEWP ET DIV GN LWMK QPEA ARKE SEFL

	Domínio $\alpha_2$	Domínio $\alpha_3$
$\alpha$ _HUMANO :	LFSCPHRL REHL ERGR NLEWK EPPSMRL KARPSS PGFS VL TCSAF SFY PPEL QL RF LRN	
$\alpha$ _RATO :	LTSCP ERL LGHL ERGR QNLEWK EPPSMRL KARP GNGSS VLTCA AF SFY PPEL KFR FLRN	

Domínio  $\alpha_3$ 

\_HUMANO: GLAAGTGQGDFGPNSDGSFHASSSLTVKSGDEHHYCCIVQHAGLAQPLRVELE  
\_RATO: GLASGSGNCSTGPNGDGSFHAWSLLEVKGDEHHYQCQEHEGLAQPLTVLDL

## Transmembrana

## Domínio citoplasmático

5     $\alpha$ \_HUMANO: SPAKSSVLVVGIVIGVLLTAAAVGGALLW RRMRSGLPAPWISLRGDDTGVLPTPGEAQ  
 $\alpha$ \_RATO: SPARSSVPVVGIIILGLLLVVVAIAGGVLLW NRMRSGLPAPWLSSLGDDSGDLLPGGNLPP  
  
 $\alpha$ \_HUMANO: DADLKDVNVI PATA (SEQ ID N°:1)  
 $\alpha$ \_RATO: EAEPQGVNAFPATS (SEQ ID N°:2)

O seguinte alinhamento de seqüência é da seqüência de aminoácido de microglobulina de  $\beta 2$  humano com uma seqüência de aminoácido de microglobulina de  $\beta 2$  de rato. Um exemplo de proteína FcRn pode incluir uma dessas duas seqüências, ou fragmento das mesmas, por exemplo, um fragmento sem a seqüência-sinal:

Seqüência-sinal	β2 microglobulina
15    β2m_humano: MSRSVALAVLALLSLSGLEA IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHP PSDIEVDLL	
β2m_rato : MARSVTVIIFLVLSLAVVLA IQKTPQIQVYSRHPPENGKPNFLNCYVSQFHPPQIEIELL	

## β2 microglobulina

β2m_humano: KNGERIEKVEHSDLFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM (SEQ ID N°:3)	β2 microglobulina
20    β2m_rato : KNGKKIPNIEMSDLFSKDWSFYILAHTEFTPTETDVYACRVKHVTLKEPKTVTWDRDM (SEQ ID N°:4)	

um exemplo de seqüência de ácido nucleico codificando uma cadeia alfa de proteína FcRn pode incluir as seguintes seqüências:

Seqüência de nucleotídeo alfa de FcRN de *Homo sapiens*

25    GTTCTTCAGGTACGAGGAGGGCATTTGTCAGTCAGTCTGGACCGAGCCCCGAGACCCCTCCTCGCGTCCT GGTCCCGGCCGTGCCCGGGTGTCCGGAGGAAGGGGCGGGCCGGGGTCGGAGGAGTCACGTGCC CTCCCGCCCCAGGTCTGCCTCTCACCATGGGGTCCCGGGCTCACCCCTGGCGCTGGGGCTCC CTTCTCCTCCTGGAGCCTGGCGAGAAAGCCACCTCTCCCTCTGTACCACCTTACCGCGGTGT TCGCCTGCCCGGGACTCCTGCCTCTGGGTGTCCGGCTGGCTGGCCCGCAGCAGTACCTGAGCT ACA 30    ATAGCCTGCCGGCGAGGCGAGCCCTGTGGAGCTTGGCTCTGGAAAACCAGGTCTGGTATTGG GAAAGAGACACAGATCTGAGGATCAAGGAGAAGCTTTCTGGAAGCTTCAAAGCTTGGGGAAAA GGTCCCTACACTCTGCAGGGCTGCTGGCTGTGAACTGGCCCTGACAACACCTCGGTGCCACCG CCA AGTCGCCCTGAACGGCGAGGAGTCATGAATTGACCTCAAGCAGGGCACCTGGGTGGGACTGG CC	Seqüência de nucleotídeo alfa de FcRN de <i>Homo sapiens</i>
--	--

CGAGGCCCTGGTATCAGTCAGCGGTGGCAGCAGCAGGACAAGGCGGCAACAAGGAGCTCACCTCTG  
 CTATTCTCTGCCGCACCGCCTGGGGAGCACCTGGAGAGGGGCGGGAAACCTGGAGTGGAGGAGC  
 CCCCCCTCCATGCGCCTGAAGGCCCACCCAGCAGCCCTGGTTTCCGTGTTACCTGCAGCGCCTCTC  
 CTTCTACCCCTCCGGAGCTGCAACTTCGGTCTCGGAATGGCTGGCCCTGGCACCCGCCAGGGTGAC  
 5 TTCGGCCCCAACAGTGACGGATCCTCCACGCCCTCGTCACTAACAGTCAAAAGTGGCGATGAGCACC  
 ACTACTGCTGCATTGTGCAGCACGCCGGCTGGCGAGCCCTCAGGGTGGAGCTGGAATCTCAGCCAA  
 GTCCCTCCGTGCTCGTGGTGGGAATCGTCATCGTGTCTGCTACTCACGGCAGCGGCTGTAGGAGGAGCT  
 CTGTTGTGGAGAAGGATGAGGAGTGGGCTGCCAGCCCTGGATCTCCCTCGTGGAGACGACACCGGGG  
 TCCTCCTGCCACCCAGGGAGGGCCAGGATGCTGATTGAAGGATGTAATGTGATTCCAGCCACC  
 10 CTGACCATCCGCCATTCCGACTGCTAAAAGCGAATGTAGTCAGGCCCTTCATGCTGTGAGACCTCTG  
 GAACACTGGCATCTCTGAGCCTCCAGAAGGGTTCTGGCCTAGTTGTCCTCCCTGGAGCCCGTCCT  
 GTGGTCTGCCCTCAGTTCCCTCTTAATACATATGGCTGTTCCACCTCGATAATATAACACGAGTTG  
 GGCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID N°:5)

15 A seqüência de ácido nucleico de um exemplo de FcRn humano (domínio extracelular) mais seqüências de GPI DNA (minúsculas em negrito) está definido abaixo.

ATGGGGGTCCCGCGGCCCTAGCCCTGGCGTGGGCTCTGCTCTTCTCCTGGAGCCTGGCG  
 CAGAAAGCCACCTCTCCCTCTGTACACCTTACCGCGGTGCTCGCTGCCCTGCCCCGGGACTCCTGCCT  
 20 CTGGGTGTCCGGCTGGCTGGGCCCGAGCAGTACCTGAGCTACAATAGCCTGGGGCGAGGCGGAGGCC  
 TGTGGAGCTGGTCTGGAAAACCAGGTGTCTGGTATTGGAGAAAGAGACCAAGACAGATCTGAGGATCAA  
 GGAGAAGCTTTCTGGAAGCTTCAAAGCTTGGGGAAAAGGTCCCTACACTCTGCAGGCCCTGCTGG  
 GCTGTGAACTGGGCCCTGACAACACCTCGGTGCCAACGCCAAGTCCCTGAAACGGCGAGGAGTTCATG  
 AATTCGACCTCAAGCAGGGCACCTGGGTGGGACTGGCCGAGGCCCTGGCTATCAGTCAGCGTGGCA  
 25 GCAGCAGGACAAGCGGCCAACAGGAGCTCACCTCCTGCTATTCTCCTGCCCGACCGCCTGCGGGAGC  
 ACCTGGAGAGGGCCCGGAAACCTGGAGTGGAGGAGCCCCCTCCATGCGCCTGAAGGCCGACCCAGC  
 AGCCCTGGCTTCCGTGTTACCTGCAGCGCCTCTCCTACCCCTGGAGCTGCAACTTCGGTTCC  
 GCGGAATGGCTGGCCCTGGCACCGGCCAGGGTACCTGGCCCAACAGTGACGGATCCTCCACGCC  
 CGTCGTCACTAACAGTCAAAAGTGGCGATGAGCACCACACTGCTGCATTGTGCAGCACGCCAGGGCTGGCG  
 30 CAGGCCCTCAGGGTGGAGCTGGAATCTCCAGCCAAGTCCTCC**cggccgctcgacgggctacgagcatcagt**  
**aacactactaggcgaggctactactatcactactaccagcactactacgattggccataaa**  
 (SEQ ID N°: 6)

Um exemplo de seqüência de ácido nucleico codificando Beta-20-microglobulina ( $\beta$ 2M) pode incluir as seguintes seqüências:

35 Nucleotídeo Beta-2-microglobulina (B2M) de Homo sapiens

AATATAAGTGGAGGCCTCGCGCTGGGGCATTCTGAAGCTGACAGCATTGGCCGAGATGTCTCGCT

CCGTGGCCTAGCTGTGCTCGCGTACTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCATCCAGCGTACTCCAAAGAT  
 TCAGGTTACTCACGTACGCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTT  
 CATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTAAGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGCATTCA  
 TGTCTTCAGCAAGGACTGGCTTCTATCTCTTGACTACACTGAATTCAACCCCCACTGAAAAGATGA  
 5 GTATGCCTGCCGTGAACCATGTGACTTGTACAGCCAAAGATACTTAAGTGGGATCGAGACATGTAA  
 GCAGCATCATGGAGGTTGAAGATGCCGCATGGATTGGATGAATTCAAATTCTGCTTGCTTGCTT  
 TAATATTGATATGTTATACACTTACACTTATGCACAAAATGTAGGGTTATAATAATGTTAACATGGAC  
 ATGATCTCTTATAATTCTACTTGTAGTGTCTCCATGTTGATGTATCTGAGCAGGTTGCTCCACA  
 GGTAGCTCTAGGAGGGCTGGCAACTTAGAGGTGGGAGCAGAGAATTCTCTTATCCAACATCAACATCTT  
 10 GGTCAGATTGAACCTTCATCTTGCACCAAAGCTGTTAAGATAGTTAACGTGCATAAGTTAAC  
 TTCCAATTACATACTCTGCTTAGAATTGGGGAAATTAGAAATATAATTGACAGGATTATTGGAAA  
 TTTGTTATAATGAATGAAACATTGTATAGATTCAATTCTTACATTTGATAAAAGTAA  
 GGCATGGTTGGTTAATCTGGTTATTTGTTCCACAAGTTAAATAACATAAAACTTGATGTGTTA  
 TCTCTTA (SEQ ID N°:7)

15 ANTICORPOS DE CAMUNDONGO ANTI-HUMANO FcRn

*SEQUENCIAS E ESTRUTURAS DE ANTICORPOS*

A invenção está relacionada a um anticorpo que liga especificamente ao menos um epítopo de FcRn, onde a ligação do anticorpo no epítopo de FcRn inibe a porção Fc da IgG de se ligar ao FcRn. A invenção está ainda relacionada com 20 um anticorpo de bloqueio do FcRn. O anticorpo de bloqueio pode ser uma IgG, uma IgM, uma IgA, uma IgD ou uma IgE. Em uma modalidade o anticorpo de bloqueio é uma IgG. Em uma modalidade o anticorpo da invenção possuirá uma afinidade de ligação de  $10^{10} M^{-1}$ . Em outras modalidades o anticorpo da invenção possuirá uma afinidade de ligação de  $10^{11} M^{-1}$ .

25 Em uma modalidade a invenção está relacionada a um anticorpo monoclonal produzido por um hibridoma 3B3.11, um hibridoma 31.1, um hibridoma 4B4.12, ou um hibridoma 17D3.

Em uma modalidade a invenção se relaciona com um anticorpo que se liga em um epítopo linear de FcRn. Em outra modalidade a invenção se relaciona com 30 um anticorpo que se liga em um epítopo conformacional de FcRn. Em uma modalidade o anticorpo da invenção se liga em uma seqüência de aminoácido que compreende EPPSMRLKAR (SEQ ID N°: 105) ou um fragmento do mesmo. Em outra modalidade o anticorpo da invenção se liga em uma seqüência de aminoácido que compreende CSAFYPPELQLRFFLRNGL (SEQ ID N°:106) ou um fragmento do 35 mesmo.

Em certas modalidades, os anticorpos desta invenção reagem

especificamente com um epítopo que é do mesmo tipo que o epítopo reconhecido por 3B3.11 e 31.1. Tais anticorpos podem ser determinados em ensaios de ligação competitiva.

- 5 Sequências de aminoácidos (AA) de modalidades ilustrativas dos anticorpos anti-FcRn desta invenção, incluindo seus domínios  $V_H$  e  $V_L$ , e CDRs, estão enumerados na **Tabela 1**. das modalidades específicas dos anticorpos estão identificadas como 3B3.11 e 31.1.

**Tabela 1: CDRs para anticorpos de camundongo da invenção.**

Anticorpo	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
3B3.11	SASSSISSNYLH (SEQ ID N°:8)	RTSNLAS (SEQ ID N°:9)	QQGSNIPLT (SEQ ID N°:10)	RSWMN (SEQ ID N°:11)	RIHPGDGDTNYN (SEQ ID N°:12)	EGSPYFDY (SEQ ID N°:13)
31.1	KASQDINNYIA (SEQ ID N°:14)	YTSTLQP (SEQ ID N°:15)	LQYDNLRT (SEQ ID N°:16)	DYAMH (SEQ ID N°:17)	VITNYYGDASYN (SEQ ID N°:18)	GGYDGYYV (SEQ ID N°:19)

A sequência de aminoácido para a cadeia leve 3B3.11 está definida abaixo.

- 10 As regiões CDR estão sublinhadas e a região constante está em itálico.

	CDR 1	CDR 2
1	DIQLTQSPTT VAASPGEKIT ITC <u>SASSSIS SNYLH</u> WYQQK PGFSPKLLIY <u>RTSNLAS</u> GVP	
	CDR 3	CL 1
61	ARFSGSGSGT SYSLTIGTME AEDVATYYC <u>Q QGSNIPLTFG</u> AGTKLELKRA DAAPTVSIFP	
15	CL 1	
121	PSSEQLTSGG ASVVCFLNNF YPKDINVWKW <u>IDGSERQNGV LNSWTDQDSK DSTYSMSSTL</u>	
	CL 1	
181	TLTKDEYERH NSYTCEATHK TSTSPIVKSF NKNE (SEQ ID N°:20)	

- 18 A seqüência de aminoácido para a cadeia pesada 3B3.11 está definida 20 abaixo. As regiões CDR estão sublinhadas e a região constante está em itálico.

	CDR 1	CDR 2
1	VKLQESGPTEL VKPGASVKIS CKASGYAFSR <u>SWMNWVKQRP GQGLEWIGRI HPGDGDTNYN</u>	

	CDR 2	CDR 3	CH 1
25	<u>GKFKGKATLT</u> VAKSSSTAYM QLSSLTSVDS AVYFCANE <u>EGS PYFDYWGQGT</u> TLTVSSAKTT		
	CH 1		
121	PPSVYPLAPG SAAQTNSMVT LGCLVKGYFP EPVTVTWNSG SLSSGVHTFP AVLQSDLYTL		
	CH 1		
181	SSSVTVPSSST WPSETVTCNV AHPASSTKVD KKLE (SEQ ID N°:21)		

- 30 A seqüência de aminoácido para a cadeia leve 31.1 está definida abaixo. As

regiões CDR estão sublinhadas e a região constante está em itálico.

	CDR 1	CDR 2
1	DIQLTQSPSS LSASLGDKVT ITC <u>KASQDIN</u> <b><u>NYIAWYQH</u></b> GKRSLLIHY <b><u>TSTLQPGIPS</u></b>	
	CDR 3	CL 1
5	RFSGSGSGRD YFSISNLEP EDIATYYC <u>LO</u> <b><u>YDNLLRT</u></b> FGG GTKLEIKRAD AAPTVSIFPP	
	CL 1	
121	SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVWKI DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT	
	CL 1	
181	LTKDEYERHN SYTCEATHKT STSPIVKSFN KNE (SEQ ID N°:22)	
10	A seqüência de aminoácido para a cadeia pesada 31.1 está definida abaixo.	
	As regiões CDR estão sublinhadas e a região constante está em itálico.	
	CDR 1	CDR 2
1	VXLQQSGAEL VRPGVSVKIS CKGSGYTFT <u>D</u> <b><u>YAMH</u></b> WKQSH AKSLEWIGVI <b><u>TNYYGDASYN</u></b>	
	CDR 2	CDR 3
15	61 <b><u>QKFKGKATMT</u></b> VDKSSSTAYM ELARLTSEDS AIYYCARGGY <b><u>DGYYVDFDYW</u></b> GQGTTLTVSS	
	CL 1	
121	AKTTPPSVYP LAPGSAAQTN SMVTLGCLVK GYFPEPVTVT WNSGSLSSGV HTFPAVLQSD	
	CL 1	
181	LYTLSSSVTV PSSTWPSETV TCNVAHPASS TKVDKKLE (SEQ ID N°:23)	
20		

Certas modalidades compreendem um domínio VH, um domínio VL, ou uma combinação dos mesmos, do fragmento Fv de 3B3.11 e 31.1. Demais modalidades compreendem um, dois, três, quatro,cinco ou seis regiões determinantes de complementaridade (CDRs) dos domínios VH e VL. Os anticorpos cujas seqüências CDR estiverem incluídas dentro de SEQ ID N°: 20, 21, 22, ou 23 estão englobadas dentro do escopo desta invenção.

A divulgação fornece um método para a obtenção de anticorpos anti-FcRn que compreendem a criação de anticorpos com seqüências VH e/ou VL alteradas obtidas a partir de SEQ ID N°: 20, 21, 22, ou 23. Tais anticorpos podem ser derivados por uma pessoa versada na técnica, usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, substituições, remoções ou adições de aminoácidos, podem ser introduzidas em regiões de FR e/ou CDR. As alterações de FR são normalmente designadas para aprimorar a estabilidade e imunogenicidade do anticorpo, enquanto as alterações do CDR são tipicamente designadas para aumentar a afinidade do anticorpo para o seu antígeno. As alterações que aumentam a afinidade podem ser testadas alterando a seqüência de CDR e

medindo a afinidade do anticorpo conforme o seu alvo (*Antibody Engineering*, 2nd ed., Oxford University Press, ed. Borrebaeck (1995).

Anticorpos cujas seqüências CDR são insubstancialmente diferentes daquelas incluídas nas ou incluídas dentro das seqüências em SEQ ID N°: 20, 21, 5 22, ou 23 estão englobados pelo escopo desta invenção. Tipicamente, isto envolve a substituição de um aminoácido com aminoácido que possui uma carga similar, características hidrofóbicas, ou estereoquímicas. Substituições mais drásticas em regiões FR, em contraste com as regiões CDR, também podem ser feitas desde que elas não afetem adversamente (por exemplo, reduzir afinidade em mais do que 50% 10 conforme comparado com o anticorpo não substituído) as propriedades de ligação do anticorpo. As substituições podem ainda ser feitas para a linhagem germinativa do anticorpo ou estabilizar o local de ligação do antígeno.

#### *MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONALIS DE CAMUNDONGO*

Métodos para a produção de anticorpos monoclonais foram descritos (Harlow et al., *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988)). Em alguns casos, como uma primeira etapa, um roedor, por exemplo, um camundongo é imunizado com um polipeptídeo antigênico para gerar uma resposta do anticorpo. Como o FcRn é expresso de em vários lugares simultaneamente, e apresenta um alto grau de homologia entre as espécies, a 20 imunização por polipeptídeo não foi bem sucedida na produção de anticorpos monoclonais específicos de FcRn de alta afinidade ou FcRn anticorpos monoclonais de bloqueio. Para resolver este problema a vacinação de DNA pode ser realizada (Castagliola et al., *J. Immunology* 160:1458 (1998)). A vacinação de DNA envolve a imunização de um roedor, por exemplo, um camundongo com uma construção de 25 cDNA codificando FcRn ou um fragmento do mesmo. A imunização pode ser administrada intramuscularmente, intraperitonealmente, subcutaneamente, intravenosamente, intradermalmente, ou diretamente no nodo linfático. Em uma modalidade as imunizações são administradas intramuscularmente. A vacinação de DNA pode ser administrada com um adjuvante, por exemplo, adjuvante completo de 30 Freunds ou adjuvante incompleto de Freund. A vacinação de DNA pode ser acompanhada pela administração de uma cardiotoxina para aumentar a titulação do anticorpo. A administração de cardiotoxina causa a morte celular e a regeneração celular o que melhora a absorção da vacina de DNA administrada. A cardiotoxina também pode aumentar a inflamação que resulta em uma resposta imunitária mais 35 robusta.

Células secretoras de anticorpos (células B) são isoladas a partir de um

roedor. Tipicamente a célula B pode ser isolada do baço de roedores e fundida com uma linhagem de células de mieloma. As linhagens de células de mielomas são linhagens de células imortalizadas que não produzem anticorpos. A linhagem de célula de mieloma pode ser escolhida a partir de, mas não está limitada à, P3-  
5 X63Ag8, X63Ag8.653, Sp2/0-Ag14, FO, NSI/1-Ag4-1, NSO/1, FOX-NY, Y3-Ag1.2.3, YB2/0 e IR983F.

Esplenócitos são fundidos com a linhagem celular de mieloma para formar uma hibridoma. A fusão pode ser mediada através da mistura de dois tipos de células com polietilenoglicol por um período adequado de tempo (por exemplo, cinco  
10 minutos). Os hibridomas formados são cultivados em uma cultura celular usando um adequado meio de seleção (por exemplo, HAT) e testadas quanto à sua capacidade de produzir um anticorpo monoclonal contra FcRn. O teste pode ser realizado usando técnicas imunológicas conhecidas, por exemplo, ELISA.

Outra abordagem para produzir anticorpos monoclonais específicos para FcRn consiste em imunizar um camundongo transgênico nocaute de FcRn com um FcRn humano solúvel, veja, Aplicação PCT WO 02/43658. WO 02/43658 descreve um camundongo transgênico cujo genoma compreende uma interrupção homozigótica no seu gene FcRn endógeno, onde tal interrupção homozigótica previne a expressão de uma proteína FcRn funcional. O anticorpo monoclonal desta  
20 invenção não é feito em um camundongo transgênico cujo genoma compreende uma interrupção homozigótica no seu gene FcRn endógeno, onde tal interrupção homozigótica previne a expressão de uma proteína FcRn funcional. O anticorpo monoclonal desta invenção não compreende uma célula B de um camundongo transgênico cujo genoma compreende uma interrupção homozigótica no seu gene  
25 FcRn endógeno, onde tal interrupção homozigótica previne a expressão de uma proteína FcRn funcional.

#### *BIBLIOTECAS DE EXIBIÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-FCRN HUMANIZADOS*

Uma biblioteca de apresentação pode ser usada para identificar anticorpos que se ligam ao FcRn. Uma biblioteca de apresentação é uma coleção de entidades; cada entidade inclui um acessível componente de polipeptídeo e um componente recuperável que codifica ou identifica o componente de polipeptídeo. O componente de polipeptídeo é variado de forma que diferentes seqüências de aminoácidos são representadas. O componente de polipeptídeo pode ser de qualquer tamanho, por exemplo, de três aminoácidos até mais de 300 aminoácidos.  
30 Em uma seleção, o componente de polipeptídeo de cada membro da biblioteca é examinado com FcRn e se o componente de polipeptídeo se ligar ao FcRn, o  
35

membro da biblioteca de apresentação é identificado, tipicamente pela retenção em um suporte. Além disso, uma entidade de uma biblioteca de apresentação pode incluir mais do que um componente de polipeptídeo, por exemplo, as duas cadeias de polipeptídeo em um sFab.

- 5 Membros retidos de bibliotecas de exibição são recuperados do suporte e analisados. As análises podem incluir amplificação e subsequente seleção sob condições similares ou não similares. Por exemplo, seleções positivas e negativas podem ser alternadas. A análise também pode incluir a determinação da seqüência de aminoácido do componente de polipeptídeo e purificação do componente de  
10 polipeptídeo para uma caracterização detalhada.

Uma variedade de formatos pode ser usada para as bibliotecas de exibição. Os exemplos incluem os seguintes.

**Phage Display.** Um formato utiliza vírus, especialmente os bacteriófagos. Este formato é chamado “*phage display*”. O componente da proteína é tipicamente  
15 ligado de forma covalente em uma proteína do capsídeo do bacteriófago. A ligação resulta de uma translação de um ácido nucleico codificando o componente da proteína fundido com a capa protéica. A ligação pode incluir um ligado flexível de peptídeo, um local de protease, ou um aminoácido incorporado como resultado de uma supressão de um códon de parada. O *Phage display* está descrito, por  
20 exemplo, em U.S. 5,223,409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haard *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274:18218-30; Hoogenboom *et al.* (1998) *Immunotechnology* 4:1-20; Hoogenboom *et al.* (2000) *Immunol Today* 2:371-8; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.*  
25 (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; e Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137.

- 30 Os sistemas de *Phage display* foram desenvolvidos para fagos filamentosos (fago f1, fd, e M13) bem como outros bacteriófagos. Os sistemas de apresentação de fagos filamentosos tipicamente usam fusões para um capsídeo de proteína inferior, tais como proteína do gene III, e proteína do gene VIII, um capsídeo de proteína principal, mas as fusões com os capsídeos de proteína tais como proteína do gene VI, proteína do gene VII, proteína do gene IX, ou domínios destas também  
35 podem ser usados (veja, por exemplo, WO 00/71694). Em uma modalidade, a fusão

é para um domínio de proteína do gene III, por exemplo, o domínio de ancoragem ou “*stump*” (veja, por exemplo, Patente U.S. nº 5.658,727 para uma descrição do domínio de ancoragem da proteína do gene III). Também é possível associar fisicamente a proteína sendo apresentada ao capsídeo usando uma ligação não peptídica.

O bacteriófago apresentando o componente de proteína pode ser cultivado e colhido usando métodos preparatórios de fagos padrão, por exemplo, precipitação com PEG do meio de crescimento. Após a seleção dos fagos de apresentação individual, o ácido nucleico codificando os componentes de proteína selecionados podem ser isolados a partir de células infectadas com os fagos selecionados ou a partir dos próprios fagos, depois da amplificação. Colônias individuais ou placas podem ser selecionadas, o ácido nucleico isolado e seqüenciado.

**Outros formatos de apresentação.** Outros formatos de apresentação incluem a apresentação com base na célula (veja, por exemplo, WO 03/029456), fusões de proteína-ácido nucleico (veja, por exemplo, US 6,207,446), e apresentação de ribossomo (veja, por exemplo, Mattheakis *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9022 e Hanes *et al.* (2000) *Nat Biotechnol.* 18:1287-92; Hanes *et al.* (2000) *Methods Enzymol.* 328:404-30; e Schaffitzel *et al.* (1999) *J Immunol Methods*. 231(1-2):119-35).

**Scaffolds.** *Scaffolds* para apresentação podem incluir: anticorpos (por exemplo, fragmentos Fab, moléculas Fv de cadeia única (scFV), anticorpos de domínio único, anticorpos camelídeos, e anticorpos camelizados); receptores de célula T, proteínas MHC; domínios extracelulares (por exemplo, repetições de fibronectina Tipo III, repetições de EGF); inibidores de protease (por exemplo, domínios de Kunitz, ecotina, BPTI, e semelhantes); repetições de TPR; estruturas de trifoil; domínios de dedos de zinco; proteínas que se ligam ao DNA; particularmente proteínas monoméricas que se ligam ao DNA; proteínas que se ligam ao RNA; enzimas, por exemplo, proteases (particularmente proteases inativadas), RNase; chaperonas, por exemplo, tiorredoxina e proteínas de choque térmico; domínios de sinalização intracelular (tais como os domínios SH2 e SH3); peptídeos lineares e restritos; substratos de peptídeo linear. As bibliotecas de apresentação podem incluir diversidades sintéticas e/ou naturais. Veja, por exemplo, US 2004-0005709.

A tecnologia de apresentação pode também ser usada para obter anticorpos que ligam específicos epítopos de um alvo. Isto pode ser feito, por exemplo, usando moléculas não-alvos que competidoras com ausência de um específico epítopo ou sofrem mutação dentro de do epítopo, por exemplo, com alanina. Tais moléculas

5 não-alvos podem ser usadas em um procedimento de seleção negativo conforme descrito abaixo, como as moléculas competidoras quando ligam uma biblioteca de apresentação em um alvo, ou como um agente de pré-eluição, por exemplo, para capturar em solução de lavagem membros dissociados da biblioteca de apresentação que não são específicos para o alvo.

Seleção Iterativa. Em uma modalidade, a tecnologia da biblioteca de apresentação usada no modo iterativo. Uma primeira biblioteca de apresentação é usada para identificar um ou mais anticorpos que se ligam em um alvo. Estes anticorpos identificados são então variados usando um método de mutagênese para formar uma segunda biblioteca de apresentação. Os anticorpos de maior afinidade são então selecionados da segunda biblioteca, por exemplo, ou usando maior rigor ou ligações mais competitivas e condições de lavagem.

10 Em algumas implantações, a mutagênese é o alvo para regiões conhecidas ou que aparentam estar na interface de ligação. No caso de anticorpos, a mutagênese pode ser direcionada para as regiões de CDR das cadeias leves e pesadas conforme descrito aqui. Além disso, a mutagênese pode ser direcionada para regiões de estrutura próximas ou adjacentes aos CDRs. No caso de anticorpos, a mutagênese pode também ser limitada para uma ou alguns dos 15 CDRs, por exemplo, para fazer precisas melhorias passo a passo. Exemplos de técnicas de mutagênese incluem: PCR propensa a erros, recombinação, *DNA shuffling*, mutagênese de local direcionado e mutagênese de cassette.

20 Em um exemplo de seleção iterativa, os métodos aqui descritos são primeiramente usados para identificar um anticorpo a partir de uma biblioteca de apresentação que se liga em um FcRn com ao menos uma especificidade de ligação mínima para um alvo ou uma atividade mínima, por exemplo, uma constante de dissociação de equilíbrio para a ligação de menos do que 1 nM, 10 nM, ou 100 nM. A seqüência de ácido nucleico codificando os anticorpos inicialmente 25 identificados são usados como um modelo de ácido nucleico para a introdução de variações, por exemplo, para identificar um segundo anticorpo que possui propriedades reforçadas (por exemplo, afinidade de ligação, cinética, ou estabilidade) relativa ao anticorpo inicial.

30 Seleção de Taxa de Dissociação. Como uma taxa de dissociação lenta pode preditiva para alta afinidade, especialmente com respeito às interações entre os anticorpos e seus alvos, os métodos descritos aqui podem ser usados para isolar anticorpos com uma desejada taxa de dissociação cinética (por exemplo, reduzida) 35 para uma interação de ligação em um alvo.

Para selecionar os anticorpos de dissociação lenta a partir de uma biblioteca de apresentação, a biblioteca é contatada para um alvo imobilizado. O alvo imobilizado é então lavado com uma primeira solução que retira as biomoléculas que não estão especificamente ligadas ou com ligações fracas. Os anticorpos ligados 5 são eluídos com uma segunda solução que inclui uma quantidade saturante de alvos livres ou um anticorpo monoclonal competidor de alvo específico de alta afinidade, por exemplo, replicas do alvo que não estão anexadas à partícula. O alvo livre se liga às biomoléculas que se dissociam do alvo. A re-ligação é efetivamente evitada pela quantidade saturante de alvos livre relativa a concentração bem menor 10 de alvos imobilizados.

A segunda solução pode possuir condições de solução que são substancialmente fisiológicas ou que são rigorosas. Tipicamente, as condições de solução da segunda solução são idênticas às condições de solução da primeira solução. As frações da segunda solução são coletadas em ordem temporal para 15 distinguir as frações anteriores das posteriores. As últimas frações incluem biomoléculas que se dissociam em uma taxa menor do alvo do que as biomoléculas nas frações anteriores.

Além disso, também é possível recuperar membros de bibliotecas de apresentação que permanecem ligados ao alvo mesmo depois de uma incubação 20 estendida. Estes podem tanto serem dissociados usando condições caotrópicas ou podem ser amplificados enquanto anexados ao alvo. Por exemplo, fagos ligados ao alvo podem ser contatados para células bacterianas.

**Seleção ou Triagem para Especificidade.** Os métodos de triagem da biblioteca de apresentação aqui descritos incluem um processo de seleção ou 25 triagem que descarta membros de bibliotecas de apresentação que se ligam em moléculas não-alvos. Exemplos de moléculas não-alvos incluem estreptavidina em microesferas magnéticas, agentes de bloqueio tais como albumina de soro bovino, leite bovino sem gordura, qualquer anticorpo monoclonal de captura ou imobilização de alvo, ou células não transfectadas que não expressam o alvo FcRn humano.

Em uma implantação, a então chamada etapa de “seleção negativa” é usada 30 para discriminar entre o alvo e moléculas não-alvos relacionadas e uma molécula não alvo relacionada, porém diferente. A biblioteca de apresentação ou um reservatório da mesma é contatado para a molécula não-alvo. Membros da amostra que não se ligam ao não-alvo são coletados e usados em subsequentes seleções 35 para a ligação em moléculas alvo ou ainda para subsequentes seleções negativas. A etapa de seleção negativa pode ser anterior ou posterior à seleção de membros das

bibliotecas que se ligam à molécula alvo.

Em outra implantação, uma etapa de triagem é usada. Depois que os membros de bibliotecas de apresentação são isolados para ligação na molécula alvo, cada membro isolado da biblioteca é testado quanto a sua habilidade de se ligar em uma molécula não-alvo (por exemplo, um não-alvo listado acima). Por exemplo, um teste ELISA de alto rendimento pode ser usado para obter esses dados. O teste ELISA também pode ser usado para obter dados quantitativos para ligação de cada membro da biblioteca com o alvo, como também para reatividade de espécies cruzadas para os alvos relacionados ou subunidades dos alvos (por exemplo, FcRn de rato; microglobulina  $\beta 2$ ) e também sob diferentes condições tais como pH 6 ou pH 7.5. Os dados de ligação de alvos a não-alvos são comparados (por exemplo, usando um computador e um software) para identificar membros da biblioteca que se ligam especificamente ao alvo.

#### *BIBLIOTECAS DE OUTRAS EXPRESSÕES*

Outros tipos de coleções de proteínas (por exemplo, bibliotecas de expressão) podem ser usadas para identificar proteínas com uma propriedade específica (por exemplo, capacidade de se ligar em FcRn e/ou capacidade de modular FcRn), incluindo, por exemplo, matrizes de proteínas de anticorpos (veja, por exemplo, De Wildt et al. (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:989-994), bibliotecas lambda gt11, bibliotecas de duplo-híbrido e semelhantes.

#### *BIBLIOTECAS DE ANTICORPOS*

Em uma modalidade, a biblioteca apresenta um diversificado reservatório de polipeptídeos, onde cada um deles inclui um domínio de imunoglobulina, por exemplo, um domínio variável de imunoglobulina. As bibliotecas de apresentação são particularmente úteis, por exemplo, para identificação de anticorpos humanos ou "humanizados" que reconhecem抗ígenos humanos. Tais anticorpos podem ser usados em terapias para tratar distúrbios humanos, tais como distúrbios de auto-imunidade. Como as regiões constantes e de estrutura do anticorpo são humanas, estes anticorpos terapêuticos podem evitar que eles mesmos sejam reconhecidos e se tornem alvos como os抗ígenos. As regiões constantes também podem ser otimizadas para recrutar funções efetoras do sistema imunológico humano. O processo de seleção de apresentação *in vitro* supera a incapacidade de um sistema imunológico humano de gerar anticorpos contra os auto-antígenos.

Um típico anticorpo da biblioteca de apresentação apresenta um polipeptídeo que inclui um domínio VH domínio e um domínio VL. Um "domínio de imunoglobulina" se refere a um domínio de um domínio variável ou constante de

moléculas de imunoglobulina. Os domínios de imunoglobulina tipicamente contêm duas folhas-β formadas com cerca de sete cepas β e uma ligação dissulfureto conservada (veja, por exemplo, A. F. Williams e A. N. Barclay, 1988, *Ann. Rev. Immunol.* 6:381-405). A biblioteca de apresentação pode apresentar o anticorpo 5 como uma fragmento Fab (por exemplo, usando duas cadeias de polipeptídeo) ou um Fv de cadeia única (por exemplo, usando uma única cadeia de polipeptídeo). Outros formatos também podem ser usados.

Assim como no caso de Fab e de outros formatos, o anticorpo apresentado pode incluir uma ou mais regiões constantes como parte de uma cadeia leve e/ou 10 pesada. Em uma modalidade, cada cadeia inclui uma região constante, por exemplo, como no caso de um Fab. Em outras modalidades, adicionais regiões constantes são apresentadas.

Bibliotecas de anticorpos podem ser construídas através de numerosos processos (veja, por exemplo, de Haard et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274:18218-30; 15 Hoogenboom et al., 1998, *Immunotechnology* 4:1-20; e Hoogenboom et al., 2000, *Immunol. Today* 21:371-378. ) Além disso, elementos de cada processo podem ser combinados com aqueles de outros processos. Os processos podem ser usados de forma que a variação é introduzida em um domínio único de imunoglobulina (por exemplo, VH ou VL) ou em domínios múltiplos de imunoglobulina (por exemplo, VH 20 e VL). A variação pode ser introduzida em um domínio variável de imunoglobulina, por exemplo, na região de um ou mais de CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3, e FR4, referindo-se a tais regiões para tanto e ambos os domínios variáveis de cadeias leves e pesadas. Em uma modalidade, a variação é introduzida em todos os três CDRs de um específico domínio variável. Em outra modalidade, a variação é 25 introduzida em CDR1 e CDR2, por exemplo, de um domínio variável de cadeia pesada. Qualquer combinação é possível. Em um processo, as bibliotecas de anticorpos são construídas com a inserção de diversos oligonucleotídeos que codificam CDRs nas regiões correspondentes do ácido nucleico. Os oligonucleotídeos podem ser sintetizados usando nucleotídeos monoméricos ou 30 trinucleotídeos. Por exemplo, Knappik et al., 2000, *J. Mol. Biol.* 296:57-86 descreve um método para construção de CDR que codifica oligonucleotídeos usando síntese de trinucleotídeos e um modelo com locais de restrição projetados para aceitar os oligonucleotídeos.

Em outro processo, um animal, por exemplo, um roedor, é imunizado com o 35 FcRn. O animal é opcionalmente reforçado com um antígeno para estimular ainda mais a resposta. As células do baço são isoladas do animal e o ácido nucleico que

codifica domínios de VH e/ou VL é amplificado e clonado para a expressão na biblioteca de apresentação.

Ainda em outro processo, as bibliotecas de anticorpos são construídas a partir de ácido nucleico amplificado a partir de genes de imunoglobulina de linhagem germinativa *naive*. O ácido nucleico amplificado inclui ácido nucleico que codifica o domínio VH e/ou VL. Fontes de ácido nucleicos que codificam imunoglobulina estão descritos abaixo. A amplificação pode incluir PCR, por exemplo, com iniciadores que se liga à região constante conservada, ou em outro método de amplificação.

O ácido nucleico que codifica os domínios de imunoglobulina pode ser obtido a partir das células imunológicas de, por exemplo, um humano, um primata, um camundongo, um coelho, um camelo, uma lhama ou um roedor. Em um exemplo, as células são selecionadas para específica propriedade. As células B em vários estágios de maturidade podem ser selecionadas. Em outro exemplo, as células B são *naive*.

Em uma modalidade, a separação de células ativada por fluorescência (FACS) é usada par separar células B que expressam moléculas IgM, IgD, ou IgG ligadas à superfície. Além disso, as células B que expressam diferentes isotipos de IgG podem ser isoladas. Em outra modalidade, as células B ou T são cultivadas *in vitro*. As células podem ser estimuladas *in vitro*, por exemplo, através do cultivo com células de alimentação ou através da adição de mitógenos ou outros reagentes moduladores, tais como anticorpos para CD40, CD40 ligante ou CD20, acetato de forbol miristato, lipopolissacárido bacteriano, concanavalina A, fitoemaglutinina, ou mitógeno pokeweed.

Ainda em uma modalidade, as células são isoladas de um objeto que possui um distúrbio auto-imunológico, por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatóide, vasculite, síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica, ou síndrome antifosfolipídeo. O objeto pode ser um humano, ou um animal, por exemplo, um animal modelo para a doença humana, ou um animal que possui um distúrbio análogo. Ainda em uma modalidade, as células são isoladas a partir de um animal não humano transgênico que inclui um locus de imunoglobulina humana.

Em uma modalidade, as células ativaram um programa de hipermutação somática. As células podem ser estimuladas para realizar a mutagênese somática de genes de imunoglobulina, por exemplo, através do tratamento com anticorpos anti-imunoglobulina, anti-CD40, e anti-CD38 (veja, por exemplo, Bergthorsdottir et al., 2001, *J. Immunol.* 166:2228). Em uma modalidade, as células são *naive*.

O ácido nucleico que codifica um domínio variável de imunoglobulina pode ser

isolado a partir de um repertório natural através dos seguintes exemplos de métodos. Primeiro, o RNA é isolado a partir da célula imune. mRNAs completos (*por exemplo*, encapsulados) mRNAs são separados (por exemplo, pela degradação de RNAs não encapsulados com fosfatase animal de bezerro). A cápsula é então 5 removida com pirofosfatase ácida de tabaco e a transcrição reversa é usada para produzir o cDNAs.

A transcrição reversa da primeira (antisense) cepa pode ser feita de qualquer maneira com qualquer iniciador adequado. Veja, por exemplo, de Haard et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274:18218-30. A região de ligação do iniciador pode ser constante 10 dentre diferentes imunoglobulinas, por exemplo, para fazer a transcrição reversa de diferentes isótipos de imunoglobulina. A região de ligação dos iniciadores pode também ser específica para um específico isótipo de imunoglobulina. Tipicamente, o iniciador é específico para uma região que é 3' para uma seqüência que codifica ao menos um CDR. Em uma modalidade, os iniciadores poli-dT podem ser usados (e 15 podem ser preferenciais para os genes de cadeia pesada).

Uma seqüência sintética pode ser ligada ao final 3' da cepa submetida à transcrição reversa. A seqüência sintética pode ser usada como um iniciador que se liga ao local para ligação do iniciador adiante durante a amplificação de PCR após a transcrição reversa. O uso da seqüência sintética pode deixar obvia a necessidade 20 de usar um reservatório de diferentes iniciadores adiante para capturar completamente a diversidade disponível.

O gene codificador de domínio variável é então amplificado, por exemplo, usando uma ou mais rodadas. Se múltiplas rodadas forem utilizadas, iniciadores 25 mais internos (*nested primers*) podem ser usados para uma fidelidade aumentada. O ácido nucleico amplificado é então clonado dentro de um vetor da biblioteca de apresentação.

#### *MÉTODOS DE TRIAGEM SECUNDÁRIOS*

Depois de selecionar membros da biblioteca candidatos que se ligam ao alvo, cada membro da biblioteca candidato pode ainda ser analisado, por exemplo, para 30 ainda caracterizar as suas propriedades de ligação para o alvo. Cada membro da biblioteca candidato pode ser sujeitado a um ou mais ensaios de triagem secundários. O ensaio pode ser para uma propriedade de ligação, uma propriedade catalisadora, uma propriedade inibidora, uma propriedade fisiológica (por exemplo, citotoxicidade, depuração renal, imunogenicidade), uma propriedade estrutural (por 35 exemplo, estado de estabilidade, conformação, oligomerização) ou outra propriedade funcional. O mesmo ensaio pode ser usado repetidamente, mas com

condições que variam, por exemplo, para determinar as sensibilidades de pH, iônicas ou térmicas.

Conforme apropriado, os ensaios podem usar um membro da biblioteca de apresentação diretamente, um polipeptídeo recombinante produzido a partir do ácido nucleico que codifica um polipeptídeo selecionado, ou um peptídeo sintético sintetizado com base na seqüência do polipeptídeo selecionado. Exemplos de ensaios para as propriedades de ligação incluem os seguintes:

**ELISA.** Anticorpos selecionados a partir de uma biblioteca de expressão podem também serem testados quanto as suas propriedades de ligação usando um teste ELISA. Por exemplo, cada anticorpo é contatado para uma placa de titulação cujo fundo foi revestido com o alvo, por exemplo, uma quantidade limitada do alvo. A placa é lavada com tampão para remover polipeptídeos não especificamente ligados. Então a quantidade de anticorpos ligados à placa é determinada testando a placa com um anticorpo que pode reconhecer o anticorpo do teste, por exemplo, uma etiqueta ou uma porção constante do anticorpo. O anticorpo de detecção é ligado à uma enzima, como a fosfatase alcalina ou peroxidase de rábano de cavalo (HRP) que produz um produto colorimétrico quando substratos adequados são fornecidos.

No caso de um anticorpo de uma biblioteca de apresentação, o anticorpo pode ser purificado a partir de células ou ensaiado em um formato de biblioteca de apresentação, por exemplo, como as fusões com revestimentos bacteriófagos filamentosos. Em outra versão do ELISA, cada anticorpo selecionado a partir de uma biblioteca de expressão é usado para revestir um diferente poço da placa de titulação. O teste ELISA é então realizado usando uma molécula de alvo constante para investigar cada poço.

**Ensaios Homogêneos de Ligações.** A interação de ligação do anticorpo candidato com um alvo pode ser analisada usando um ensaio homogêneo, por exemplo, depois que todos os componentes de um ensaio são adicionados, as adicionais manipulações de fluidos não são mais necessárias. Por exemplo, a transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) pode ser usada como um ensaio homogêneo (veja, por exemplo, Lakowicz et al., Patente US nº 5.631,169; Stavrianopoulos, et al., Patente US nº 4.868,103). Uma marcação fluorófora na primeira molécula (por exemplo, a molécula identificada na fração) é selecionada de forma que a sua energia fluorescente que foi emitida possa ser absorvida por uma marcação fluorescente em uma segunda molécula (por exemplo, o alvo) se a segunda molécula estiver próxima da primeira molécula. A marcação

fluorescente na segunda molécula se torna fluorescente quando ele absorve a energia transferida. Como a eficiência da energia transferida entre as marcações está relacionada com a distância que separa as moléculas, a relação espacial entre as moléculas pode ser avaliada. Em uma situação na qual a ligação ocorre entre as 5 moléculas, a emissão fluorescente da marcação da molécula 'receptora' no ensaio deve ser máxima. Um evento de ligação que é configurado para monitoramento por FRET pode ser convenientemente medido através de meios de detecção fluorimétrica padrão conhecidas na técnica (por exemplo, usando um fluorímetro). Através da titulação da quantidade da primeira ou da segunda molécula de ligação, 10 uma curva de ligação pode ser gerada para estimar a constante de equilíbrio de ligação.

Outro exemplo de ensaio homogêneo é o ALPHASCREEN™ (Packard Bioscience, Meriden CT). O ALPHASCREEN™ usa duas microesferas marcadas. Uma microesfera gera oxigênio singuleto quando é estimulada por um laser. A outra 15 microesfera gera um sinal luminoso quando o oxigênio singuleto se difunde a partir da primeira microesfera e colide com ela. O sinal é apenas gerado quando as duas microesferas estão próximas. Uma microesfera pode ser anexada no membro da biblioteca de apresentação, e a outra no alvo. Os sinais são medidos para determinar a extensão da ligação.

20 Os ensaios homogêneos podem ser realizados enquanto o polipeptídeo candidato é anexado no veículo da biblioteca de apresentação, por exemplo, um bacteriófago.

**Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).** A interação de ligação de uma molécula isolada a partir de uma biblioteca de expressão e um alvo pode ser 25 analisada usando a SPR. A SPR ou a Análise de Interações Biomoleculares (BIA) detecta interações bioespecíficas em tempo real, sem a marcação de qualquer um dos interactantes. As alterações na massa na superfície de ligação (indicativa de um evento de ligação) do chip BIA resultam em alterações do índice refrativo da luz perto da superfície (o fenômeno ótico da ressonância plasmônica de superfície 30 (SPR)). As alterações na refratividade geram um sinal detectável, que são medidos como uma indicação das reações em tempo real entre as moléculas biológicas. Os métodos para uso de SPR estão descritos, por exemplo, na Patente US nº 5,641,640; Raether, 1988, Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander e Urbaniczky, 1991, *Anal. Chem.* 63:2338-2345; Szabo et al., 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705 e em recursos on-line fornecidos por BIACore International AB 35 (Uppsala, Sweden).

As informações de SPR podem ser usadas para fornecer uma medição precisa e quantitativa da constante de equilíbrio de dissociação ( $K_d$ ), e parâmetros cinéticos, incluindo  $K_{on}$  e  $K_{off}$ , para a ligação de uma biomolécula em um alvo. Tais dados podem ser usados para comparar diferentes biomoléculas. Por exemplo, 5 proteínas selecionadas a parir de uma biblioteca de expressão podem ser comparadas para identificar proteínas que possuem uma alta afinidade para o alvo, ou que possuam uma lenta  $K_{off}$ . Essas informações também podem ser usadas para desenvolver relações estrutura-atividade (SAR). Por exemplo, ao parâmetros 10 cinéticos e ligação de equilíbrio de versões maduras de uma proteína mãe podem ser comparados com os parâmetros da proteína mãe. Aminoácidos variantes em certas posições podem ser identificados como aqueles que se correlacionam com específicos parâmetros de ligação, por exemplo, alta afinidade e  $K_{off}$  lento. Estas 15 informações podem ser combinadas com a modelagem estrutural (por exemplo, usando modelagem de homologia, minimização de energia, ou determinação de estrutura através de cristalografia de raios-X ou RMN). Como resultado disso, uma compreensão sobre a interação física entre a proteína e o seu alvo pode ser formulada e utilizada para guiar outros processos de modelagem.

**Ensaios Celulares.** Uma biblioteca de anticorpos candidatos (por exemplo, previamente identificados por uma biblioteca de apresentação ou de outro tipo) pode 20 ser testada para a ligação em alvos em células que se expressam de forma transiente ou estável e apresentam o alvo de interesse na superfície da célula. Por exemplo, o alvo pode incluir vetores de seqüência de ácido nucleicos que incluem segmentos que codificam apenas a porção extracelular dos polipeptídeos de forma que os polipeptídeos do alvo quimérico são produzidos dentro da célula, secretados 25 a partir da célula, ou anexados na superfície da célula através de uma ancora, por exemplo, uma fusão com uma membrana que ancora proteínas tais como Fc. O alvo expressado na superfície da célula pode ser usado para testar anticorpos que se ligam ao FcRn e bloqueiam a ligação de IgG-Fc. Por exemplo, o IgG-Fc humano não específico poderia ser marca através de fluorescência e a sua ligação com FcRn 30 na ausência de um anticorpo antagonista pode ser detectada por uma mudança na intensidade da fluorescência usando citometria de fluxo, por exemplo, uma maquina de FACS.

#### OUTROS MÉTODOS PARA A OBTENÇÃO DE ANTICORPOS QUE SE LIGAM AO FcRN

Adicionalmente ao uso de bibliotecas de apresentação, outros métodos 35 podem ser usados para obter um anticorpo que se ligue ao FcRn. Por exemplo, uma proteína do FcRn ou uma região da mesma pode ser usada como um antígeno em

um animal não humano, por exemplo, um roedor.

Em uma modalidade, o animal não humano inclui ao menos uma parte de um gene da imunoglobulina humana. Por exemplo, é possível projetar cepas de camundongo deficientes na produção de anticorpos de camundongo com fragmentos grandes do locus Ig humano. Usando a tecnologia de hibridoma, os anticorpos monoclonais de um específico antígeno (Mabs) derivado a partir dos genes com a especificidade desejada pode ser produzido e selecionado. Veja por exemplo, XENOMOUSE™, Green et al., 1994, *Nat. Gen.* 7:13-21; U.S. 2003-0070185, WO 96/34096, publicada em 31 de outubro de 1996, e Aplicação PCT nº. 10 PCT/US96/05928, depositada em 29 de abril de 1996.

Em uma modalidade, um anticorpo monoclonal é obtido a partir de um animal não humano, e então modificado, por exemplo, humanizado e desimunizado. Winter descreve um método enxertado com CDR que pode ser usado para preparar os anticorpos humanizados (Aplicação de Patente UK GB 2188638A, depositada em 15 de março de 1987; Patente US nº. 5.225,539. Todos os CDRs de um anticorpo humano específico podem ser substituídos por ao menos uma porção de um CDR não humano ou apenas alguns dos CDRs podem ser substituídos com CDRs não humanos. É necessário apenas substituir o numero de CDRs necessários para a ligação do anticorpo humanizado para um antígeno pré-determinado.

Os anticorpos humanizados podem ser gerados através da substituição de seqüências da região variável de Fv que não está diretamente envolvido na ligação do antígeno com equivalentes seqüências de regiões variáveis de Fv humano. Os métodos gerais para a geração de anticorpos humanizados é fornecida por Morrison, S. L., 1985, *Science* 229:1202-1207, by Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214, e por Queen et al. US Patent N° 5.585,089, US 5.693,761 e US 5.693,762. Estes métodos incluem o isolamento, a manipulação e a expressão da seqüência de ácidos nucleicos que codificam todas ou partes das regiões variáveis de Fv de imunoglobulina a partir de pelo menos uma cadeia pesada ou leve. As fontes de tal ácido nucleico são bem conhecidas para aqueles versados na técnica e, por exemplo, pode ser obtidas a partir de um hibridoma que produz um anticorpo contra um alvo pré-determinado, como descrito acima. O DNA recombinante DNA que codifica o anticorpo humanizado, ou um fragmento do mesmo, pode então ser clonados em um vetor de expressão adequado.

Um anticorpo que se liga ao FcRn pode também ser modificado através da especifica anulação dos epítopos da célula T humana ou "desimunizados" através dos métodos dispostos em WO 98/52976 e WO 00/34317, cujos conteúdos são

especificamente incorporados aqui por referencia. Resumidamente, as regiões variáveis de cadeias leves e pesadas de um anticorpo podem ser analisadas para peptídeos que se ligam ao MHC Classe II; esses peptídeos representam potenciais epítopos da célula T (conforme definido em WO 98/52976 e WO 00/34317). Para a detecção de potenciais epítopos da célula T, uma abordagem de modelagem por computador chamada “entrelace de peptídeos” pode ser aplicada, e adicionalmente, um banco de dados de peptídeos de ligação MHC classe II humano podem ser buscados em motivos presentes nas seqüências VH e VL, conforme descrito em WO 98/52976 e WO 00/34317. Estes motivos se ligam em qualquer um dos 18 principais alótipos de MHC classe II DR, e ainda constituem potenciais epítopos de célula T. Os potenciais epítopos de célula T detectados podem ser eliminados através da substituição de pequenos números de resíduos de aminoácidos nas regiões variáveis ou através da substituição de um único aminoácido. Na medida do possível as substituições conservadoras são feitas muitas vezes, mas não exclusivamente, em um aminoácido comum nessas posições em seqüências de anticorpos de linhagens germinativas humanas podem ser usadas. As seqüências de linhas germinativas humanas estão divulgadas em Tomlinson, I.A. et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G. P. et al., 1995, *Immunol. Today* Vol. 16 (5): 237-242; Chothia, D. et al., 1992, *J. Mol. Bio.* 227:799-817. O diretório da BASE V fornece um abrangente diretório de seqüências de regiões variáveis de imunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Depois que as alterações de desimunização são identificadas, os ácidos nucleicos que codificam  $V_H$  e  $V_L$  podem ser construídos através de mutagênese ou outros métodos sintéticos (por exemplo, de novo síntese, substituição de cassete, e semelhantes). Seqüências variáveis mutagenizadas podem, opcionalmente, serem fundidas com uma região constante humana, por exemplo, IgG1 humanos ou regiões constantes □.

Em alguns casos, um potencial epítopo de célula T incluirá resíduos que são conhecidos ou previstos como sendo importantes para a função do anticorpo. Por exemplo, potenciais epítopos de célula T são geralmente voltadas para os CDRs. Além disso, potenciais epítopos de célula T podem ocorrer nos resíduos de estruturas importantes para a estrutura e ligação do anticorpo. Alterações para eliminar estes potenciais epítopos de célula T necessitarão em alguns casos de maior minuciosidade, por exemplo, fazendo e testando cadeias com e sem mudança. Onde for possível, as potenciais epítopos de célula T que sobrepõem os CDRs foram eliminadas por substituições fora dos CDRs. Em alguns casos, uma

alteração dentro de um CDR é a única opção, e as demais variantes com e sem a substituição devem ser testadas. Em outros casos, a substituição necessária para remover um potencial epítopo de célula T está em uma posição de resíduo dentro da estrutura que pode ser crítica para a ligação de anticorpo. Nesses casos, as variante  
 5 com e sem esta substituição devem ser testadas. Além disso, em alguns casos várias regiões variantes de cadeias pesadas e leves desimunizadas foram projetadas e varias combinações de cadeias pesadas/ leves foram testadas a fim de identificar o anticorpo desimunizado ideal. A escolha final do anticorpo desimunizado pode então ser feita mediante consideração da afinidade de ligação  
 10 de diferentes variantes em conjunção com a extensão da desimunização, por exemplo, o numero de potenciais epítopos de célula T que permacam na região variável. Os desimunizados também podem ser usados para modificar qualquer anticorpo, por exemplo, um anticorpo que inclui uma seqüência não humana, por exemplo, um anticorpo sintético, um anticorpo murino, outro anticorpo monoclonal  
 15 não humano, ou um anticorpo isolado a partir de uma biblioteca de apresentação.

#### *ANTICORPOS DE LINHAGENS GERMINATIVAS.*

Um anticorpo usado no tratamento de um distúrbio de auto-imunidade mediado por IgG pode ser usado para múltiplas administrações. Precauções que poderiam diminuir a imunogenicidade do anticorpo terapêutico incluem a reversão de  
 20 um ou mais aminoácido que não são de linhagem germinativa em regiões de estrutura para os correspondentes aminoácidos de linhagem germinativa (por exemplo, enquanto propriedades de ligação são substancialmente retidas) do anticorpo (especialmente de Fabs).

É possível modificar um anticorpo que se liga ao FcRn, por exemplo, um  
 25 anticorpo descrito aqui, para fazer regiões variáveis do anticorpo mais similares à uma ou mais seqüências da linhagem germinativa. Por exemplo, um anticorpo pode incluir um, dois, três ou mais substituições de aminoácidos, por exemplo, em uma estrutura, CDR, ou região constante, para torná-la mais similar à seqüência de linhagem germinativa de referência. Um exemplo de método de linhagem  
 30 germinativa pode incluir a identificação de uma ou mais seqüências germinativas que são similares (por exemplo, mais semelhantes em uma base de dados específica) para a seqüência de do anticorpo isolado. As mutações (no nível do aminoácido) podem então serem feitas no anticorpo isolado, tanto de forma incremental ou em combinação com outras mutações. Por exemplo, uma biblioteca  
 35 de ácido nucleico que inclui seqüências que codificam algumas ou todas as linhagens que codificam algumas ou todas as possíveis mutações de linhagens

germinativas é feita. Os anticorpos mutados são então avaliados, por exemplo, para identificar um anticorpo que possui um ou mais resíduos de linhagens germinativas adicionais relativas ao anticorpo isolado e que ainda é útil (por exemplo, possui uma atividade funcional). Em uma modalidade, o maior número possível de resíduos de linhagens germinativas é introduzido em um anticorpo isolado.

Em uma modalidade, a mutagênese para substituir ou inserir um ou mais resíduos de linhagens germinativas em uma estrutura e/ou região constante. Por exemplo, uma estrutura de uma linhagem germinativa e/ou resíduo de região constante pode ser a partir de uma seqüência que é similar (por exemplo, mais similar) à região não-variável que está sendo modificada. Depois da mutagênese, a atividade (por exemplo, a ligação ou outra atividade funcional) pode ser então avaliada para determinar se o resíduo da linhagem germinativa ou resíduos são tolerados (por exemplo, não revogam atividade). Uma mutagênese similar pode ser realizada nas regiões de estrutura.

A seleção de uma linhagem germinativa pode ser realizada de diferentes formas. Por exemplo, uma seqüencia de linhagem germinativa pode ser selecionada se ela encontra um critério pré-determinado para seletividade ou similaridade, por exemplo, ao menos certa percentagem idêntica, por exemplo, ao menos 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou 99.5% idêntica. A seleção pode ser realizada usando pelo menos 2, 3, 5, ou 10 seqüências de linhagem germinativa. No caso de CDR1 e CDR2, a identificação de uma seqüencia de linhagem germinativa similar pode incluir a seleção de tal seqüência. No caso de CDR3, a identificação de uma similar seqüencia de linhagem germinativa pode incluir a seleção de tal seqüência, e pode inclusive usar duas seqüências de linhagem germinativa que contribuem separadamente para a porção de amino-terminal e a porção carboxi-terminal. Em outras implantações, mais do que uma ou duas seqüências de linhagem germinativa são usadas, por exemplo, para formar uma seqüência de consenso.

Em uma modalidade, com respeito a uma seqüência de domínio variável de referencia específica , por exemplo, a seqüência descrita aqui, uma seqüencia de domínio variável relacionada possui ao menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 ou 100% das posições de aminoácidos em CDR que não são idênticas aos resíduos nas seqüências de CDR de referencia, os resíduos que não são idênticos aos resíduos que em posições correspondente em uma seqüencia de linhagem germinativa humana (por exemplo, uma seqüência de aminoácidos codificados por um ácido nucleico de uma linhagem germinativa humana).

Em uma modalidade, com respeito a uma referencia em particular à uma seqüencia de domínio variável, por exemplo, a seqüência aqui descrita, uma relacionada seqüencia de domínio variável possui ao menos 30, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100% das regiões FR são idênticas à seqüência de FR a partir de um seqüencia de linhagem germinativa humana, por exemplo, uma seqüencia de linhagem germinativa relacionada à referencia da seqüencia de domínio variável.

De acordo com isso, é possível isolar um anticorpo que possui atividade similar para um certo anticorpo de interesse, mas é mais similar à uma ou mais seqüências de linhagem germinativa, especialmente uma ou mais seqüências de linhagem germinativa humana. Por exemplo, um anticorpo pode ser ao menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou 99.5% idêntico à uma seqüencia de linhagem germinativa em uma região fora dos CDRs (por exemplo, regiões de estrutura). Além disso, um anticorpo pode incluir ao menos 1, 2, 3, 4, ou 5 resíduos de linhagens germinativas em uma região de CDR, com a linhagem germinativa a partir de uma seqüência de linhagem germinativa similar (por exemplo, mais similar) à região variável que está sendo modificada. As seqüências de linhagem germinativa de interesse principal são seqüências de linhagem germinativa humana. A atividade do anticorpo (por exemplo, a atividade de ligação) pode ser dentro de um fator ou 100, 10, 5, 2, 0.5, 0.1, e 0.001 do anticorpo original.

Exemplos de seqüências de referencia de linhagem germinativas para  $V_{kappa}$  incluem: O12/O2, O18/O8, A20, A30, L14, L1, L15, L4/18a, L5/L19, L8, L23, L9 ,L24, L11, L12, O11/O1, A17, A1, A18, A2, A19/A3, A23, A27, A11, L2/L16, L6, L20, L25, B3, B2, A26/A10, e A14. Veja, por exemplo, Tomlinson *et al.*, 1995, *EMBO J.* 14(18):4628-3.

Uma seqüencia de referencia de linhagem germinativa para o domínio variável de HC pode ser baseada em uma seqüencia que possui específicas estruturas canonicas, por exemplo, 1-3 estruturas nos *loops* hipervariáveis H1 e H2. As estruturas canônicas de loops hipervariáveis de um domínio variável de imunoglobulina podem ser inferidas a partir da sua, conforme descrito em Chothia *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 227:799-817; Tomlinson *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 227:776-798); e Tomlinson *et al.*, 1995, *EMBO J.* 14(18):4628-38. exemplos de seqüências com uma estrutura incluem: DP-1, DP-8, DP-12, DP-2, DP-25, DP-15, DP-7, DP-4, DP-31, DP-32, DP-33, DP-35, DP-40, 7-2, hv3005, hv3005f3, DP-46, DP-47, DP-58, DP-49, DP-50, DP-51, DP-53, e DP-54.

### 35 PRODUÇÃO DE LIGANTE

Os métodos padrão de ácido nucleico recombinante podem ser usados para

expressar um anticorpo que se liga ao FcRn. Geralmente, a seqüência de ácido nucleico que codifica o anticorpo é clonada em um vetor de expressão de ácido nucleico. É claro que, se o anticorpo incluir múltiplas cadeias de polipeptídeo, cada cadeia pode ser clonada em um vetor de expressão, por exemplo, os mesmo ou diferentes vetores, que são expressos nas mesmas células ou em células diferentes.

**Produção de Anticorpos.** Alguns anticorpos, por exemplo, Fabs, podem ser produzidos em células bacterianas, por exemplo, células *E. coli*. Por exemplo, se o Fab for codificado por seqüências em um vetor *phage display* que inclui um códon de parada que pode ser suprimido entre a entidade de apresentação e a proteína bacteriófaga (ou um fragmento da mesma), o vetor de ácido nucleico pode ser transferido para uma célula bacteriana que não suprime o códon de parada. Neste caso, o FAB não é fundido com a proteína do gene III e é secretado no periplasma e/ou no meio.

Os anticorpos também podem ser produzidos em células eucarióticas. Em uma modalidade, os anticorpos (por exemplo, scFv's) são expressos em células de leveduras tais como *Pichia* (veja, por exemplo, Powers et al., 2001, *J. Immunol. Methods*. 251:123-35), *Hansenula*, ou *Saccharomyces*.

Em uma modalidade, os anticorpos são produzidos em células de mamíferos. As células de mamíferos hospedeiras para expressarem os anticorpos clones ou os fragmentos que se ligam em antígeno dos mesmos incluem as do Ovário de um Hamster Chinês (células CHO) (incluindo as células dhfr- CHO, descritas em Urlaub e Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas com um marcador selecionável de DHFR, por exemplo, conforme descritas em Kaufman e Sharp, 1982, *Mol. Biol.* 159:601 621), linhagens de células linfocitárias, por exemplo, células de mieloma NS0 e células SP2, células COS, e uma célula de um animal transgênico, por exemplo, um mamífero transgênico. Por exemplo, a célula é uma célula epitelial de mamífero.

Adicionalmente à seqüência de ácido nucleico que codifica o domínio diversificado de imunoglobulina, os vetores de expressão recombinantes podem transportar seqüências adicionais, tais como as seqüências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens da replicação) e genes de marcação selecionável. O gene de marcação selecionável facilita a seleção de células hospedeiras nas quais o vetor foi introduzido (veja, por exemplo, Patente U.S. N°. 4.399,216; 4.634,665 e 5.179,017). Por exemplo, tipicamente o gene de marcação selecionável confere a resistência à drogas, tais como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira na qual o vetor foi

introduzido. Genes de marcação selecionável incluem o gene de diidrofolato redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiras *dhfr* com seleção/amplificação de metotrexato) e o gene *neo* (para a seleção de G418).

Em um exemplar sistema para a expressão recombinante de um anticorpo, ou uma porção do mesmo que se liga ao antígeno, um vetor de expressão recombinante que codifica tanto a cadeia pesada do anticorpo quanto a cadeia leve do anticorpo é introduzido em células *dhfr* CHO através da transfecção mediada por fosfato de cálcio. Dentro do vetor de expressão recombinante, os genes das cadeias pesada e leve do anticorpo são individualmente ligados de forma operante para melhorar/promover elementos regulatórios (por exemplo, derivados a partir de SV40, CMV, adenovírus e similares, tais como um potenciador de CMV /promotor de elemento regulatório AdMLP ou um potenciador SV40 / promotor de elemento regulatório AdMLP) para direcionar altos níveis de transcrição dos genes. O vetor de expressão recombinante também transporta um gene DHFR gene, que permite a seleção de células CHO que foram transfectadas com o vetor usando seleção/amplificação de metotrexato. As células hospedeiras transformantes são cultivadas para permitir a expressão das cadeias pesada e leve do anticorpo e o anticorpo intacto é recuperado do meio de cultura. Técnicas de biologia molecular padrão são usadas para preparar o vetor de expressão recombinante, transfectar as células hospedeiras, cultivar células hospedeiras e recuperar o anticorpo do meio de cultura. Por exemplo, alguns anticorpos podem ser isolados por cromatografia de afinidade com a Proteína A ou a Proteína G de matriz acoplada.

Para anticorpos que incluem um domínio Fc, o sistema de produção do anticorpo pode produzir anticorpos nos quais a região Fc é glicosilada. Por exemplo, o domínio Fc de moléculas IgG é glicosilado em asparagina 297 no domínio CH2. Esta asparagina é o local para a modificação com oligossacarídeos do tipo biantenário. Foi demonstrado que esta glicosilação é necessária para as funções efetoras mediadas por receptores de Fcg e complemento C1q (Burton e Woof, 1992, *Adv. Immunol.* 51:1-84; Jefferis et al., 1998, *Immunol. Rev.* 163:59-76). Em uma modalidade, o domínio Fc é produzido em um sistema de expressão mamífero que realiza a adequada glicosilação de resíduos que correspondem à asparagina 297. O domínio Fc podem também incluir outras modificações eucarióticas pós-translacionais.

Os anticorpos podem ainda serem produzidos por um animal transgênico. Por exemplo, a Patente US nº 5,849,992 descreve um método para expressão de um anticorpo na glândula mamária de uma animal transgênico. Um transgene é

constituído de forma que inclui um promotor específico de leite e ácido nucleicos que codificam o anticorpo de interesse e uma seqüência de sinal para secreção. O leite produzido pelas fêmeas de tais mamíferos transgênicos inclui, os secretados aqui dispostos, o anticorpo de interesse. O anticorpo pode ser purificado a partir do leite, 5 ou para algumas aplicações, pode ser usado diretamente.

Um método para a produção de um camundongo transgênico é conforme segue. Resumidamente, a construção de um alvo que codifica o anticorpo é micro injetada no pró-núcleo masculino de óvulos fertilizados. Os óvulos são injetados no útero de uma mãe adotiva pseudo-grávida para o desenvolvimento em filhotes 10 viáveis. Alguma descendência incorpora o transgene.

#### SISTEMAS DE ENSAIO PARA ANTICORPOS FcRn CANDIDATOS

Os anticorpos candidatos de FcRn podem ainda ser caracterizados em ensaios que medem as suas atividade moduladoras em relação ao FcRn ou fragmentos do mesmo *in vitro* ou *in vivo*. Por exemplo, o FcRn pode ser combinado 15 com um substrato, como o IgG não específico ou porção Fc do IgG ou albumina sob condições de ensaio que permitem a reação de FcRn com o substrato. O ensaio é realizado na ausência do anticorpo candidato de FcRn, e na presença de crescentes concentrações do anticorpo candidato de FcRn. Tal concentração do anticorpo candidato no qual 50% da atividade de FcRn (por exemplo, se ligando ao substrato) 20 é inibida pelo anticorpo candidato é o valor de IC<sub>50</sub> (Concentração Inibidora 50%) ou EC<sub>50</sub> (Concentração Efetiva 50%) para aquele anticorpo. Dentro de uma série ou um grupo de anticorpos candidatos, aqueles que possuem menores valores de IC<sub>50</sub> ou EC<sub>50</sub> são considerados inibidores mais potentes de FcRn do que aqueles anticorpos 25 que possuem maiores valores de IC<sub>50</sub> ou EC<sub>50</sub>. Em algumas modalidades, os anticorpos possuem um valor IC<sub>50</sub> de 800 nM, 400 nM, 100 nM, 25 nM, 5 nM, 1 nM, ou menos conforme medidos em um ensaio *in vitro* para inibição da atividade de FcRn.

Os anticorpos candidatos podem ainda serem avaliados para seletividade em 30 para o FcRn. Por exemplo, um anticorpo candidato de FcRn foi ensaiado quanto a sua potência para o FcRn e um painel de receptores da superfície da célula, tais como os receptores que também utilizam o domínio CD2M, e um valor IC<sub>50</sub> ou um valor EC<sub>50</sub> pode ser determinado para cada receptor de proteína. Em uma modalidade, um composto que demonstra um valor de IC<sub>50</sub> ou valor EC<sub>50</sub> mais baixo 35 para o FcRn, e um valor IC<sub>50</sub> ou valor EC<sub>50</sub> mais alto para outros receptores dentro do painel de teste (moléculas MHC classe I) é considerado com seletivo para o FcRn.

Células endoteliais ou células epiteliais *ex vivo* que expressam o FcRn endógeno poderiam ser usadas para seguir a endocitose ou a transcitose dos anticorpos candidatos sob diferentes condições de pH e temperatura. A transcitose por IgG ou reciclagem por FcRn pode ser medida pelo seguinte anticorpo marcado na presença ou ausência de várias substâncias químicas e sob diferentes condições que são conhecidas pela influência ou que afetam a via de tráfego intracelular.

Um estudo farmacocinético em rato, camundongo ou macaco poderia ser realizado com anticorpos que se ligam ao FcRn dependentes de pH e independente para a determinação das suas meias-vidas no soro. Dessa forma, o efeito protetor do anticorpo pode ser avaliado *in vivo* para o uso potencial em um terapia imunomoduladora ou como uma imunoterapia de resgate através da injeção do anticorpo na presença ou na ausência de um IgG marcado ou uma porção Fc marcada do IgG. Uma diminuição na meia-vida do IgG/Fc marcado na presença do anticorpo candidato está em uma indicação de eficácia terapêutica do anticorpo.

#### 15 COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

Em outro aspecto, a divulgação fornece composições, por exemplo, composições farmaceuticamente aceitáveis ou composições farmacêuticas que incluem um anticorpo que se liga ao FcRn. O anticorpo que se liga ao FcRn pode ser formulado junto com um transportador farmaceuticamente aceitável. As composições farmacêuticas incluem composições terapêuticas e composições de diagnóstico, por exemplo, composições que incluem anticorpos que se ligam ao FcRn marcados anticorpos para imagiologia *in vivo*.

Um transportador farmaceuticamente aceitável inclui qualquer e todos os solventes, meio de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardo de absorção, e similares são fisiologicamente compatíveis. Preferencialmente, o transportador é adequado para a administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinal, ou epidermal (por exemplo, através de injeção ou infusão). Dependendo da rota de administração, o anticorpo que se liga ao FcRn pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

Um sal farmaceuticamente aceitável é um sal que retém a desejada atividade biológica do composto mãe e não confere efeitos toxicológicos que não são desejados. (veja, por exemplo, Berge, S.M., et al., 1977, *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição ácida e sais de adição básica. Os sais de adição básica incluem aqueles que são derivados de ácidos inorgânicos não

tóxicos, tais como o ácido hidroclorídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido hidrobrômico, ácido iodídrico, ácido fosforoso, e similares, bem como aqueles a partir de ácidos orgânicos não tóxicos tais como os ácidos alifáticos mono- e dicarboxílico, ácidos alcanóicos de fenila substituída, ácidos hidróxi alcanóicos, 5 ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos, e similares. Os sais de adição básica incluem aqueles que são derivados a partir de metais alcalino terrosos tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio, e similares, bem como aqueles derivados partir de aminas orgânicas não tóxicas tais como N,N'-dibenziletlenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, 10 etilenodiamina, procaína, e similares.

As composições podem estar com em uma variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, formas de dosagem líquida, semi-sólida e sólida, tais como as soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e infusíveis), dispersões ou suspensões, tabletes, pílulas, pós, lipossomas, e supositórios. A forma pode 15 depender do modo pretendido de administração e da aplicação terapêutica. Muitas composições estão na forma de solução injetável ou infusível, tais como as que são similares àquelas usadas para a administração de anticorpos em humanos. Um modo exemplar de administração é o parenteral (por exemplo, intravenoso, subcutâneo, intraperitoneal e intramuscular). Em uma modalidade, o anticorpo que 20 se liga ao FcRn é administrado através de infusão ou injeção intravenosa. Em outra modalidade, o anticorpo que se liga ao FcRn é administrado através de injeção intramuscular ou subcutânea.

A composição pode ser formulada como uma solução, micro emulsão, dispersão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para a alta 25 concentração da droga. Soluções estéreis injetáveis podem ser preparadas através da incorporação de um composto ativo (por exemplo, o ligante) na quantidade necessária em um solvente adequado com uma ou mais combinações dos ingredientes enumerados acima, conforme solicitado, seguido pela esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas através da incorporação de 30 compostos ativos dentro do veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários, a partir daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções estéreis injetáveis, os métodos de preparação são secagem à vácuo e liofilização que gera um pó do ingrediente ativo além de qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução 35 previamente filtrada-esterilizada do mesmo. A fluidez adequada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, através do uso de um revestimento como a lecitina,

através da manutenção do tamanho de partículas necessário para o caso de uma dispersão, e através do uso de surfactantes. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser provocada através da inclusão de agentes de retardam a absorção na composição, por exemplo, sais monoestearatos e gelatina.

5        Um anticorpo ligante de FcRn pode ser administrado por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, a rota/modo de administração é injeção ou infusão intravenosa. Por exemplo, para aplicações terapêuticas, o anticorpo ligante de FcRn pode ser administrado por infusão intravenosa em uma taxa inferior a 30, 20, 10, 5, ou 1 mg/min para alcançar uma dose de cerca de 1 a 100 mg/m<sup>2</sup> ou 7 a 25 mg/m<sup>2</sup>.

10      A rota e/ou modo de administração irá variar dependendo dos resultados desejados. Em determinadas modalidades, o composto ativo pode ser preparado com um transportador que protegerá o composto contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, e sistemas de distribuição microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados,

15      tais como acetato vinil etíleno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos. Veja, e.g., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., 1978, Marcel Dekker, Inc., New York.

20        Em certas modalidades, o anticorpo pode ser administrado oralmente, por exemplo, com um diluente inerte ou um transportador comestível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se desejado) podem também ser envolto em uma cápsula de gelatina com concha dura ou macia, comprimido em tabletes, ou incorporado diretamente à dieta do indivíduo. Para administração terapêutica os compostos podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de tabletes ingeríveis, tabletes bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, bolachas, e semelhantes. Para administrar um composto aqui divulgado sem ser pela administração parenteral, pode ser necessário revestir o composto com, ou co-administrar o composto com um material para impedir sua inativação.

25        Composições farmacêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade, a composição farmacêutica aqui divulgada pode ser administrada com um dispositivo, e.g. um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, uma bomba, ou implante.

30        Em certas modalidades, um anticorpo ligante de FcRn pode ser formulado para garantir distribuição adequada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para

garantir que os compostos terapêuticos aqui divulgados atravessem a barreira hematoencefálica (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomos. Para métodos de fabricação de lipossomos, veja, e.g., Patente Norte-Americana N°s 4,522,811; 5,374,548; e 5,399,331. Os lipossomos podem 5 compreender uma ou mais porções que são seletivamente transportadas para células ou órgãos específicos, aumentando assim a distribuição de drogas alvejadas (veja, e.g., V.V. Ranade, 1989, *J. Clin. Pharmacol.* 29:685).

Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta desejada ideal (e.g., uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolo pode ser 10 administrado, diversas doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser aumentada ou reduzida proporcionalmente conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições farmacêuticas em forma unitária de dosagem para facilitar a administração e uniformidade da dosagem. Forma unitária de dosagem conforme 15 usada nesta invenção se refere a unidades fisicamente distintas adaptadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade pré-determinada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o transportador farmacêutico exigido. A especificação para as formas unitárias de dosagem podem ser ditadas por e 20 diretamente dependentes das (a) características únicas do composto ativo e do efeito terapêutico específico a ser alcançado, e (b) limitações inerentes na técnica de compor tal composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Uma faixa exemplificativa, não-limitante para uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo aqui divulgado é 0,1-20 25 mg/kg, ou 1-10 mg/kg. Um anticorpo anti-FcRn pode ser administrado, e.g., por infusão intravenosa, e.g., em uma taxa inferior a 30, 20, 10, 5, ou 1 mg/min para alcançar uma dose de cerca de 1 a 100 mg/m<sup>2</sup> ou de cerca de 5 a 30 mg/m<sup>2</sup>. Os valores de dosagem podem variar com o tipo e gravidade da condição a ser aliviada. Para um indivíduo específico, regimes de dosagem específicos podem ser ajustados 30 ao longo do tempo de acordo com a necessidade do indivíduo e o discernimento profissional da pessoa que está administrando ou supervisionando a administração das composições.

As composições farmacêuticas aqui divulgadas podem incluir uma quantidade terapeuticamente eficaz ou uma quantidade profilaticamente eficaz de um anticorpo 35 ligante de FcRn aqui divulgado. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para

alcançar o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição pode variar de acordo com fatores tais como o estado da doença, idade, gênero e peso do indivíduo, e a habilidade do anticorpo de obter uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também 5 uma na qual quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais da composição são compensados pelos efeitos terapeuticamente benéficos.

#### ESTABILIZAÇÃO E RETENÇÃO

Em uma modalidade, um anticorpo ligante de FcRn é fisicamente associado a uma porção que melhora sua estabilização e/ou retenção em circulação, e.g., no 10 sangue, soro, linfa, ou outros tecidos, e.g., por pelo menos 1,5, 2, 5, 10, ou 50 vezes. Por exemplo, um anticorpo ligante de FcRn pode ser associado a um polímero, e.g., polímeros substancialmente não-antigênicos, tais como óxidos de polialquíleno ou óxidos de polietileno. Os polímeros adequados irão variar substancialmente por peso. Os polímeros tendo pesos médios por número de 15 moléculas que variam de cerca de 200 à cerca de 35.000 (ou cerca de 1.000 à cerca de 15.000, e 2.000 à cerca de 12.500) podem ser usados. Por exemplo, um anticorpo ligante de FcRn pode ser conjugado a um polímero solúvel em água, e.g., polímeros polivinil hidrofílicos, e.g. polivinilálcool e polivinilpirrolidona. Uma lista não-limitante de tais polímeros inclui homopolímeros de óxido de polialquíleno, tais como 20 polietileno glicol (PEG) ou polipropileno glicóis, polióis polioxietilenados, seus copolímeros e seus copolímeros de bloqueio, desde que a solubilidade na água dos copolímeros de bloqueio seja mantida.

#### KITS

Um anticorpo ligante de FcRn aqui descrito pode ser fornecido em um kit, 25 e.g., como um componente de um kit. Por exemplo, o kit inclui (a) um anticorpo ligante de FcRn, e.g., uma composição que inclui um anticorpo ligante de FcRn, e opcionalmente (b) material informacional. O material informacional pode ser descriptivo, instrucional, de marketing ou outro material referente aos métodos aqui descritos e/ou uso de um anticorpo ligante de FcRn para os métodos aqui descritos.

O material informacional dos kits não é limitado em sua forma. Em uma modalidade, o material informacional pode incluir informações sobre a produção do composto, peso molecular do composto, concentração, data de expiração, local de batelada ou produção, e assim por diante. Em uma modalidade, o material informacional se refere ao uso do anticorpo para tratar, prevenir ou diagnosticar um 30 distúrbio aqui descrito, e.g. um distúrbio autoimune.

Em uma modalidade, o material informacional pode incluir instruções para

administrar um anticorpo ligante de FcRn de maneira adequada para realizar os métodos aqui descritos, e.g., em uma dose adequada, forma de dosagem, ou modo de administração (e.g., uma dose, forma de dosagem, ou modo de administração aqui descrito). Em uma modalidade, o material informacional pode incluir instruções

5 para administrar um anticorpo ligante de FcRn a um indivíduo adequado, e.g., um humano, e.g., um humano tendo, ou em risco de, um distúrbio autoimune (e.g., artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistêmico). Por exemplo, o material pode incluir instruções para administrar um anticorpo ligante de FcRn a um paciente com lúpus ou um paciente com outro distúrbio autoimune.

10 O material informacional dos kits não é limitado em sua forma. Em muitos casos, o material informacional, e.g., instruções, é fornecido em material impresso, e.g., um texto impresso, desenho, e/ou fotografia, e.g. um rótulo ou folha impressa. Entretanto, o material impresso também pode ser fornecido em outros formatos, tais como material legível em computador, gravação de vídeo, ou gravação de áudio. Em 15 uma modalidade, o material informacional do kit são informações de contato, e.g., um endereço físico, endereço de email, website, ou número de telefone, onde um usuário do kit possa obter informações substantivas sobre um anticorpo ligante de FcRn e/ou seu uso nos métodos aqui descritos. É óbvio que o material informacional também pode ser fornecido em qualquer combinação de formatos.

20 Além de um anticorpo ligante de FcRn, a composição do kit pode incluir outros ingredientes, tais como um solvente ou tampão, um estabilizador, um preservativo, um agente saborizante (e.g., um antagonista amargo ou um edulcorante), uma fragrância ou outro ingrediente cosmético, e/ou um Segundo agente para tratar um distúrbio autoimune aqui descrito, e.g., artrite reumatóide ou 25 lúpus eritematoso sistêmico. Como alternativa, os outros ingredientes podem ser incluídos no kit, mas em composições ou contêineres diferentes de um anticorpo ligante de FcRn. Em tais modalidades, o kit pode incluir instruções para misturar um anticorpo ligante de FcRn e os outros ingredientes, ou para usar um anticorpo ligante de FcRn junto com os outros ingredientes.

30 Um anticorpo ligante de FcRn pode ser fornecido em qualquer forma, e.g., forma líquida, seca ou liofilizada. É preferível que um anticorpo ligante de FcRn seja substancialmente puro e/ou estéril. Quando um anticorpo ligante de FcRn é fornecido em uma solução líquida, a solução líquida é de preferência uma solução aquosa, sendo preferível uma solução aquosa estéril. Quando um anticorpo ligante 35 de FcRn é fornecido como uma forma seca, a reconstituição geralmente é através da adição de um solvente adequado. O solvente, e.g., água estéril ou tampão, pode

opcionalmente ser fornecido no kit.

O kit pode incluir um ou mais contêineres para a composição contendo um anticorpo ligante de FcRn. Em algumas modalidades, o kit contém contêineres separados, divisores ou compartimentos para a composição e material informacional. Por exemplo, a composição pode ser contida em uma garrafa, frasco ou seringa, e o material informacional pode ser contido em um envelope ou pacote plástico. Em outras modalidades, os elementos separados do kit são contidos dentro de um único contêiner não dividido. Por exemplo, a composição é contida em uma garrafa, frasco ou seringa que contém o material informacional na forma de um rótulo. Em algumas modalidades, o kit inclui a pluralidade (e.g., um pacote) de contêineres individuais, cada um contendo um ou mais formas de dosagem unitária (e.g., uma forma de dosagem aqui descrita) de um anticorpo ligante de FcRn. Por exemplo, o kit inclui uma pluralidade de seringas, ampolas, pacotes de folhas metálicas ou embalagens tipo blíster, cada uma contendo uma dose unitária única de um anticorpo ligante de FcRn. Os contêineres dos kits podem ser fechados hermeticamente se mar, a prova d'água (e.g., impermeáveis a mudanças em umidade ou evaporação), e/ou à prova de luz.

O kit opcionalmente inclui um aparelho adequado para administração da composição, e.g., uma seringa, pipeta inaladora, fórceps, colher medida, conta-gotas (e.g., conta-gotas de olhos), cotonete (e.g., um cotonete de algodão ou cotonete de madeira), ou qualquer aparelho de distribuição. Em uma modalidade, o aparelho é um aparelho implantável que dispensa doses medidas do anticorpo. A divulgação também apresenta um método de fornecimento de um kit, e.g., através da combinação dos componentes aqui descritos.

## 25 TRATAMENTOS

Anticorpos que se ligam ao FcRn e identificados pelo método aqui descrito e/ou detalhado tem utilidades terapêuticas e profiláticas. Estes anticorpos podem ser administrados a um indivíduo para tratar, prevenir, e/ou diagnosticar uma variedade de distúrbios, inclusive distúrbios autoimunes, ou até mesmo para células em cultura, e.g., *in vitro* ou *ex vivo*.

O termo “tratar” se refere a administrar uma terapia em uma quantidade, maneira e/ou modo eficaz para melhorar uma condição, sintoma, ou parâmetro associado a um distúrbio ou para impedir a progressão de um distúrbio, a um grau estatisticamente significativo ou a um grau detectável por alguém versado na técnica. Uma quantidade, maneira ou modo eficaz pode variar dependendo do indivíduo e pode ser adaptado ao indivíduo. O sujeito pode ser um humano ou um

animal não-humano, e.g., um mamífero não-humano.

O anticorpo ligante de FcRn pode ser administrado em uma quantidade terapeuticamente eficaz, e.g., tal como na administração de dose única ou múltipla a um indivíduo, o indivíduo exibe uma melhora dos sintomas de um distúrbio, e.g., um 5 distúrbio autoimune (e.g., artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistêmico) de um parâmetro indicativo da presença ou risco do distúrbio.

Distúrbios exemplificativos que afetam muitos órgãos ou órgãos localizados no corpo incluem: Esclerose Múltipla, artrite reumatóide, doenças inflamatórias do intestino (IBD), lúpus, e espondilite anquilosa. Alguns destes distúrbios são

10 discutidos abaixo. Em um aspecto, a invenção fornece métodos para o tratamento de câncer. Ainda outros distúrbios que podem ser tratados usando um anticorpo ligante de FcRn incluem: esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome de Goodpasture, granulomatose de Wegener, polimialgia reumática, arterite temporal / arterite de células gigantes, alopecia areata, espondilite anquilosa, síndrome de 15 antifosfolipide, doença autoimune de Addison, anemia hemolítica autoimune, hepatite autoimune, doença autoimune do ouvido interno, síndrome linfoprolifertativa autoimune (ALPS), púrpura trombocitopênica autoimune (ATP), doença de Behcet, penfigóide bolhoso, cardiomiopatia, dermatite sprue celíaca, síndrome de fadiga crônica, síndrome de deficiência imune (CFIDS), polineuropatia 20 demielinadora inflamatória crônica, penfigóide cicatricial, doença de aglutinina fria, síndrome de CREST, doença de Crohn, doença de Dego, dermatomiosite, dermatomiosite infantil, lúpus discóide, crioglobulinemia mista essencial, fibromialgia, fibromiosite, doença de Grave, síndrome de Guillain-Barre, tireoidite de Hashimoto, fibrose pulmonar idiopática, púrpura trombocitopênica idiopática (ITP), nefropatia de 25 IgA, diabetes dependente de insulina (Tipo I), artrite infantil, doença de Meniere, doença do tecido conectivo misto, miastenia grave, penfigus vulgaris, penfigus foliaceus, penfigus paraneoplástico, anemia perniciosa, poliarterite nodosa, policondrite, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiosite, dermatomiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar primária, psoríase, 30 fenômeno de Raynaud, síndrome de Reiter, febre reumática, sarcoidose, Síndrome de "stiff-man", arterite de Takayasu, colite ulcerativa, uveíte, vasculite, vitiligo.

Em algumas modalidades, o anticorpo ligante anti-FcRn é administrado para remover um anticorpo terapêutico indesejado da corrente sanguínea.

Em algumas modalidades, o anticorpo ligante anti-FcRn é administrado para suprimir o nível de anticorpos anti-HLA. Em algumas modalidades, o nível de anticorpos anti-HLA é suprimido junto com transplante de órgão.

Métodos de administração de anticorpos ligantes de FcRn são descritos em "Composições Farmacêuticas". Dosagens adequadas das moléculas usadas dependerão da idade e peso do indivíduo e a droga específica usada. Os anticorpos podem ser usados como agentes concorrentes para inibir ou reduzir uma interação indesejável, *e.g.*, entre um agente natural ou patológico e o FcRn.

O anticorpo de ligação de FcRn pode ser usado para distribuir macro e micromoléculas, *e.g.*, um gene dentro da célula para fins de terapia de gene dentro do endotélio ou epitélio e mirar somente os tecidos que expressam o FcRn. Os anticorpos podem ser usados para distribuir uma variedade de drogas citotóxicas inclusive drogas terapêuticas, um composto emissor de radiação, moléculas de origem vegetal, fúngica ou bacteriana, proteínas biológicas, e suas misturas. As drogas citotóxicas podem ser drogas citotóxicas que atuam intracelularmente, tais como emissoras de radiação de variação curta, inclusive, por exemplo, variação curta, emissoras-□ de alta energia, conforme aqui descrito.

No caso de toxinas de polipeptídeos, podem ser usadas técnicas de ácido nucléico recombinante para construir um ácido nucléico que codifica o anticorpo e a citotoxina (ou um componente de polipeptídeo da mesma) como fusos translacionais. O ácido nucléico recombinante é então expresso, *e.g.*, em células e o polipeptídeo codificado isolado.

Como alternativa, o anticorpo ligante de FcRn pode ser acoplado a emissores de radiação de alta energia, por exemplo, um radioisótopo, tal como  $^{131}\text{I}$ , um emissor-□, que, quando localizado em um sítio, resulta na eliminação de diversos diâmetros de células. Veja, *e.g.*, S.E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al. (eds.), pp 303-316 (Academic Press 1985). Outros radioisótopos adequados incluem emissores, tais como  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ , e  $^{211}\text{At}$ , e emissores b, tais como  $^{186}\text{Re}$  e  $^{90}\text{Y}$ . Além disso,  $^{177}\text{Lu}$  pode também ser usado como agente citotóxico e de imagiologia.

A radioimunoterapia (RIT) usando anticorpos marcados com  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , e  $^{177}\text{Lu}$  se encontra sob investigação clínica intensa. Há diferenças significativas nas características físicas destes três nuclídeos e como resultado, a escolha do radionuclídeo é muito crítica para distribuir a dose de radiação máxima a um tecido de interesse. As partículas beta de energia maiores de  $^{90}\text{Y}$  podem ser boas para tumores volumosos. Partículas beta de energia relativamente baixa de  $^{131}\text{I}$  são ideais, mas a dehalogenação in vivo de moléculas radioiodinadas é a principal desvantagem para a internalização de anticorpos. Em contrapartida,  $^{177}\text{Lu}$  tem

partícula beta de baixa energia com apenas 0,2-0,3 mm de variação e entrega uma dose de radiação muito inferior à medula óssea em comparação a  $^{90}\text{Y}$ . Além disso, devido à meia-vida física mais longa (comparada a  $^{90}\text{Y}$ ), os tempos de residência são maiores. Em consequência, maiores atividades (mais quantidades de mCi) de agentes marcados com  $^{177}\text{Lu}$  podem ser administradas com, comparativamente, menos dose de radiação para a medula. Vários estudos clínicos investigaram o uso de anticorpos marcados com  $^{177}\text{Lu}$  no tratamento de diversos cânceres. (Mulligan T et al., 1995, *Clin. Canc. Res.* 1: 1447-1454; Meredith RF, et al., 1996, *J. Nucl. Med.* 37:1491-1496; Alvarez RD, et al., 1997, *Gynecol. Oncol.* 65: 94-101).

O uso dos métodos terapêuticos para tratar auto-imunidade tem uma série de benefícios. Uma vez que os anticorpos especificamente reconhecem FcRn, outro tecido é distribuído e altos níveis do agente são entregues diretamente ao sítio onde é exigida a terapia. O tratamento pode ser monitorado de forma eficaz com parâmetros clínicos. Como alternativa, estes parâmetros podem ser usados para indicar quando tal tratamento deve ser empregado.

Um anticorpo de ligação de FcRn pode ser administrado em combinação com uma ou mais das modalidades existentes para tratamento de distúrbios autoimunes, inclusive, entre outras: terapia Ig intravenosa, drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (NSAID), e corticosteróides; e tratamentos anti-inflamatórios tais como ciclosporinas, rapamicinas ou ascomicinas, ou seus análogos imunossupressores, e.g., ciclosporina A, ciclosporina G, FK-506, rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etilrapamicina etc.; ciclofosfamida; azatioprina; metotrexato; brequinar; FTY 720; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato mofetil; 15-deoxispergualina; anticorpos monoclonais imunossupressores, e.g., anticorpos monoclonais para receptores de leucócitos, e.g., MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD25, CD28, B7, CD45, ou CD58 ou seus ligantes; ou outros compostos imunomodulatórios, e.g., CTLA4Ig, ou outros inibidores de moléculas de adesão, e.g. mAbs ou inibidores de peso molecular baixo inclusive antagonistas de selectina e antagonistas de VLA-4. Estas terapias de combinação podem ser parte de um regime imunomodulador ou um regime para o tratamento ou prevenção de rejeição de alo- ou xenotransplante ou crônica, ou distúrbios autoimunes.

#### **ESCLEROSE MÚLTIPLA**

A esclerose múltipla (MS) é uma doença do sistema nervoso central caracterizada pela inflamação e perda de bainhas de mielina. Pacientes com esclerose múltipla podem ser identificados por critérios que estabelecem um diagnóstico de esclerose múltipla clinicamente definitiva conforme

definido pelo seminário sobre o diagnóstico de esclerose múltipla (Poser et al., Ann. Neurol. 13:227, 1983). A esclerose múltipla pode ser também diagnosticada por evidências de dois ataques e bandas oligoclonais de IgG no fluido cérebro-espinhal ou pela combinação de um ataque, evidência clínica de duas lesões e banda oligoclonal de IgG no fluido cérebro-espinhal. Os critérios de McDonald também podem ser usados para diagnosticar esclerose múltipla. McDonald et al.(2001) *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis*, Ann Neurol 50:121-127. Os critérios de McDonald incluem o uso de evidência de MRI de deficiência de CNS ao longo do tempo para ser usada no diagnóstico de esclerose múltipla, na ausência de ataques clínicos múltiplos.

O tratamento eficaz da esclerose múltipla podem ser avaliados de diversas formas. Os seguintes parâmetros são usados para medir a eficácia do tratamento. Os critérios exemplificativos incluem: EDSS (escala de estado de deficiência estendida), e aparecimento de exacerbações em imagens de ressonância magnética (MRI). A EDSS é um meio de classificar deficiência clínica devido à esclerose múltipla (Kurtzke, Neurology 33:1444, 1983). Oito sistemas funcionais são avaliados para o tipo e gravidade da deficiência neurológica. Brevemente, antes do tratamento, os pacientes são avaliados para deficiência nos seguintes sistemas: piramidal, cerebelo, haste do cérebro, sensorial, intestino e bexiga, visual, cerebral, e outros. São conduzidos acompanhamentos em diferentes intervalos. A escala varia de 0 (normal) a 10 (morte devido à esclerose múltipla). Uma diminuição de uma etapa completa pode indicar um tratamento eficaz (Kurtzke, Ann. Neurol. 36:573-79, 1994).

Sintomas exemplificativos relacionados à esclerose múltipla, que podem ser tratados com os métodos aqui descritos incluem: neurite óptica, diplopia, dismetria ocular, oftalmoplegia internuclear, fosfenos de movimento e som, defeito pupilar aferente, paresia, monoparesia, paraparesia, hemiparesia, quadraparesia, plegia, paraplegia, hemiplegia, tetraplegia, quadraplegia, espasticidade, disartria, atrofia muscular, espasmos, câimbras, hipotonía, espasmo clônico, mioclonia, mioquimia, síndrome das pernas inquietas, pé caído, reflexos disfuncionais, paraesthesia, anestesia, neuralgia, dor neuropática e neurogênica, l'hermitte's, disfunção proprioceptiva, neuralgia trigeminal, ataxia, tremor intencional, dismetria, vestibular ataxia, vertigem, ataxia da fala, distonia, disdiadocoquinesia, micturação freqüente, espasticidade da bexiga, bexiga frouxa, dissinergia do esfínter- detrusor, disfunção erétil, anorgasmia, frigidez, constipação, urgência fecal, incontinência fecal,

depressão, disfunção cognitiva, demência, oscilações de humor, labilidade emocional, euforia, síndrome bipolar, ansiedade, afasia, disfasia, fadiga, sintoma de Uhthoff, refluxo gastroesofageal, e distúrbios do sono.

Além, ou antes dos estudos humanos, pode ser usado um modelo animal para avaliar a eficácia do uso de dois agentes. Um modelo animal exemplificativo para esclerose múltipla é o modelo de camundongo de encefalite autoimune experimental (EAE), e.g., conforme descrito em (Tuohy *et al.* (J. Immunol. (1988) 141: 1126-1130), Sobel *et al.* (J. Immunol. (1984) 132: 2393-2401), e Traugott (Cell Immunol. (1989) 119: 114-129). Pode ser administrado aos camundongos um primeiro e segundo agente aqui descrito antes da indução de EAE. Em seguida, os camundongos são avaliados quanto a critérios característicos para determinar a eficácia do uso de dois agentes no modelo.

#### *IBD*

Doenças inflamatórias intestinais (IBD) geralmente incluem inflamação intestinal reincidente crônica. IBD se refere a duas desordens distintas, doença de Crohn e colite ulcerosa (UC). Os sintomas clínicos de IBD incluem sangramento retal intermitente, cólica abdominal, perda de peso e diarréia. Um índice clínico também pode ser usado para monitorar IBD, como o Índice de Atividade Clínica para a Colite Ulcerosa. Ver também, Walmsley *et al.* Gut. 1998 Jul; 43(1):29-32 e Jowett *et al.* (2003) *Scand J Gastroenterol.* 38 (2):164-71. Um anticorpo FcRn de ligação pode ser usado para melhorar pelo menos um sintoma de IBD, ou para melhorar um índice clínico de doença inflamatória intestinal.

#### *ARTRITE REUMATÓIDE*

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória autoimune, que provoca dor, inchaço, rigidez e perda da função das articulações. A artrite reumatóide se apresenta frequentemente em um padrão simétrico. A doença pode afetar as articulações do pulso e as articulações do dedo mais próximas à mão. Ela também pode afetar outras partes do corpo, além das articulações. Além disso, pessoas com artrite reumatóide podem ter fadiga, febres ocasionais e mal-estar geral. Os fatores positivos para o diagnóstico da artrite reumatóide incluem o anticorpo sanguíneo de "fator reumatóide" e o anticorpo citrulina. Um anticorpo FcRn de ligação pode ser útil no tratamento, prevenção, ou alívio da artrite reumatóide, ou um ou mais sintomas da artrite reumatóide.

#### *LÚPUS*

O lúpus eritematoso sistêmico (SLE) é um distúrbio autoimune que leva à inflamação e danos a vários tecidos do corpo. SLE pode ser mediada por

autoanticorpos, direcionados contra seu próprio DNA. O lúpus pode afetar muitas partes do corpo, incluindo articulações, pele, rins, coração, pulmões, vasos sanguíneos e o cérebro. Embora vários sintomas possam estar presentes, alguns dos mais comuns incluem fadiga extrema, dor e inchaço nas articulações (artrite), febre inexplicada, erupções cutâneas e problemas renais. Sintomas exemplares do lúpus incluem dor ou inchaço nas articulações, febre inexplicável e fadiga extrema. A erupção cutânea vermelha característica pode aparecer no nariz e nas bochechas. As erupções cutâneas podem também ocorrer na face e orelhas, braços, ombros, tórax e mãos. Outros sintomas do lúpus incluem dor no peito, perda de cabelo, anemia, úlceras na boca e dedos das mãos e dos pés pálidos ou roxos, devido ao frio e estresse. Algumas pessoas também têm dores de cabeça, tontura, depressão, confusão mental, ou convulsões. Os fatores positivos para o diagnóstico de SLE incluem anticorpos anti-nucleares circulantes, anticorpos anti-DNA e anticorpos anti-Sm. Um anticorpo FcRn de ligação pode ser útil no tratamento, prevenção ou alívio de SLE, ou de um ou mais sintomas de SLE. Lúpus, conforme utilizado aqui, inclui lúpus cutâneo e nefrite por lúpus.

#### *TROMBOCITOPENIA IMUNE (ITP)*

ITP é uma doença de destruição plaquetária periférica aumentada, em que os pacientes desenvolvem anticorpos que se ligam a proteínas específicas da membrana plaquetária. Os anticorpos antiplaquetários opsonizam as plaquetas, levando à destruição por macrófagos. As tentativas de tratar ITP têm envolvido normalmente a supressão do sistema imunológico, o que provoca um aumento nos níveis de plaquetas. Um anticorpo FcRn de ligação pode ser útil no tratamento, prevenção, ou alívio da ITP, ou de um ou mais sintomas deste.

#### *ESPONDILITE ANQUILOSANTE*

A espondilite anquilosante é uma doença autoimune que não só afeta a coluna vertebral, mas também pode afetar os quadris, ombros e joelhos, assim como os tendões e ligamentos ao redor dos ossos e articulações podem ficar inflamados, resultando em dor e rigidez. A espondilite anquilosante tende a afetar as pessoas no final da adolescência, ou início da idade adulta. Um anticorpo FcRn de ligação pode ser útil no tratamento, prevenção ou atenuação da espondilite anquilosante, ou de um ou mais sintomas desta.

#### *PÊNFIGO*

Pênfigo é uma doença autoimune que afeta as membranas mucosas e a pele. A doença é caracterizada pela produção de autoanticorpos contra desmogleína. A desmogleína é uma proteína da família das caderinas e está envolvida com a

formação dos desmossomos, que junta as células umas com as outras. Pênfigo pode ser classificado como um dos três tipos: *pemphigus vulgaris*, a forma mais comum da doença, onde autoanticorpos se direcionam à desmogleína 3. Em *pemphigus foliaceus*, autoanticorpos contra desmogleína 1 são gerados. O terceiro tipo, e menos comum, da doença é o pênfigo paraneoplástico, onde autoanticorpos se direcionam à desmoplaquina, que está associada a cânceres, como o linfoma. Os distúrbios são geralmente diagnosticados por um médico dermatologista, pela aparência da pele, e são conformados pela detecção de autoanticorpos contra desmogleína. Os métodos de tratamento incluem a administração de esteróides e/ou a administração de um anticorpo CD20, como *Rituximab (Rituxan)*

### CÂNCER

"Câncer", conforme utilizado aqui, refere-se a um crescimento descontrolado das células, o que interfere no funcionamento normal dos órgãos e sistemas corporais. Cânceres que migram do seu local original e se espalham pelos órgãos vitais podem, eventualmente, levar à morte do indivíduo, através da deterioração funcional dos órgãos afetados. Carcinomas são cânceres malignos que surgem a partir de células epiteliais e incluem o adenocarcinoma e o carcinoma de células escamosas. Os sarcomas são o câncer do tecido conjuntivo ou de suporte, e incluem osteossarcoma, condrossarcoma e tumor do estroma gastrointestinal.

Cânceres hematopoiéticos, como a leucemia, são capazes de sobrepujar os compartimentos hematopoiéticos normais em um indivíduo, levando assim à falha hematopoiética (sob a forma de anemia, trombocitopenia e neutropenia), causando finalmente a morte. Uma pessoa versada na técnica pode classificar um câncer como um sarcoma, carcinoma, ou câncer hematopoiético.

Câncer, conforme utilizado aqui, inclui os seguintes tipos de câncer, câncer de mama, câncer do trato biliar, câncer de bexiga, câncer de cérebro, incluindo glioblastomas e meduloblastomas, câncer cervical; coriocarcinoma; câncer de cólon, câncer de endométrio; câncer de esôfago; câncer gástrico; neoplasias hematológicas, incluindo leucemia linfóide e mielóide aguda; leucemia leucemia/linfoma linfoblástico células de células T; leucemia de célula cabeluda; leucemia mielóide crônica; mieloma múltiplo; leucemias associadas a AIDS e linfoma de leucemia de células T adultas; neoplasias intraepiteliais, incluindo doença de *Bowen* e doença de *Paget*, câncer de fígado; câncer de pulmão; linfomas, incluindo doença de Hodgkin e linfomas de linfócitos; neuroblastomas; câncer oral, incluindo carcinoma de células escamosas; câncer de ovário, incluindo aqueles decorrentes de células epiteliais, células do estroma, células germinativas e células

mesenquimais; câncer pancreático; câncer de próstata; câncer retal; sarcomas, incluindo leiomiossarcoma, abdominossarcoma, lipossarcoma, fibrossarcoma e osteosarcoma; câncer de pele, incluindo melanoma, sarcoma de *Kaposi*, câncer basocelular e carcinoma de células escamosas; câncer testicular, incluindo tumores germinais, como seminoma, não seminoma (teratomas, coriocarcinomas), tumores do estroma e tumores de células germinativas; câncer de tireóide, incluindo adenocarcinoma e carcinoma medular da tireóide; e câncer renal, incluindo adenocarcinoma e tumor de *Wilms*. Outros tipos de câncer serão conhecidos para aqueles versados na técnica.

#### 10           ***TRATAMENTO DE FETOS***

FcRn medeia o transporte de IgG materno através das barreiras das células epiteliais até o feto. Os anticorpos descritos aqui podem ser usados para entregar drogas macromoleculares, por exemplo, antibióticos e/ou pequenas moléculas aos fetos no útero. O feto pode estar sofrendo de uma condição ou doença (por exemplo, uma infecção intestinal, ou distúrbio metabólico) que requeira tratamento. A droga ou molécula para tratar a condição ou doença pode ser conjugada a um anticorpo FcRn de ligação e administrada a uma mulher grávida que tem um feto no útero que precisa de tratamento. O anticorpo conjugado FcRn de ligação une-se a FcRn e é assim transportado até o feto, através da placenta. O feto recebe a droga ou o tratamento molecular.

#### **IMUNOADSORÇÃO**

Em algumas modalidades, a invenção fornece métodos para a remoção de um anticorpo terapêutico indesejado de um indivíduo. Em algumas modalidades, o anticorpo terapêutico indesejado é um anticorpo IgG. Em algumas modalidades, o anticorpo terapêutico indesejado é um anticorpo anti-VLA4, como *Natalizumab* (*Tysabri*, *Biogen Idec/ Elan*), *efalizumab* (*Raptiva*, *Genetech*), *bevacizumab* (*Avastin*, *Genentech*) e proteínas de fusão de Fc, como *etanercept* (*Enbrel*, *Amgen/Wyeth*). A terapia com anticorpos monoclonais *Natalizumab* tem sido associada à Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (PML). O esgotamento do anticorpo terapêutico da corrente do sangue e/ou do resto do corpo pode alterar a progressão da PML.

Em algumas modalidades, os métodos de tratamento apresentados aqui podem ser combinados com métodos para remover anticorpos terapêuticos, total ou parcialmente, da corrente sanguínea de um indivíduo. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn apresentados aqui podem ser combinados com uma proteína de captura, que pode se ligar a um anticorpo terapêutico, com as combinações

resultando num aumento da depuração do anticorpo terapêutico da corrente sanguínea. Em algumas modalidades, o método de remoção, total ou parcial, do anticorpo terapêutico da corrente sanguínea é a troca plasmática (PLEX). Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn pode ser administrados em um indivíduo na troca plasmática. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn pode ser usados como um imunoabsorvente para FcRn no processo de troca plasmática.

Na troca plasmática (também chamada de aférese, ou plasmaférese) o sangue é retirado do corpo e o plasma contendo um agente indesejado, tal como colesterol ou um anticorpo terapêutico, é removido do sangue por um separador de células. O sangue pode ser removido do corpo em lotes, ou pode ser removido em um modo de fluxo contínuo, com este último permitindo a reintrodução do sangue processado no corpo. O plasma removido, que compreende o agente indesejado, pode ser descartado e o paciente pode receber o plasma de um doador ou salino, com proteínas adicionadas em contrapartida. Em algumas modalidades, vários ciclos de troca plasmática podem ser necessários para remover o agente indesejável do sangue, ou para diminuir o nível do agente indesejado no sangue a um nível aceitável. Em algumas modalidades, o sangue é "filtrado" e o agente indesejado é removido, antes de devolver o sangue ao paciente. Os métodos de troca plasmática são conhecidos na técnica e são descritas, por exemplo, em U.S. 6.960.178.

A troca plasmática mostrou redução dos níveis de anticorpos terapêuticos no sangue de um indivíduo e restauração da homeostase (Ver, por exemplo, Khatri et al, 2009; Neurologia 72:402-409).

Um anticorpo terapêutico com base em IgG (como *natalizumab*) pode ser removido do sangue, plasma, ou soro, pondo o sangue em contato com a proteína A de captura Estafilocócica, que ligará a região Fc de IgG e removerá o anticorpo IgG da corrente sanguínea. Outras proteínas de captura podem ser utilizadas para tipos diferentes de anticorpos do isotipo. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn podem ser usados como uma proteína de captura no processo de troca plasmática, resultando na remoção de FcRn da corrente sanguínea, aumentando assim a quantidade de anticorpos terapêuticos "livres". Os anticorpos terapêuticos "livres" resultantes terão uma meia vida mais curta do que os anticorpos presentes antes do tratamento, e/ou podem ser removidos do sangue mais facilmente com uma proteína de captura diferente (como a proteína A). Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn são administrados a um paciente durante, ou antes, da troca plasmática. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn podem ser

imobilizados e utilizados em uma coluna, resultando na ligação de FcRn. Em algumas modalidades, o sangue de um paciente que contém um anticorpo terapêutico é posto em contato com o anticorpo imobilizado anti-FcRn e com a proteína A FcRn imobilizada.

- 5       Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn apresentados aqui podem ser usados em terapia de "resgate" de anticorpos terapêuticos que tenham sido administrados e tenham demonstrado algum efeito adverso. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-FcRn pode ser usado como uma alternativa para a troca plasmática. A administração de um anti-FcRn pode obter a depleção do 10 anticorpo terapêutico, sem os riscos associados à plasmaférrese e à troca plasmática, tais como acesso vascular, terapia com citrato e obtenção de plasma do doador.

#### ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS

Os antígenos leucocitários humanos (HLA) estão presentes em antígenos e peptídeos no exterior da célula, que são posteriormente reconhecidos pelas células T, que por sua vez, podem ativar as células B. O painel de genes HLA disponíveis é único para cada pessoa. Qualquer célula exibindo um HLA que não seja próprio vai resultar na indução de uma resposta imune. Em geral, quanto mais diferente for o HLA "não próprio" do HLA próprio, mais forte será a resposta imune. Por exemplo, 15 no caso de transplantes de órgãos, os indivíduos com genes de HLA similares são preferidos, para minimizar a resposta imune. Foi descoberto que anticorpos HLA específicos do doador são associados à falha do enxerto em transplante de rim, coração, pulmão e fígado.

Em algumas modalidades, a invenção fornece métodos para diminuir o nível 25 de anticorpos HLA "não próprios" em um indivíduo. Diminuir o nível de anticorpos HLA "não próprios" pode resultar na supressão de uma resposta imune, por exemplo, durante o transplante de órgãos. Em algumas modalidades, é administrado anti-FcRn a uma pessoa que será submetida a um transplante de órgão. Em algumas modalidades, é administrado um anticorpo anti-FcR a uma pessoa que está 30 passando por um transplante de órgão. Em algumas modalidades, é administrado um anticorpo anti-FcRn a uma pessoa que recebeu um transplante de órgão. Os ensaios para medir os níveis de anticorpos HLA são bem conhecidos na técnica.

#### USOS DE DIAGNÓSTICO

Os anticorpos que se ligam a FcRn e são identificados pelo método descrito 35 aqui e/ou detalhado aqui possuem utilidades de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*.

Em um aspecto, a divulgação fornece um método de diagnóstico para

detectar a presença de um FcRn, *in vitro* ou *in vivo* (por exemplo, imageamento *in vivo* em um indivíduo). O método pode incluir localizar FcRn para uma localização subcelular, por exemplo, o endossomo. O método pode incluir: (i) pôr uma amostra em contato com o anticorpo FcRn de ligação; e (ii) detectar a formação de um complexo entre o anticorpo FcRn de ligação e a amostra. O método também pode incluir pôr uma amostra de referência (por exemplo, uma amostra de controle) em contato com o anticorpo e determinar a extensão da formação do complexo entre o anticorpo e a amostra em relação ao mesmo, para a amostra de referência. A mudança, por exemplo, uma variação estatisticamente significativa, na formação do complexo na amostra, ou no indivíduo em relação à amostra de controle, ou no indivíduo, pode ser um indicativo da presença de FcRn na amostra.

Outro método exemplar inclui: (i) administrar o anticorpo FcRn de ligação em um indivíduo; e (iii) detectar a formação de um complexo entre o anticorpo FcRn de ligação e o indivíduo. A detecção pode incluir a determinação da localização ou tempo de formação do complexo.

O anticorpo FcRn de ligação pode ser direta ou indiretamente marcado com uma substância detectável, para facilitar a detecção do anticorpo ligado ou não-ligado. Substâncias detectáveis adequadas incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes e materiais radioativos.

A formação do complexo entre o anticorpo FcRn de ligação e o FcRn pode ser detectada através da medição ou visualização do anticorpo ligado ao FcRn, ou do anticorpo não ligado. Ensaios de detecção convencionais podem ser usados, por exemplo, como Ensaios Imunoabsorventes Ligados à Enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA), ou imuno-histoquímica de tecidos. Além disso, para a marcação do anticorpo FcRn de ligação, a presença de FcRn pode ser analisada em uma amostra através de imunoensaio de competição, utilizando padrões marcados com uma substância detectável e um anticorpo FcRn de ligação não marcado. Em um exemplo deste ensaio, a amostra biológica, os padrões marcados e o anticorpo FcRn de ligação são combinados e a quantidade de padrão marcado ligado ao anticorpo não marcado é determinada. A quantidade de FcRn na amostra é inversamente proporcional à quantidade de padrão marcado ligado ao anticorpo FcRn de ligação.

Anticorpos fluoróforo e cromóforo marcados podem ser preparados. Como os anticorpos e outras proteínas absorvem luz com comprimentos de onda de até cerca 310 nm, as porções fluorescentes devem ser selecionadas para ter uma absorção substancial em comprimentos de onda acima de 310 nm e, de preferência, acima de

400 nm. Uma variedade de substâncias fluorescentes e cromóforos adequados são descritos por Stryer, 1968, *Science* 162:526 e Brand, L. et al., 1972, *Annu. Rev. Biochem.* 41:843-868. Os anticorpos podem ser marcados com grupos cromóforos fluorescentes por procedimentos convencionais, tais como aqueles divulgados nas 5 Patentes U.S. nºs. 3.940.475, 4.289.747 e 4.376.110. Um grupo de substâncias fluorescentes com um número de propriedades desejáveis, descrito acima, é o de corantes xanteno, que incluem fluoresceínas e rodaminas. Outro grupo de compostos fluorescentes são as naftilaminas. Uma vez marcado com um fluoróforo ou cromóforo, o anticorpo pode ser usado para detectar a presença ou a localização 10 de FcRn em uma amostra, por exemplo, usando microscopia de fluorescência (assim como microscopia confocal ou de deconvolução).

**Análise Histológica.** A imuno-histoquímica pode ser realizada utilizando os anticorpos descritos aqui. Por exemplo, o anticorpo pode ser sintetizado com um marcador (como um marcador de purificação ou epítopo), ou pode ser marcado de forma detectável, por exemplo, conjugando um marcador, ou grupo de marcador de ligação. Por exemplo, um quelante pode ser ligado ao anticorpo. O anticorpo é então posto em contato com uma preparação histológica, por exemplo, uma seção fixa de tecido que está em uma lâmina de microscópio. Após uma incubação para ligação, a preparação é lavada para remover os anticorpos não ligados. A preparação é então 15 analisada, por exemplo, através de microscopia, para identificar se o anticorpo foi ligado à preparação.

Naturalmente, o anticorpo pode ser marcado no momento da ligação. Após a ligação e a lavagem, o anticorpo é marcado, a fim de torná-lo detectável.

**Matrizes de Proteína.** O anticorpo FcRn de ligação também pode ser 25 imobilizado em uma matriz de proteína. A matriz de proteína pode ser usada como uma ferramenta de diagnóstico, por exemplo, para fazer a triagem de amostras médicas (tais como células isoladas, sangue, soro, biópsias e semelhantes). Naturalmente, a matriz de proteína também pode incluir outros ligantes, por exemplo, que se ligam a FcRn ou outras moléculas alvo.

Os métodos de produção de matrizes de polipeptídeos são descritos, por exemplo, em De Wildt et al., 2000, *Nat. Biotechnol.* 18:989-994; Lueking et al., 1999, *Anal. Biochem.* 270:103-111; Ge, 2000, *Nucleic Acids Res.* 28, e3, I-VII; MacBeath e Schreiber, 2000, *Science* 289:1760-1763; WO 01/40803 e WO 99/51773A1. Os polipeptídeos para a matriz podem ser vistos em alta velocidade, por exemplo, 30 usando aparatos robóticos, por exemplo, de *Genetic MicroSystems* ou *BioRobotics*. O substrato de matriz pode ser, por exemplo, nitrocelulose, plástico, vidro, por

exemplo, vidro de superfície modificada. A matriz também pode incluir uma matriz porosa, por exemplo, acrilamida, agarose ou outro polímero.

Por exemplo, a matriz pode ser uma matriz de anticorpos, por exemplo, conforme descrito em De Wildt, *supra*. As células que produzem os anticorpos podem ser cultivadas em um filtro em formato de matriz. A produção de anticorpos é induzida e os polipeptídeos expressados são imobilizados ao filtro no local da célula. Uma matriz de anticorpos pode ser posta em contato com um alvo marcado para determinar a extensão da ligação do alvo para cada anticorpo imobilizado. As informações sobre a extensão da ligação em cada endereço da matriz podem ser armazenadas como um perfil, por exemplo, em um banco de dados de computador. A matriz de anticorpos pode ser produzida em réplicas e usada para comparar de perfis de ligação, por exemplo, de um alvo e um não-alvo.

**FACS (Separação de Células Ativadas por Fluorescência).** O anticorpo FcRn de ligação pode ser usado para marcar células, por exemplo, as células de uma amostra (por exemplo, uma amostra do paciente). O anticorpo também é anexado (ou anexável) a um composto fluorescente. As células podem então ser classificadas usando um separador de células ativadas por fluorescência (por exemplo, usando um separador disponível a partir de *Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose CA*; ver também Patente U.S. N°s. 5.627.037; 5.030.002; e 5.137.809). À medida que as células passam pelo separador, um feixe de laser excita o composto fluorescente, enquanto um detector conta as células que passam e determina se um composto fluorescente está ou não ligado à célula, através da detecção de fluorescência. A quantidade de marcador ligado a cada célula pode ser quantificada e analisada para caracterizar a amostra.

O separador pode também desviar a célula e separar as células ligadas pelo anticorpo das células não ligadas pelo anticorpo. As células separadas podem ser cultivadas e/ou caracterizadas.

**Imageamento *In vivo*.** Também é caracterizado um método para detectar a presença de tecidos que expressam FcRn *in vivo*. O método inclui (i) administrar a um indivíduo (por exemplo, um paciente com uma doença autoimune) um anticorpo anti-FcRn, conjugado com um marcador detectável; (ii) expor o indivíduo a um meio de detecção de tal marcador detectável para os tecidos ou células que expressam FcRn. Por exemplo, o indivíduo é mapeado, por exemplo, por NMR, ou outros meios tomográficos.

Exemplos de marcadores úteis para diagnóstico por imageamento incluem radio-marcadores como  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  e  $^{188}\text{Rh}$ , marcadores

- fluorescentes, como fluoresceína e rodamina, marcadores ativos de ressonância magnética nuclear, isótopos que emitem pósitrons detectáveis por um scanner de tomografia por emissão de pósitrons ("PET"), substâncias quimiluminescentes, como luciferina e marcadores enzimáticos, como peroxidase, ou fosfatase.
- 5 Emissores de radiação de curto alcance, tais como isótopos detectáveis por sondas detectoras de curto alcance, também podem ser empregados. Os anticorpos podem ser marcados com tais reagentes, se utilizando técnicas conhecidas. Por exemplo, ver Wensel e Meares, 1983, *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York, para técnicas relacionadas com radio-marcção de anticorpos e
- 10 D. Colcher et al., 1986, *Meth. Enzymol.* 121: 802 816.

Um anticorpo radio-marcado também pode ser usado em testes de diagnóstico *in vitro*. A atividade específica de um anticorpo marcado isotopicamente depende da meia vida, da pureza isotópica do marcador radioativo e de como o marcador é incorporado ao anticorpo.

- 15 Os procedimentos de marcação de polipeptídeos com isótopos radioativos (como  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{131}\text{I}$ ) geralmente são conhecidos. Por exemplo, os procedimentos de marcação por trítio são descritos na Patente U.S. nº 4.302.438. Os procedimentos de iodação, marcação por trítio e marcação por  $^{35}\text{S}$ , por exemplo, conforme adaptados para anticorpos monoclonais murinos, são descritos,
- 20 por exemplo, por Goding, J.W. (*Monoclonal antibodies : principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology* 2nd ed. London ; Orlando : Academic Press, 1986. pp 124 126) e as referências citadas nele. Outros procedimentos para polipeptídeos de iodação, tais como anticorpos, são descritos por Hunter e Greenwood, 1962, *Nature* 144:945,
- 25 David et al., 1974, *Biochemistry* 13:1014 1021 e Patente U.S. N°s. 3.867.517 e 4.376.110. Os elementos de radio-marciação que são úteis no imageamento são  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  e  $^{99m}\text{Tc}$ , por exemplo. Os procedimentos de iodação de anticorpos são descritos por Greenwood, F. et al., 1963, *Biochem. J.* 89:114 123; Marchalonis, J., 1969, *Biochem. J.* 113:299 305; e Morrison, M. et al., 1971, *Immunochemistry* 289
- 30 297. Os procedimentos para marcação de  $^{99m}\text{Tc}$  são descritos por Rhodes, B. et al. em Burchiel, S. et al. (eds.), *Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer*, New York: Masson 111 123 (1982) e as referências citadas nele. Os procedimentos adequados para marcação de anticorpos por  $^{111}\text{In}$  são descritos por Hnatowich, D.J. et al., 1983, *J. Immunol. Methods*, 65:147 157, Hnatowich, D. et al.,
- 35 1984, *J. Applied Radiation*, 35:554 557 e Buckley, R. G. et al., 1984, *F.E.B.S.* 166:202 204.

No caso de um anticorpo radio-marcado, o anticorpo é administrado ao paciente, é localizado para células portadoras do antígeno com o qual o anticorpo reage e é detectado ou "mapeado" in vivo, utilizando técnicas conhecidas, como varredura radionuclear usando, por exemplo, uma câmera gama ou tomografia por emissão. Ver, por exemplo, A.R. Bradwell et al., "*Developments in Antibody Imaging*", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al., (eds.), pp 65 85 (Academic Press 1985). Alternativamente, um scanner de tomografia transaxial por emissão de pósitrons, como Pet VI designado, localizado no Laboratório Nacional Brookhaven, pode ser usado onde a radioatividade emite pósitrons (por exemplo,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$  e  $^{13}\text{N}$ ).

**Agentes de Contraste MRI.** O Imageamento por Ressonância Magnética (MRI) utiliza NMR para visualizar as características internas de um indivíduo vivo e é útil para prognóstico, diagnóstico, tratamento e cirurgia. O MRI pode ser usado sem compostos marcadores radioativos, para benefício óbvio. Algumas técnicas de MRI são resumidas em EP-A-0 502 814. Geralmente, as diferenças em relação às constantes de tempo de relaxamento T1 e T2 dos prótons da água em diferentes ambientes são utilizadas para gerar uma imagem. No entanto, essas diferenças podem ser insuficientes para fornecer imagens nítidas de alta resolução.

As diferenças entre estas constantes de tempo de relaxamento podem ser estimuladas por agentes de contraste. Exemplos de tais agentes de contraste incluem um número de agentes magnéticos, agentes paramagnéticos (que basicamente alteram T1) e ferromagnéticos, ou super-paramagnéticos (que basicamente alteram a resposta de T2). Quelatos (por exemplo, quelatos EDTA, DTPA e NTA) podem ser usados para anexar (e reduzir a toxicidade) algumas substâncias paramagnéticas (por exemplo,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Gd}^{+3}$ ). Outros agentes podem estar na forma de partículas (por exemplo, de menos de 10 nm até cerca de 10 nM de diâmetro). As partículas podem ter propriedades ferromagnéticas, anti-ferromagnéticas, ou super-paramagnéticas. As partículas podem incluir, por exemplo, magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ),  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , ferritas e outros compostos minerais magnéticos de elementos de transição. As partículas magnéticas podem incluir: um ou mais cristais magnéticos, com e sem material não magnético. O material não magnético pode incluir polímeros sintéticos ou naturais (como sefarese, dextrano, dexrina, amido e similares).

O anticorpo FcRn de ligação também pode ser marcado com um grupo de indicação que contém o átomo NMR ativo  $^{19}\text{F}$ , ou uma série desses átomos, na medida em que (i) substancialmente todos os átomos de flúor naturalmente

abundantes sejam o isótopo  $^{19}\text{F}$  e, assim, substancialmente todos os compostos que contêm flúor sejam NMR ativos; (ii) muitos compostos polifluorados quimicamente ativos, como anidrido trifluoracético, estão comercialmente disponíveis, a custo relativamente baixo; e (iii) muitos compostos fluorados têm sido considerados clinicamente aceitáveis para uso em humanos, assim como os poliéteres perfluorados utilizados para transportar o oxigênio como substitutos de hemoglobina. Após permitir esse tempo para incubação, um MRI de corpo inteiro é realizado usando-se um aparato como um daqueles descritos por Pykett, 1982, *Sci. Am.* 246:78 88 para localizar e mapear tecidos que expressam FcRn.

A divulgação também inclui kits compreendendo um anticorpo que se liga a FcRn e instruções para uso em diagnóstico, por exemplo, uso do anticorpo FcRn de ligação, ou de um fragmento de ligação de antígeno do mesmo, para detectar FcRn, *in vitro*, por exemplo, em uma amostra, por exemplo, uma biópsia, ou células de um paciente com uma doença autoimune, ou *in vivo*, por exemplo, pelo imageamento de um indivíduo. O kit pode ainda conter pelo menos um reagente adicional, como um marcador, ou agente de diagnóstico adicional. Para uso *in vivo*, o anticorpo pode ser formulado como uma composição farmacêutica.

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos, que de maneira nenhuma devem ser interpretados como limitações. Todo o conteúdo de todas as referências (incluindo referências bibliográficas, patentes emitidas, pedidos de patente publicados e pedidos de patentes co-pendentes) citadas ao longo deste depósito é expressamente incorporado aqui por referência, em particular para o preceito que é mencionado acima.

#### EXEMPLOS

**Exemplo 1: Clonando FcRn, FcRn-GPI e  $\beta_2\text{M}$**

A construção de FcRn cDNA de comprimento total utilizada para estes exemplos foi originalmente feita em *Simister lab* (Universidade *Brandeis*, *Waltham MA*) usando pcDNA6 (*Invitrogen*, *Carlsbad, CA*) como o vetor de plasmídeo (FcRn:pcDNA6). A construção  $\beta 2\text{m}$  cDNA humano utilizada para estes exemplos foi originalmente feita em *Blumberg lab* (Faculdade de Medicina de *Harvard*, *Boston, MA*) usando pcDNA3 (*Invitrogen*) como o vetor de plasmídeo ( $\beta 2\text{M}$ :pcDNA3).

Os plasmídeos foram transfetados em *E. coli One Shot TOP10* quimicamente competente (*Invitrogen*, *Carlsbad, CA*) de acordo com as instruções do fabricante. Uma única colônia foi colhida a partir de cada uma das placas transformadas, inoculado em 500-1.000 ml de meio LB e cultivada durante a noite em um agitador. O DNA plasmidial foi purificado a partir destas culturas com *Maxi*

*Prep kit (Qiagen, Valencia, CA).* A construção plasmidial pcDNA6 hFcRn de comprimento total foi digerida com Nhe1 e Xba1. A construção plasmidial pCDNA3.1- $\beta$ 2-M foi digerida com Hind III e Xba 1. A construção plasmidial pCDNA6-hFcRn-GPI foi digerida com Nhe1 e Xba 1. Os produtos digeridos foram dissolvidos

5 em um gel de agarose 1% para verificar se o tamanho da inserção foi correto. O tamanho correto para FcRn e GPI-FcRn de comprimento inteiro foi de cerca de 1kb de comprimento.  $\beta$ 2M humano foi de cerca de 0,4kb em comprimento. O DNA plasmidial (4 mg/ml em etanol) foi diluído a 2mg/ml em DPBS estéril (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) antes da injeção intra-muscular.

10 **EXEMPLO 2: IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM DNA PLASMIDIAL DE CODIFICAÇÃO FcRN**

Camundongos Balb/c foram tratados com 100  $\mu$ l de cardiotoxina 10 mM (*Calbiochem, San Diego*) 5 dias antes da injeção de DNA plasmidial. O tratamento com cardiotoxina foi utilizado para provocar uma resposta inflamatória e recrutar 15 células apresentadoras de抗ígenos (por exemplo, células dendríticas) para a área injetada, melhorando assim a apresentação de抗ígenos quando a proteína codificada pelo plasmídio foi expressa.

100  $\mu$ g de construção plasmidial ou GPI-hFcRn de comprimento inteiro resuspensa em 50  $\mu$ l de PBS foram injetadas no músculo tibial anterior dos 20 camundongos. Camundongos imunizados com a combinação de hFcRn e  $\beta$ 2M receberam uma dose de 50  $\mu$ g de plasmídeo hFcRn em 25  $\mu$ l PBS e 50  $\mu$ g de plasmídeo  $\beta$ 2M em 25  $\mu$ l PBS. Todas as injeções intra-musculares foram realizadas sob anestesia sistêmica com pentobarbital (50 mg/kg, intraperitonealmente) ou 25 cetamina (100 mg/kg)/xilazina (10 mg/kg). Os animais foram estimulados com injeções adicionais de DNA plasmidial hFcRn aos 21 e 42 dias após a primeira imunização, utilizando a mesma dose e volume usados para a primeira injeção.

Os camundongos também foram estimulados com a forma solúvel do hFcRn recombinante (shFcRn, 100  $\mu$ g/camundongo, intraperitonealmente) no dia 76 após a imunização inicial. Em seguida, 30 a 50  $\mu$ l dos soros foram obtidos por sangria das 30 veias da cauda, 56 e 94 dias após a imunização inicial. Os soros foram então testados para títulos de anticorpos, conforme descrito abaixo, no Exemplo 3. Além disso, o camundongo número 182 recebeu um estímulo intravenoso (IV) com shFcRn recombinante (50  $\mu$ g/camundongo) nos dias 129, 130 e 131 antes da fusão. No dia 132, células do baço do camundongo número 182 foram fundidas com NS-1 35 ou células de mieloma SP2/0 (ATCC, Manassas, VA), conforme descrito abaixo no Exemplo 4. Cerca de 35 linhas de hibridoma mAB específico anti-FcRn humano

foram geradas a partir desta fusão.

O camundongo número 187 foi ainda estimulado IV com 50 µg de shFcRn recombinante nos dias 276, 277 e 278 após a imunização inicial. No dia 279, as células do baço de 187 foram fundidas com células de mieloma SP2/0, conforme

descrito abaixo no Exemplo 4. 10% das fusões resultantes foram laqueadas em onze placas de 96 poços. Os 90% restantes das fusões foram armazenados em nitrogênio líquido. A partir das fusões laqueadas, 35 linhas que secretam mAB que reconhece hFcRn foram geradas. O protocolo de imunização está resumido na

**Tabela 2.**

10 **TABELA 2: PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO**

**EXEMPLO 3: TÍTULOS DE ANTICORPO EM SORO DE CAMUNDONGOS**

Títulos anti-hFcRn e anti-β<sub>2</sub>M em soro de camundongos foram medidos por

Vacinação	Nº de camundongos	Dia 5	Dia 0	Dia 21	Dia 42	Dia 56	Dia 76	Dia 94	Dia 129-131 #182	Dia 132 #182	Dia 276-278 #187	Dia 279 #187
FL-FcRn-DNA Human o	5	Tratamento com cardio toxina	Imunização	Estímulo	Estímulo	1º teste de soro	Estímulo IP com shFcRn	2º teste de soro	Estímulo diário com shFcRn IV	Fusá o		
FL-FcRn DNA Human o + beta 2M DNA Human o	5	Tratamento com cardio toxina	Imunização	Estímulo	Estímulo	Teste de soro	Estímulo IP com shFcRn	Teste de soro			Estímulo diário com shFcRn IV	Fusão
GPI-FcRn DNA Human o	5	Tratamento com cardio toxina	Imunização	Estímulo	Estímulo	Teste de soro	Estímulo IP com shFcRn	Teste de soro				
GPI-FcRn Human o + beta 2M DNA Human o	5	Tratamento com cardio toxina	Imunização	Estímulo	Estímulo	Teste de soro	Estímulo IP com shFcRn	Teste de soro				
Nenhum DNA	5	Tratamento com cardio toxina				Teste de soro		Teste de soro				

ELISA. As placas ELISA foram revestidas com 2 µg/ml de hFcRn solúvel ou h $\beta_2$ M (*Sigma, St. Louis, MO*) em tampão de revestimento ELISA (*Sigma, St. Louis, MO*). As placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora. As placas foram lavadas duas vezes com PBS+0,05% Tween (PBST). As placas foram bloqueadas com gelatina de peixe 5 1% em PBS por 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas duas vezes com PBST. Soro de camundongo diluído em série (em PBS) foi adicionado (100 µl/poço) e incubado por 2 horas a 37 °C. As placas foram lavadas 5 vezes com PBST. anti-IgG-HRP de camundongo de cabra (*Pierce, Rockford, IL*), em diluição de 1 a 10.000 diluição foi adicionado às placas e incubado durante 1 hora à temperatura ambiente.

10 As placas foram lavadas 5 vezes com PBST. Solução de tetrametilbenzidina (TMB) (*KPL, Gaithersburg, MD*) foi adicionada às placas para o desenvolvimento de cor. A reação do substrato foi interrompida após aproximadamente 5 minutos, quando a cor adequada se desenvolveu. As placas foram lidas a 450 nM em um leitor de microplacas (*Bio-Rad, Hercules, CA*). O soro foi testado em todos os ratos no Dia 56

15 (Figura 1). Os ratos com soro reativo com hFcRn foram testados novamente no Dia 94 e os títulos séricos são mostrados na Figura 2.

#### **EXEMPLO 4: FUSÕES DE HIBRIDOMA**

O camundongo 182 e o camundongo 187 foram selecionados para fazer fusões de hibridoma. Os baços de ambos os camundongos foram removidos e suspensões de células únicas do baço foram preparadas separando-se os baços, 20 seguido por pipetagem repetida com 10 ml de meio DMEM (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). As células do baço foram centrifugadas a 500g por 5 minutos. As hemárias foram lisadas por ressuspensão das células do baço em 2 ml de tampão de lise ACK (8.29 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub>, 37.2 mg Na<sub>2</sub>EDTA, H<sub>2</sub>O para um volume final 25 de 1 litro, pH 7.2-7.4). As células foram incubadas no gelo por 5 minutos. As células tratadas em tampão ACK foram lavadas três vezes com DMEM. O número total de células do baço obtidas do camundongo 182 foi de 216x10<sup>6</sup>. Metade das células foi fundida com 70x10<sup>6</sup> células de mieloma SP2/0 e a outra metade foi fundida com 27x10<sup>6</sup> células NS-1.

30 A fusão #182 foi realizada de acordo com o método descrito em *Current Protocol of Immunology Unit 2.5*, Wayne M. Yokoyama, Editora: *John Wiley and Son Inc.* Versão eletrônica. As células SP2/0 fundidas foram diluídas em 314 ml de meio HAT e semeadas em 16,5 placas (placa de 96 poços, 0.2ml/poço). As células fundidas NS-1 foram diluídas em 216 ml meio HAT e semeadas em 11 placas (placa 35 de 96 poços, 0,2 ml/poço).

Na fusão #187, 2x108 células do baço foram fundidas com 8x107 células de

mieloma SP2/0, usando um protocolo de "Anticorpos Monoclonais", editado por J.H. Peters e Baumgarten H., publicado por *Springer-Verlag*, 1992, Página 149-156. New York.

Nos dias 2, 3, 4, 5, 7, 9 após a fusão, metade do meio HAT foi substituído por meio HAT fresco. Uma a duas semanas após a fusão, as células de hibridoma dos poços positivos (determinadas pelo crescimento claro sob microscópio e pela inspeção a olho nu) foram transferidas para 24 placas de cultura de poços. Dentro de 2 semanas depois da fusão, as células de hibridoma foram cultivadas em meio HAT contendo meio completo. No Dia 16, as células foram transferidas para CDMEM sem HAT.

Quando o meio ficou ligeiramente amarelado, uma alíquota do sobrenadante foi colhida e selecionada para atividade anti-hFcRn por ELISA, conforme descrito no Exemplo 3. Um total de 384 linhas de hibridoma de SP2/0 - fusão celular do baço #182 foram avaliadas. Um total de 60 linhas de hibridoma de NS-1 - fusão celular do baço # 182 foram selecionadas. Os sobrenadantes das 31 linhas de fusão SP2/0 testaram positivo pelo método ELISA por reatividade anti-hFcRn. Os sobrenadantes das 8 linhas de hibridoma de fusão NS-1 testaram positivo pelo método ELISA para reatividade anti-hFcRn. Um total de 16 linhas de hibridoma da fusão # 182 foram clonadas por diluição limitante e 3 subclones de cada linhagem foram selecionados para caracterização adicional.

#### **EXEMPLO 5: CLONAGEM DE HIBRIDOMA**

O meio de clonagem de hibridoma foi preparado da seguinte forma: 12,5 ml de solução de tampão HEPES (100x/1M) (*Invitrogen, Carlsbad, CA*), 5 ml de piruvato de sódio (100x/100mM) (*Invitrogen, Carlsbad, CA*), 5 ml de penicilina/estreptomicina (100x/10.000 unidades) (*Invitrogen, Carlsbad, CA*), 5 ml de aminoácidos não essenciais (100x/100mM) (*Invitrogen, Carlsbad, CA*), 5 ml de L-glutamina (100x/200 mM) (*Invitrogen, Carlsbad, CA*), 0,5 ml de 2-mercaptopetanol (1.000x/5,5x10<sup>-2</sup> M) (*Invitrogen, Carlsbad, CA*), 100 ml FBS (pré-filtrado para o crescimento de hibridoma) (*Cambrex, East Rutherford, NJ*) e 50 ml de fator de clonagem de hibridoma (*ICN, Irvine, CA*) foram adicionados a 317 ml de glicose alta DMEM (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). O meio foi filtrado por um filtro de 0,22 µm e armazenado a 4 °C.

Dois dias antes da clonagem, o meio de cultura cDMEM foi substituído por um meio de clonagem de hibridoma. No dia da clonagem, as células foram lavadas uma vez em DMEM e contadas. As células foram ressuspensas em meio de clonagem a uma concentração variada de 1x10<sup>5</sup>-1x10<sup>6</sup>/ml. 3.000, 300 ou 100 células foram

transferidas para 20ml de meio de clonagem, para fazer uma concentração de 150 células/ml, 15 células/ml, ou 3 células/ml. As células foram então transferidas para três placas individuais (uma para cada concentração de célula) de uma placa de 96 poços. Cada poço tem um volume final de 0,2 ml. As placas foram incubadas a 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> por 1 a 2 semanas, quando os poços positivos foram contados. 20-30 clones foram selecionados a partir de placas com o mínimo de poços positivos e expendidos em placas de 24 poços. Os sobrenadantes foram testados por método ELISA anti-FcRn, conforme descrito no Exemplo 3, para reatividade a FcRn solúvel.

**EXEMPLO 6: ENSAIO DE COMPETIÇÃO DE CÉLULAS USANDO SOBRENADANTES**

## **10 MAB ESPECÍFICOS PARA FcRN**

## A. MARCAÇÃO DE SYNAGIS® COM ALEXA FLÚOR-488

*Synagis®* (IgG1 humanizado, *MedImmune, Gaithersburg, MD*) foi marcado com o Kit de Marcação de Proteína Alexa Flúor 488 (*Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA*), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Brevemente, 50 µl de 1 M bicarbonato de sódio, pH 9,0 foi adicionado a 500 µl de 2 mg/ml de solução de IgG em PBS. Esta solução de proteína foi então adicionada ao succinimidil-éster Alexa Flúor 488 (em pó) e incubada em temperatura ambiente por 1 hora. A proteína foi purificada por cromatografia de exclusão por tamanho, usando a coluna componente do kit (resina de purificação de exclusão por tamanho *Bio-Rad BioGel P-30 Fine*). A amostra foi carregada na coluna e eluída com PBS. A primeira banda colorida continha a proteína marcada. O grau de marcação foi determinado pela medição da absorbância de IgG eluído em A280 e A494. A concentração molar da proteína foi determinada usando-se a fórmula:

$$(M) = [A_{280} - (A_{494} \times 0.11)] \times \text{fator de diluição}$$

Além disso, a fórmula utilizada para derivar os mols do corante por mol de proteína foi:

$$(M) = \underline{A_{494} \times \text{fator de diluição}}$$

71.000 x concentração de proteína

Normalmente, 4 a 7 mols de Alexa Flúor 488 foram incorporados por mol de IgG.

## B. ENSAIO DE COMPETIÇÃO CELULAR COM SOBRENADANTES ESPECÍFICOS PARA FcRN

Células 293 C11 que expressam hFcRn e  $\beta_2$ M humano foram usadas para testar sobrenadantes FcRn mAB em um ensaio de competição com IgG1 com marcação fluorescente. 300.000 células 293 C11 foram lavadas em PBS e

peletizadas em uma micro centrífuga de mesa a 2.500 RPM por 5 minutos. As células peletizadas foram ressuspensas em 100-200  $\mu$ l do sobrenadante dos clones produtores de MABs específicos para FcRn e incubadas em gelo por 60 a 90 minutos. As células foram lavadas duas vezes com tampão de ligação (PBS pH 6,0  
 5 10 mM EDTA). As células foram ressuspensas em 100  $\mu$ l de tampão de ligação. hIgG1 marcado com Alexa Flúor 488 (*Molecular Probes, Eugene, OR*) foi preparado usando-se um kit (*Molecular Probes, Eugene, OR*) de acordo com as instruções do fabricante e adicionado a cada tubo (100 nM em 0.6-1.5  $\mu$ l). As células foram incubadas por 40 minutos no gelo. As células foram lavadas uma vez em tampão de  
 10 ligação e analisadas pelo separador de células ativado pela fluorescência (FACS), usando o software EXPO.32 (*Beckman Coulter, Inc., Miami, FL*). Os resultados são apresentados como intensidade de fluorescência média total (TMFI).

A **Figura 3** mostra os resultados das fusões de 182. Se a TMFI do tubo de controle (Alexa Flúor 488 sozinho e sem competidor) for superior à TMFI do tubo contendo o competidor (sup mAB), a taxa de inibição foi calculada da seguinte forma:  
 15

$$\frac{\text{TMFI do tubo de controle} - \text{TMFI do tubo contendo o competidor}}{\text{TMFI do tubo de controle}}$$

Se a TMFI do tubo de controle for menor do que a TMFI do tubo contendo o  
 20 competidor, há um aumento da ligação de hIgG1 com as células que expressam FcRn. O aumento foi calculado da seguinte forma:

$$\frac{\text{TMFI do tubo contendo o competidor} - \text{TMFI do tubo de controle}}{\text{TMFI do tubo de controle}}$$

A **Figura 4** descreve os resultados da fusão 187. A TMFI foi calculada como a  
 25 fração de células na região bloqueada, multiplicada pela fluorescência média na região. Os resultados de um experimento indicaram que 11 dos sobrenadantes testados inibiram IgG1 marcado com Alexa Flúor 188 que se liga a células 293 C11, ao passo em que 4 dos sobrenadantes aumentaram a ligação de IgG1 marcado com Alexa Flúor 188 que se liga a 293C11 (**Figura 4A**). Os resultados de um segundo  
 30 experimento indicaram que 3 sobrenadantes inibiram IgG1 que se liga a células 293 C11, ao passo em que 5 sobrenadantes aumentaram a ligação (**Figura 4B**).

#### **EXEMPLO 7: ENSAIO DE COMPETIÇÃO CELULAR USANDO MABs PURIFICADOS ESPECÍFICOS PARA FcRN**

Células 293 C11 que expressam hFcRn e  $\beta_2$ M humano foram usadas para  
 35 testar sobrenadantes mAB FcRn em um ensaio de competição com IgG1 marcada com fluorescência. As células foram lavadas uma vez com tampão de ligação (PBS

pH 6,0, 10 mM EDTA) e peletizadas a 1.800 RPM, 4 °C em uma centrífuga de mesa. As células foram aliquotadas em tubos de micro centrífuga (tampão de ligação 1-3x10<sup>5</sup>/frasco/ml). As células foram peletizadas em uma micro centrífuga a 2.500 RPM, por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* celular foi ressuspensos em 100 µl do tampão de ligação. MABs purificados específicos para FcRn foram adicionados a várias concentrações. IgG marcado com Alexa Flúor 488 (*Molecular Probes, Eugene, OR*) foi adicionado a uma concentração de 100 nM (concentração final) para cada tubo. As amostras foram incubadas a 4 °C por 40 minutos. As amostras foram lavadas uma vez com tampão de ligação e ressuspensas em tampão de ligação para análise FACS (*Beckman Coulter, Inc., Miami, FL*). Antes da análise da amostra, o FACS foi equilibrado com tampão de ligação. Os resultados são apresentados como intensidade de fluorescência média total (TMFI). A TMFI foi calculada como a porcentagem de células na região bloqueada x a fluorescência média na região. Os resultados indicaram que mAB 3B3,11, mAB 4B4,12, mAB31,1 e mAB 4,13 inibiram a IgG1 que se liga a células 293 C11 significativamente (**Figura 5**).

#### **EXEMPLO 8: MARCAÇÃO DE SUPERFÍCIE CELULAR PARA FcRN USANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS**

A expressão de superfície de FcRn usando mABs foi detectada por FACS. Fibroblastos de ratos (expressando FcRn de ratos/ β<sub>2</sub>M de ratos) células 293 C11 (expressando hFcRn/β<sub>2</sub>M humano), células 3T3 FcRn (expressando FcRn murino/β<sub>2</sub>M murino) e células COS transfectadas com plasmídeo pCDNA6 que codifica FcRN de macacos/β<sub>2</sub>M foram estudados. Uma micro centrífuga foi usada para peletizar 1-3x10<sup>5</sup> de cada tipo de célula. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 1 µg do mAB marcado com Alexa 488 (*Molecular Probes, Eugene, OR*) em um volume final de 100 µl de PBS/1% de albumina de soro bovino (pH 7.4). MABs purificados específicos para FcRn foram previamente marcados com Alexa Flúor 488 (*Molecular Probes, Eugene, OR*), utilizando o Kit de Marcação de Proteína com Alexa Fluor (*Molecular Probes, Eugene, OR*), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas em gelo por 45 minutos e depois lavadas uma vez com PBS/1% de albumina de soro bovino (pH 7,2). A análise FACS foi realizada utilizando-se FACS *Beckman Coulter, Inc.* (*Beckman Coulter, Inc., Miami, FL*). Os resultados são apresentados nas **Figuras 6, 7 e 8**. A **Figura 6** mostra que mABs 3B3,11, 31,1, 4,13, 4B.12 e 15B6.1, todos reconheceram o hFcRn expresso na superfície celular das células 293 C11. A **Figura 7** mostra que mABs 4,13 e 4B4,12 também reconheceram o FcRn de ratos expresso na superfície

de células que expressam FcRn de ratos, enquanto mABs 3B3,11 e 31,1 não reagiram de forma cruzada com FcRn de ratos. A Figura 8 mostra que mABs 3B3,11, 4B4,12 e 4,13 reconheceram o FcRn murino expresso na superfície celular das células 3T3 de camundongos, enquanto 15B6,1 e 31,1 não reagiram de forma cruzada.

#### **EXEMPLO 9: SUBCLONAGEM DE LINHAS DE CÉLULAS DE HIBRIDOMA VARIADAS**

Hibridomas do camundongo 187 foram selecionados para subclonagem. Os hibridomas 6A4, 6A1, 5A4, 7D2, 4B4, 3C5, 3B3, 10B4, 1C1 e 11A5 foram selecionados para subclonagem. A subclonagem foi realizada por diluição limitante. Os clones 3B5 secretam anticorpos anti-h $\beta$ 2M. Entre 20 e 30 subclones foram cultivados e os sobrenadantes das culturas foram testados por método ELISA, conforme descrito no Exemplo 3. As culturas de clones positivos de 2 a 10 foram ampliadas em frascos T150 (4 frascos por clone). Um total de 350 a 400 ml de sobrenadante foi colhido para purificação de mAB. O rendimento de mAB a partir de cada clone variou de 3 a 20 mg. Os mABs purificados foram testados para bloqueio de FcRn utilizando-se o ensaio de competição 293 C11, tal como descrito no Exemplo 7. Os mABs foram titulados duplamente, de 1.000 nM para 16 nM, para o ensaio de competição. Um resumo dos resultados obtidos para os subclones de 187 e os clones de 182 é apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3. Caracterização de mABs da fusão #182 e da fusão #187**

Clones	ELISA (shFcRn)	Teste de bloqueio (sup) % de inibição	Isotipagem de IgG	Bloqueio (purificado) % Inibição
<b>fusões #182</b>				
4,13	+	>50	IgG1	90
15B6,1	++	>50	IgG2a	
14C5,3	+	>40	IgG2a	
31,1	+	>40	IgG1	93
3C6,2	+	>35	IgG2a	74
<b>fusão #187</b>				
3B3,11	++	>60	IgG1	92
3B3,16	++	>60	IgG1	73
3B3,21	++++	>60	IgG1	84
3B3,35	++	>60	IgG1	86
6A4,1	+	>40	IgG1	42
6A4,4	+	>40	IgG1	52
6A4,16	+	>40	IgG1	65
6A4,17	+	>40	IgG1	42
6A1,12	+	21	IgG1 IgG2a	35

6A1,13	+	25	IgG2a	39
6A1,29	+	33	IgG2a	81
3B5,2 (@β2m)	+++	71	IgG2a	90
3B5,4(@β2m)	+++	79	IgG2a	52
3B5,5(@β2m)	+++	63	IgG2a	
3B5,9(@β2m)	+++	71	IgG2a	80
7D2,13	+	49	IgG1 IgG2a	11
7D2,21	++	43		
7D2,22	+	49	IgG1 IgG2a	43
7D2,27	+	46	IgG1	52
5A4,9	+	57		
5A4,10	+	49	IgG1	63
5A4,25	+	54	IgG1	31
5A4,27	+	51		39
5A4,38	+	43		15
5A4,39	+	49		20
5A4,40	+	53		30
5A4,41	+	66		35
5A4,42	+	72		
4B4,1	++	70	IgG2a	
4B4,2	++	66	IgG2a	69
<b>4B4,12</b>	++	<b>70</b>	<b>IgG2a</b>	<b>71</b>
4B4,13	++	66	IgG2a	60
3C5,10	+	30		
3C5,11	+	40		
3C5,14	+	40		
3C5,16	+	33		
10B4,5	+++	23		54
10B4,9	++	23		31
1C1,7	+++	32	IgG1	23
1C1,22	+++	27	IgG1	61
1C1,23	+++	32	IgG1	27
1C1,25	++	32	IgG1	38
11A5,5	+++	49	IgG1	13
11A5,9	+	43		
11A5,11	+	45		
11A5,12	+	51	IgG1/IgG2a	76

### **EXEMPLO 10: MARCAÇÃO INTRACELULAR DE FcRN**

Células THP-1 (uma linhagem celular monocítica humana) e células Caco-2 (uma linhagem celular do epitélio intestinal humano) foram estudadas por marcação intracelular de FcRn usando anticorpos monoclonais purificados (mABs) específicos para FcRn. Aliquotas de 300.000 células/tubo de células THP-1 ou Caco-2 foram peletizadas e ressuspensas em 250 µl de *BD Cytofix/Cytoperm* (*BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA*). As células foram lavadas duas vezes com 1 ml de BD Perm/solução de lavagem (*BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA*) e ressuspensas na mesma solução. MABs marcados com Alexa flúor 488 (*Molecular Probes, Eugene, OR*) (1 µg/tubo) foram adicionados às células e as células foram incubadas por 45 minutos no gelo. As células foram lavadas duas vezes com BD Perm/solução de lavagem (*BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA*) e ressuspensos em PBS/1% de albumina de soro bovino. As células foram analisadas por FACS (*Beckman Coulter, Inc., Miami, FL*). Os resultados são apresentados nas **Figuras 9 e 10** e indicam que mABs 3B3,11, 31,1, 4B4,12 e 15B6,1 todos se ligaram efetivamente a FcRn intra-cellular nas células THP-1 (**Figura 9**), ao passo em que o mAB 4,13 não. Resultados similares foram obtidos para as células Caco-2 (**Figura 10**).

### **EXEMPLO 11: MARCAÇÃO INTRACELULAR E DE SUPERFÍCIE DE CÉLULAS DO BAÇO DO CAMUNDONGO COM MABS ANTI-FcRN.**

Pinças foram utilizadas para separar as células do baço do camundongo. As células foram peletizadas e ressuspensas em tampão de lise ACK (8,29 g NH<sub>4</sub>Cl, 1g KHCO<sub>3</sub>, 37,2 mg Na<sub>2</sub>EDTA, H<sub>2</sub>O para um volume final de 1 litro, pH de 7,2 a 7,4) e incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. As células foram lavadas três vezes com DMEM/5% FBS (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). 1x10<sup>6</sup> células foram transferidas para um tubo de micro centrífuga e peletizadas em uma micro centrífuga de mesa. Para a marcação intracelular, uma etapa de fixação e permeabilização foi realizada, conforme descrito no Exemplo 10. As células foram ressuspensas em tampão de lavagem (PBS/1% BSA), contendo 20 µg/ml de anticorpo do camundongo isotípico de controle e incubadas no gelo por 20 minutos. As células foram peletizadas e mAbs marcados com Alexa 488 (*Molecular Probes, Eugene, OR*) (1 µg/tubo) em 100 µl de tampão de lavagem contendo 1 µg/ml de anticorpo de controle isotípico foi adicionado às células. As células foram incubadas em gelo por 40 minutos e depois lavadas duas vezes com tampão de lavagem. A dispersão foi fechada como uma população enriquecida com macrófagos/monócitos, utilizando software EXPO.32. Ao ajustar a dispersão progressiva e a dispersão de tamanho, a

população enriquecida com macrófagos/monócitos (população singular com tamanho grande e alta granulosidade) foi analisada. As células foram analisadas por FACS (*Beckman Coulter, Inc., Miami, FL*). Os resultados são apresentados na **Figura 11** e indicam que mAB 4B4,12 detectou FcRn de camundongos na superfície e no meio intracelular nas células do baço e em macrófagos/monócitos obtidos a partir da população de células do baço.

**EXEMPLO 12: EFEITO DE MAB 4B4,12 ANTI-FCRN NA RESPOSTA IMUNE**

Camundongos Balb/c fêmeas com 6 a 8 semanas de vida foram imunizados com 50 µl de uma emulsão de adjuvante de *Freund* completo misturado na proporção de 1:1 com ovalbumina. Os camundongos foram imunizados por via subcutânea, uma vez em cada lado do flanco, no dia 0 e estimulados no dia 10 com 100 µg de ovalbumina/camundongo. Os camundongos foram tratados através de injeção intraperitoneal de mAB 4B4,12 específico para FcRn, ou anticorpo do controle isotípico (1813; ATCC1813) (1 mg/ml em PBS/camundongo), ou PBS. Os tratamentos foram administrados no dia -1, dia 0, dia 1 e todos em todos os outros dias seguintes. Os camundongos foram sangrados no dia 9 para amostras de soro e sacrificados no dia 16. Uma retirada sérica máxima foi feita após a eutanásia. O protocolo é resumido abaixo na **Tabela 4**.

**Tabela 4: Protocolo de Tratamento**

G# do grupo	Tratamentos							
	Dia-1	Dia 0		Dia +1	Todos os outros dias	Dia +9	Dia +10	Dia +16
		IP	SC					
1	4B4,12	4B4,12	OVA+CFA	4B4,12	4B4,12	Sangria	OVA	Ensaios
2	1813	1813	OVA+CFA	1813	1813	Sangria	OVA	Ensaios
3	PBS	PBS	OVA+CFA	PBS	PBS	Sangria	OVA	Ensaios

Os baços e linfonodos de drenagem foram obtidos e pesados em uma balança analítica. Os resultados apresentados na **Figura 12** indicam que o peso de ambos o baço e o linfonodo de drenagem (inguinal) foi reduzido nos camundongos tratados com mAB 4B4,12 em comparação com os 2 controles.

O título do anticorpo de ovalbumina foi medido pelo método ELISA. Ovalbumina na concentração de 10 µg/ml foi revestida em placas de ELISA e bloqueada com PBS/1% BSA. Soro titulado (começando com 1 a 50, depois diluição dobrada de 2 µg/ml em PBS/1% BSA) e IgG1 de camundongo padrão (mAB de camundongo anti-OVA) foram adicionados às placas e incubados a 37 °C por 2 horas. anti-IgG-HRP de camundongo de cabra (*Pierce, Rockford, IL*) foi adicionado e as placas foram incubadas por 30 minutos. Solução de TMB (*KPL, Gaithersburg, MD*) foi adicionada e a cor desenvolvida. A densidade óptica foi medida em 450 nM,

usando um leitor de microplacas (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Os resultados são apresentados na **Figura 13** e demonstram que o mAB 4B4,12 reduziu significativamente a concentração sérica antiovalbumina.

**EXEMPLO 13: EFEITO DE 4B4,12 NO CATABOLISMO DE *SYNAGIS* EM CAMUNDONGOS**

5    **CD1**

Camundongos CD1 (n=4) (*Charles River Laboratories*) foram injetados intraperitonealmente com 1mg/kg de *Synagis*. 72 horas depois, 4B4,12, MIgG1, ou PBS foram injetados intraperitonealmente (20mg/kg). Após os dias 4, 6 e 10, o soro do camundongo foi obtido e a concentração de *Synagis* foi determinada pelo método 10 ELISA. O anticorpo anti-IgG humana (FAB')2 na concentração de 10 µg/ml em tampão de revestimento ELISA (Sigma) foi revestido em placas de ELISA a 37 °C, durante 1 hora. Após duas lavagens com PBST, as placas foram bloqueadas com PBS/2% BSA por 1 hora a 37 °C. Após duas lavagens, as amostras de soro foram diluídas duplamente, começando a uma diluição de 1 a 50 e adicionadas às placas 15 em duplicatas (100 µl/poço). As placas foram incubadas por 2 horas a 37 °C. Após três lavagens com PBST, o conjugado HRP de anti-IgG Fc humano de cabra Fc foi adicionado às placas e incubado em temperatura ambiente por 40 minutos. Após 4 lavagens com PBST, substratos de TMB (KPL) foram adicionados às placas e 20 incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. A reação de cor foi interrompida com a solução (KPL) e as placas foram lidas em um leitor de microplacas (*Molecular Devices*).

Os resultados no dia 4 são apresentados na **Figura 14** e demonstram que o mAB 4B4,12 aumenta o catabolismo de *Synagis* em relação aos anticorpos do controle MIgG2a ou PBS. A concentração de *Synagis* depois de mais de 10 dias em 25 três grupos de tratamento está representada na **Figura 15** e demonstra que mAB 4B4,12 aumentou o catabolismo de *Synagis* consistentemente ao longo do dia 4 ao dia 10, quando comparado com MIgG2a ou PBS.

**EXEMPLO 14: EFEITO TERAPÉUTICO DE MAB 4B4,12 EM UM MODELO MURINO PARA DOENÇA AUTOIMUNE**

30    A doença autoimune experimental, *myasthenia gravis* (EAMG), pode ser induzida em ratos por meio da transferência passiva de mAB35 anti-AchR (*Socrates et al. Journal of Neuroimmunology. 15:185-194 (1987)*). O anticorpo monoclonal 4B4,12 que reage de forma cruzada com FcRn murino foi avaliado por sua capacidade de produzir o estado da doença no modelo murino EAMG.

35    Ratas fêmeas *Lewis* com 4 a 5 semanas de vida (75 a 100 g) foram utilizados. Os ratos foram marcados claramente. Os anticorpos monoclonais foram

administrados intraperitonealmente, 24 horas antes da indução da doença, no dia de indução da doença e 24 horas após a indução da doença. No dia de indução da doença, mABs de bloqueio de FcRn ou controle receberam a primeira injeção intraperitoneal, seguida pela injeção intraperitoneal de mAB35 duas horas depois. O

- 5 volume de injeção foi de 1 ml. Três grupos (6 ratos/grupo) de ratos foram usados para o experimento: o grupo 1 foi tratado com MAB 4B4,12, o grupo 2 foi tratado com 1.813 (mAB de controle), o grupo 3 foi tratado com PBS. 48 horas após a indução da doença, 100 µl de soro foi obtido de cada rato, para a medição de mAB35 e mABs murinos. O protocolo está resumido na **Tabela 5**.

10 **Tabela 5: Protocolo de Tratamento**

# do Grupo	Tratamentos			Amostras
	Dia -1	Dia 0	Dia +1	
1	4B4.12 40mg/kg IP lot 2 – 4.98mg/ml	4B4.12 IP seguido (2h depois) por mAB35 IP	4B4.12 40mg/kg IP	Sangria para soro
2	1813 40mg/kg IP lot 2 – 4.67mg/ml	1813 IP seguido (2h depois) por mAB35 IP	1813 40mg/kg IP	Sangria para soro
5	PBS	PBS seguido (2h depois) por mAB35 IP	PBS	Sangria para soro

Os ratos foram observados quanto aos sinais da doença duas vezes ao dia, 12 horas após a indução da doença. O seguinte sistema de pontuação foi utilizado: Grau 0, nenhum sintoma; (1) pouca força, cansaço e, algumas vezes, respiração ofegante; (2) fraqueza geral, postura curvada em repouso, diminuição do peso corporal, tremores; (3) fraqueza severa, moribundo; e (4) morte. O protocolo é resumido na **Tabela 5**. Os resultados são apresentados na **Tabela 6** e na **Figura 16** e demonstram que mAB 4B4,12 diminuiu a gravidade da doença no modelo EAMG.

20 **Tabela 6: Estado da Doença**

Grupo	Sem doença	Doença
4B4,12	2	4
1813 (mIgG2a)	0	6
PBS	0	6

A perda de peso ou o ganho de peso foram determinados para ratos em cada 25 um dos grupos experimentais. Os resultados são apresentados na **Tabela 7** e na **Figura 17** e demonstram que os ratos tratados com mAB 4B4,12 perderam menos peso do que os grupos de controle correspondentes.

**Tabela 7: Alteração de Peso**

Grupo	Peso ganho	Peso perdido
4B4,12	3	3
1813 (mIgG2a)	0	6
PBS	1	5

**EXEMPLO 15: EFEITO DE ANTICORPOS DA INVENÇÃO NO CATABOLISMO DE IgG HUMANA EM CAMUNDONGOS TG32B**

Camundongos TG32B adultos foram injetados por via intravenosa com 5 mg/kg de biotina hIgG e 495 mg/kg de IgG humana (*MP Biomedicals, Irvine, CA*) em t = 0 horas (T<sub>0</sub>). Em seguida, às 24, 48, 72, 96 e 120 horas, os ratos foram injetados por via intravenosa com 50 mg/kg de um anticorpo da invenção. As injeções de controle foram realizadas em cada ponto de tempo usando PBS. Amostras de sangue foram tomadas antes das injeções, em todos os pontos de tempo, assim como em 168 horas. O soro foi preparado e armazenado a -20 °C, até que uma medição Biotina-ELISA hIgG foi realizada.

Placas revestidas com estreptavidina (*Pierce*) foram hidratadas com três lavagens (200 µl/poço) de PBST (PBS contendo 0,05% *Tween 20*). As amostras de soro e padrões foram diluídos em PBS contendo 2% BSA (tampão de diluição). As diluições da amostra foram de 1:10.000, 1:20.000, 1:30.000 e 1:40.000. O padrão foi diluído a partir de 200 ng/ml a 1,56 ng/ml em diluições dobradas. As placas foram incubadas a 37 °C por 2 horas, seguido de lavagem por três vezes com PBST. Em seguida, as placas foram incubadas com 100 µl/poço de conjugado HRP de anti-IgG Fc humano de cabra Fc (*Pierce*) diluído a 1:25.000 em tampão de diluição, a temperatura ambiente por 30 minutos. Após três lavagens em PBST, 100 µl de solução TMB (*BioFx*) foi adicionado às placas e as placas foram incubadas no escuro em temperatura ambiente, até que a cor adequada fosse desenvolvida (quando os poços do padrão mais alto ficassem azul escuro). Então, 100 µl/poço de 0.25M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi adicionado para interromper a reação de cor e OD foi medido em 450 nM.

Os resultados mostraram que 3B3,11 reduziu significativamente a concentração sérica de biotina hIgG, indicando o aumento do catabolismo do hIgG após o bloqueio de FcRn (**Figuras 18 & 19**).

**EXEMPLO 16: RESUMO DE MABS NA REATIVIDADE ATRAVÉS DAS ESPÉCIES**

MAB 4B4,12, 3B3,11, 31,1, 4,13 e 3B5,4 foram estudados em ensaios de ligação FACS e ensaios de bloqueio para reatividade ao FcRn nas espécies. Células

que expressam FcRn humano (293C11) e células que expressam FcRn de macacos foram produzidas. Células que expressam FcRn murino e de camundongos foram de Neil Simister, da *Brandeis University*. Para os experimentos de bloqueio, as células que expressam FcRn foram incubadas com hIgG1 marcado com Alexa-A488 (100nM) e diversas concentrações de mABs (4B4.12, 3B3.11, 31.1, 4.13 e 3B5.4, ou controles isotípos, como IgG1, IgG2a) em tampão PBS de pH6. 45 minutos depois, as células foram analisadas por marcação com fluorescência e a TMFI foi calculada (ver Exemplo 6 para o método detalhado). Se o mAB inibe hIgG1 de ligação a às células que expressam FcRn respectivas acima de 30%, este mAB é considerado um mAB de bloqueio nesta espécie. Para experimentos de ligação, as células que expressam FcRn foram incubadas com mABs marcados com Alexa-A488 (4B4.12, 3B3.11, 31.1, 4.13 e 3B5.4, ou controles isotípos, como IgG1, IgG2a) em tampão PBS de pH7,4 por 60 minutos. Depois de uma lavagem com tampão PBS, as células foram examinadas em um citômetro de fluxo Coulter por marcação com fluorescência. Se a ligação do mAB em particular com as células estiver significativamente acima da ligação do controle isotípico (TMFI é 50% maior), este mAB é considerado capaz de se ligar ao FcRn de tal espécie. A **Tabela 8** e a **Figura 20** mostram um resumo dos resultados.

**Tabela 8: Resumo de mAB para reatividade cruzada**

mAB	Isotipo	Ligação				Bloqueio			
		Humano	Macaco	Rato	Camundo nao	Humano	Macaco	Rato	Camundo nao
4B4.12	IgG2a	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
3B3.11	IgG1	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
31.1	IgG1	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
4.13	Ig G 1	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
3B5.4 (anti-)	IgG2a	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não

**EXEMPLO 17: TRANSFECTANTES TRANSIENTES DE FcRN DE MACACOS MARCADOS COM MABs ANTI-hFcRN**

As células Cos1 foram transfetadas com cadeia pesada de FcRn de macacos (em pCDNA6) e β2M (pED.dc) com reagente de transfecção *Gene Jammer* (*Strategene*). 48 horas depois, as células foram colhidas e lavadas uma vez com PBS contendo 0,5% de BSA.  $5 \times 10^5$  células foram incubadas com mABs por 45 minutos no gelo. Em seguida, as células foram lavadas uma vez com PBS contendo 0,5% de BSA. As células foram então incubadas com anti-IgG de camundongo de cabra marcado com Alexa 488 (diluição 1:2.500) por 45 minutos no gelo. Depois de

uma lavagem, as células foram analisadas por marcação com fluorescência em um citômetro de fluxo *Coulter*. Os resultados são expressos como TMFI.

**EXEMPLO 18: WESTERN BLOTS COM MABs ANTI-HFcRN**

3 µg de FcRn humano solúvel (domínio extra-cellular da cadeia pesada e β2M) foi carregado em cada raia de 4 a 20% de um gel Tris-glicina (*Invitrogen*) e foi executado a 200V por 60 minutos. Em seguida, o gel foi carregado em um aparelho de transferência de gel (*Xcell II, Invitrogen*) com uma membrana de PVDF (*Amersham*) e executado a 55V por 1h em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em PBST (PBS acrescido de 0,05% Tween 20) por 1 hora. Depois disso, a membrana foi incubada com 10 µg/ml de vários mABs durante a noite a 4 °C. Depois de lavar duas vezes com PBST, a membrana foi incubada com HRP de anti-IgG Fc humano de cabra (*Southern Biotech Associates*) em diluição de 1:10.000, por 90 min. Depois de mais duas lavagens, a membrana foi desenvolvida com um kit ECL (*Amersham*). Os resultados mostram que mAB 3B3,11, 3B3,16, 3B3,21, 3B3,35, 4,13, 15B6,1 e 31,1 reconhecem a cadeia pesada de FcRn humano, enquanto 3B5,4 e 5A4,9 reconhecem β2M (**Figura 21**).

**EXEMPLO 19: ANÁLISE BIACORE DE 3B3,11**

Um *chip* CM5 (*Biacore*) foi revestido com aproximadamente 500 RU de FcRn humano solúvel, ou FcRn de macacos solúvel (diluído 100x em acetato em pH 4,5) usando acoplamento amina padrão. Cinco diluições de cinco vezes de anticorpos foram feitas, a partir de uma concentração inicial de 10 µg/mL. Cada diluição foi passada sobre o *chip* em duplicata, a 50 µl/min. por 1 minuto. Os dados foram solvidos para uma interação 1:1 de ligação. Ambas as ligações em pH 6 e pH 7,4 foram examinadas (**Figura 22 e Tabela 9**).

**Tabela 9. Análise Biacore de mAb 3B3,11 anti-hFcRn**

mAb	FcRn Humano			
	pH 6,0	Taxa de Dissociação (seg. <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>-4</sup>	pH 7,4	Taxa de Dissociação (seg. <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>-4</sup>
3B3,11	1,17 ± 0,39	1,76 ± 0,79	0,16 (n=2)	0,0145 (n=2)
3B3_11 (cino)	3,23 ± 0,14	5,52 ± 5,4	3,24 ± 0,30	2,47 ± 2,3

**EXEMPLO 20: MAPEAMENTO DE EPITOPE DE MABs ANTI-HFcRN**

FcRn humano solúvel e anticorpos monoclonais murinos são preparados rotineiramente internamente. Todos os reagentes, tampões e soluções químicas

foram adquiridos de *Biacore AB* (*Uppsala*, Suécia), salvo indicação contrária.

Instrumentação e preparação de superfície: A análise de interações macromoleculares utilizando ressonância de plásmon de superfície foi descrita em detalhes (1). Um instrumento *BIACORE 3000* (*Biacore AB*) foi usado e todas as interações de ligação foram realizadas a 25 °C. Um *chip* sensor de dextrano modificado por carboximetilcelulose (CM5) (*Biacore AB*) foi utilizado para a análise. Anticorpos monoclonais anti-FcRn foram diluídos em 1 a 10 µg/mL em 10 mM de acetato de sódio (pH 5,0) e imobilizados para uma célula de fluxo do *chip* sensor, usando o acoplamento de amina, conforme descrito em (1). O nível de imobilização final foi de aproximadamente 10.000 Unidades de Ressonância (RU). Uma superfície do anticorpo de controle usando uma célula de fluxo separada foi criada usando o mesmo procedimento na presença de um anticorpo FcRn não-específico (mAB 1745) e serviu como referência para os estudos de ligação.

Esquema do Ensaio: A sequência de aminoácidos do FcRn humano solúvel (shFcRn) foi sintetizada como uma série contínua de 27 peptídeos, com cada peptídeo estendendo 20 resíduos em comprimento. Esses peptídeos tiveram uma sequência de sobreposição de 10 aminoácidos. Os peptídeos foram dissolvidos em 100% de DMSO para uma concentração final de 1 a 5 mg/mL. Para a análise, as soluções de peptídeo foram diluídas 100 vezes em tampão HBS-N (10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl) e injetadas sobre o anticorpo específico para FcRn e superfícies de referência por 3 minutos, a uma taxa de 20 µL/min.. Depois de uma fase de dissociação de 35 segundos, a superfície foi regenerada por uma vibração de 30 segundos de 10 mM de glicina (pH 2,0) e uma vibração de 15 segundos de 1% de SDS, com uma taxa de fluxo de 60 µL/min. Como controle positivo, foi injetado shFcRn sobre as células de fluxo específicas e de controle, antes do primeiro peptídeo testado e após o último peptídeo testado, para garantir a estabilidade do *chip*. Um controle de tampão (1% de DMSO em HBS-N) também foi passado em ambas as células de fluxo, como controle negativo.

Avaliação de Dados: Os sensogramas (RU em função do tempo) gerados para a célula de fluxo (mAB não-específico) revestida com controle foram automaticamente subtraídos dos sensogramas revestidos com FcRn. A resposta em equilíbrio (Req) foi medida 30s antes do final da fase de injeção (1). A resposta positiva indica a ligação específica do peptídeo com o anticorpo específico (Frostell-Karlsson, et al. *J. Med. Chem.*, 43: 1986-1992 (2000)).

### 35 Resumo de epitopes de mAb

24)

Syn 559: Ac-ERGRGNLEWKEPPSMRLKAR-CONH2-----mAB 4B4.12, 4.13 (SEQ ID N°: 25)

Syn 562: Ac-CSAFSFYPPELQLRFLRNGL-CONH2-----mAB 3B3.11, 4.13 (SEQ ID N°:

26)

5 Syn 544: Ac-APGTPAFWVSGWLGPQQYLS-CONH2-----mAB 31.1 (SEQ ID N°: 27)

### **EXEMPLO 21: SELEÇÃO E TRIAGEM PRIMÁRIA DE FABS**

#### *A. PROTOCOLOS DE SELEÇÃO*

Fabs solúveis (sFabs) foram identificados a partir de uma biblioteca de fagos que apresenta os fragmentos de Fab. Quatro seleções diferentes, utilizando solúvel humano (shFcRn), ou proteínas de FcRn murino e células C11 e 293 que expressam a proteína de FcRn humano foram realizadas. Outras seleções também foram realizadas, usando uma combinação de células e alvos de proteínas com a mesma estratégia de eluição, conforme descrito abaixo:

15 1) Seleções contra shFcRn biotinilado: Três rodadas de seleção contra shFcRn biotinilado foram realizadas com depleção de esferas de estreptavidina. Foi permitida a ligação de fagomídeos em tampão de ligação ácido (pH 6) e então foram eluídos com IgG humana comercial não-específico (*Calbiochem*, 401114 <http://www.emdbiosciences.com/product/401114>) e mAb de anti-FcRn humano murino monoclonal (3b3) em um tampão ácido. Após a eluição competitiva, todos os fagos ligados restantes foram eluídos por infecção direta das células com as esferas. A produção do fago eluído foi usada como insumo para a próxima rodada de seleção.

25 2) Seleções contra shFcRn não biotinilado: Três rodadas de seleção contra hFcRn não biotinilado que foram passivamente imobilizadas em uma placa ELISA de 96 poços foram realizadas com a depleção em poços revestidos com BSA. Foi permitida a ligação de fagomídeos com alvo em tampão de ligação ácido (pH 6) e em seguida foram eluídos com IgG humana comercial não-específico e mAb de anti-FcRn humano (3B3) no mesmo tampão ácido. Após a eluição competitiva, todos os fagos ligados restantes foram eluídos usando tampão com pH 7,4, assim como por infecção direta das células. A produção do fago eluído foi usada como insumo para a próxima rodada de seleção.

30 3) Seleções contra shFcRn não-biotinilado (anticorpo anti-FcRn humano 17D3)-imobilizado: Três rodadas de seleção contra hFcRn capturado usando 17D3 biotinilado em esferas de estreptavidina foram realizadas. Também foi incluída uma etapa de depleção usando 17D3 biotinilado em esferas de estreptavidina, na ausência de FcRn. Foi permitida a ligação de fagomídeos com alvo em tampão de

ligação ácido (pH 6) e em seguida foram eluídos com IgG humana comercial não-específico e mAb de anti-FcRn humano (3B3) no mesmo tampão ácido. Após a eluição competitiva, todos os fagos ligados restantes foram eluídos por infecção direta das células com as esferas. A produção do fago eluído foi usada como insumo para a próxima rodada de seleção.

4) Seleções contra células que expressam hFcRn: Três rodadas de seleção contra células hFcRn-transfetadas foram realizadas com depleção de células parentais não-transfetadas. Foi permitida a ligação de fagomídeos com células em tampão de ligação ácido (pH 6) e então foram eluídos com IgG humana não-específico e mAB de anti-FcRn no mesmo tampão ácido. Após a eluição competitiva, todos os fagos ligados restantes foram eluídos por lise celular com esferas de estreptavidina magnética e posterior infecção de bactérias. A produção do fago eluído é usada como insumo para a próxima rodada de seleção. Seleção contra a proteína solúvel de FcRn humano (shFcRn) e células que expressam hFcRn:

As produções a partir de (1) e (2) e (4) acima foram utilizadas nas seleções alternativas proteína:célula:proteína e célula:proteína:célula (Rodada 1:Rodada 2:Rodada 3:Rodada 4), utilizando a mesma estratégia de eluição acima. Triagem por método ELISA para inibidores Fab de FcRn.

Para identificar ligantes de hFcRn, a triagem primária da produção das rodadas 2 e/ou 3 de cada braço de seleção descrito acima contra shFcRn biotinilado em fago ELISA foi realizada. Cerca de 768 Fabs primários ELISA-positivos no fagomídeo foram re-arranjados, o DNA sequenciado e selecionado uma segunda vez para ligação dependente de pH (pH 6 vs pH 7,5), especificidade de espécies (rato vs humano), ligação de microglobulina beta 2 e competição de IgG.

Cento e sessenta e um fagomídeos singulares que passaram na triagem ELISA secundária apresentaram cadeias pesadas distintas. Todos os 161 fagomídeos singulares foram subclonados e expressos como sFabs e selecionados em um ensaio de bloqueio FACS.

O bloqueio de IgG-Fc que se liga a células 293 C11 humanas que expressam FcRn realizado a 4 °C em um meio ácido resultou na descoberta de onze sFabs com propriedades anti-FcRn antagônicas. Todos os onze bloqueadores sFab de Fc-FcRn foram reformatados em IgG1 e reformatados como alótipos AZ e, ainda, caracterizados *in vitro* quanto a afinidade com FcRn humano e murino solúvel (determinação  $K_D$  por método SPR), bloqueio de Fc-FcRn usando análise FACS ( $IC_{50}$ ), ligação de microglobulina beta 2 (por SPR), ligação dependente de pH e

bloqueio em pH 6 e pH 7,5 para proteínas e células solúveis (FcRn humano e FcRn murino em FACS e por SPR).

#### **EXEMPLO 22: Fabs anti-FcRn**

- As sequências CDR de Fabs anti-FcRn exemplares identificados nas 5 seleções da biblioteca de apresentação de fagos são mostradas na **Tabela 10**.

**Tabela 10. Resumo de Sequências de Aminoácidos de CDR de Fabs Anti-FcRn em Fagomídeos**

Fab	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
532A-M0090-F09	SGSSSNIGSNTVS (SEQ ID Nº: 28)	SDNQRPS (SEQ ID Nº: 29)	AAWDDDSLKGWV (SEQ ID Nº: 30)	DYTMS (SEQ ID Nº: 31)	SIWSSGGATVYADSV KG (SEQ ID Nº: 32)	DIRGSRNWFDP (SEQ ID Nº: 33)
532A-M0090-F11	TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID Nº: 34)	GDSQRPS (SEQ ID Nº: 35)	CSYAGSGIYV (SEQ ID Nº: 36)	EYAMG (SEQ ID Nº: 37)	SIGSSGGQTKYADSV KG (SEQ ID Nº: 38)	LSTGELY (SEQ ID Nº: 39)
532A-M0062-C09	RSSQSLLHSNGYNY LD (SEQ ID Nº: 40)	LVSNRAS (SEQ ID Nº: 41)	MQAQQTPTIT (SEQ ID Nº: 42)	IYSMT (SEQ ID Nº: 43)	SIVPSGGGETSYADSV KG (SEQ ID Nº: 44)	GHSGVGMDV (SEQ ID Nº: 45)
532A-M0064-H04	RSSQSLLHGNGHTY LD (SEQ ID Nº: 46)	LVSNRAS (SEQ ID Nº: 47)	MQQLQTPRT (SEQ ID Nº: 48)	FYSMT (SEQ ID Nº: 49)	GIRSSGGSTRYADSV KG (SEQ ID Nº: 50)	GWGLDAFDV (SEQ ID Nº: 51)
532A-M0057-F02	RSSLSLLHSNGYIYL D (SEQ ID Nº: 52)	LGSHRAS (SEQ ID Nº: 53)	MQPLQTPYT (SEQ ID Nº: 54)	YYHMN (SEQ ID Nº: 55)	VISPSGGVTMYADSV KG (SEQ ID Nº: 56)	GKAFDI (SEQ ID Nº: 57)
532A-M0084-B11	SGDKLGDKYVS (SEQ ID Nº: 58)	QDNRRPS (SEQ ID Nº: 59)	QAQLSNTASVA (SEQ ID Nº: 60)	FYGMH (SEQ ID Nº: 61)	GIYSSGGITGYADSV KG (SEQ ID Nº: 62)	GLRTFDY (SEQ ID Nº: 63)
532A-M0084-B03	RASQPVGSYLA (SEQ ID Nº: 64)	GASN RAT (SEQ ID Nº: 65)	QHYGHSPPYT (SEQ ID Nº: 66)	SYAMY (SEQ ID Nº: 67)	RIVPSGGGTMYADSV QG (SEQ ID Nº: 68)	GMDV (SEQ ID Nº: 69)
532A-M0073-E10	RASQSVSSYLA (SEQ ID Nº: 70)	DASN RAT (SEQ ID Nº: 71)	QQRSNWPLT (SEQ ID Nº: 72)	YNMMS (SEQ ID Nº: 73)	YISPSGGSTWYADSV KG (SEQ ID Nº: 74)	YHYGMDV (SEQ ID Nº: 75)
532A-M0056-G05	RASQSISNH LV (SEQ ID Nº: 76)	DASN RAT (SEQ ID Nº: 77)	QQRSNWPP T (SEQ ID Nº: 78)	YYGMT (SEQ ID Nº: 79)	SISPSGGHTSYADSV KG (SEQ ID Nº: 80)	GPEYFFGVY (SEQ ID Nº: 81)
532A-M0055-G12	RASQSVGSYLN (SEQ ID Nº: 82)	AA YILQS (SEQ ID Nº: 83)	QQSYSNRIT (SEQ ID Nº: 84)	AYNMI (SEQ ID Nº: 85)	SIGPSGGKTVYADSV KG (SEQ ID Nº: 86)	VRSGFWSGHD Y (SEQ ID Nº: 87)
532A-M0092-D02	RASQSVSSYLA (SEQ ID Nº: 88)	GASSRAT (SEQ ID Nº: 89)	QQYGSSPRT (SEQ ID Nº: 90)	HYGMS (SEQ ID Nº: 91)	YIRPSGGKTIYADSV KG (SEQ ID Nº: 92)	DSWGSPNDA FDI (SEQ ID Nº: 93)

As sequências de DNA dessas regiões variáveis de cadeia leve (LV) de Fab são mostradas abaixo:

10 >M0062-C09 LV kappa

```
CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGGCCGCCATCTCC
TGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACATTGGATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGGCAG
TCTCCGCAGCTCCTGATCTATTGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGTCCCTGACAGGTTCA GTGGCAGTGGTCA
GGCACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGGAGGCTGAAGATGCTGGATTTATTACTGCATGCAAGCTCAA
```

CAAACCTCGATCACCTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (**SEQ ID N°: 94**)

>M0057-F02 LV kappa

CAAGACATCCAGATGACCTAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATGTCC  
TGCAGGTCTAGTCTGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACTCATTTGGATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGACAG  
5 TCTCCACAGCTCCTGATGTATTGGTTCTCATCGGGCTCCGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGTCA  
GGCACAGATTTACACTGAACATCAGCAGAGTGGAGGCGGAGGATGTTGGGTTATTACTGCATGCAACCTCTA  
CAAACCTCGTACACTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (**SEQ ID N°: 95**)

>M0055-G12 LV kappa

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCACACT  
10 TGCCGGCAAGTCAGAGCGTTGGCAGTTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGCGAAGCCCTAAGGCCCTG  
ATCTATGCTGCATACATTGCAAAGTGGGTCCCATCGAGGTTCACTGGCAGCGGCTCTGGACAGATTCACT  
CTCACCATCACAGTCTAACACCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACAGAGTTACAGTAATAGAATCACT  
TTCGGCCCTGGGACCAGAGTGGATGTCAAA (**SEQ ID N°: 96**)

>M0064-H04 LV kappa

15 CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCC  
TGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCACGGAAATGGACACACCTATTGGATTGGTATCTGCAGAACGCCAGGGCAG  
TCTCCACAGCTCCTGATCTATTGGTTCTAATCGGGCTCCGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCA  
GGCACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGTTGGGTTATTACTGCATGCAAGGTCTA  
CAAACCTCGAGGACGTTGGCCAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (**SEQ ID N°: 97**)

20 >M0056-G05 LV kappa

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTTGCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCTCC  
TGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAACCACCTAGTCTGGTCCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC  
ATCTATGATGCATCCAACAGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT  
CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCACTGGTATTACTGTCACTGGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCCACC  
25 TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (**SEQ ID N°: 98**)

>M0084-B03 LV kappa

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTTGCTCCAGGGAAACAGCCACCCCTCTCC  
TGCCGGCCAGTCAGCCTGTTGGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC  
ATCTATGGTGCATCCAATAGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT  
30 CTCGCCATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTGGAGTGTATTACTGTCACTGGTACTCACCTCCGTAC  
ACTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (**SEQ ID N°: 99**)

>M0092-D02 LV kappa

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTGCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCTCC  
TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
35 CTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC  
ACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCACTGGTATTACTGTCACTGGTAGCTCACCTCGG

ACGTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (**SEQ ID Nº: 100**)

>M0090-F09 LV lambda

CAGAGCGCTTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGAGACCCCCGGCAGAGAGTCACCATCTTGTCT  
GGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAGCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTC  
5 ATCTATAGTGATAATCAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTGCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCTGCCTCC  
CTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGAATATCACTGTGCAGCATGGATGACAGCCTGAAGGGT  
TGGGTGTTGGCGGAGGGACAAAGCTGACCGTCCTA (**SEQ ID Nº: 101**)

>M0084-B11 LV lambda

CAGAGCGCTTGACTCAGACACCCTCAGTGTCCGTCCCCGGACAGACAGCCACCACCTGCTCT  
10 GGAGATAAAATTGGGGATAAGTATGTTCTTGGTTCAACAGAACGCCAGTCCCCTATCCTACTCCTTTAT  
CAAGACAACAGGCAGGCCCTCTGGATCCCTGAACGATTCTCTGGCTCCAATTCTGGAACACAGCCTCTGACC  
ATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTACCACACTGTCAAGCGTGGCTCAGCAATACTGCTTCCGTGGCA  
TTCGGCGGAGGGACCAAGGCTGACCGTCCTC (**SEQ ID Nº: 102**)

>M0073-E10 LV kappa

15 CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCTCTCC  
TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTC  
ATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTAGTGGCAGTGGTCTGGACAGACTTCACT  
CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAGTTATTACTGTCAAGCAGCGTAGCAACTGGCCCTCACT  
TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA (**SEQ ID Nº: 103**)

>M0090-F11 LV lambda

CAGAGCGCTTGACTCAGCCTGCCCTCGTGTGGGTCTCCTGGACAGTCGATACCACATCTCCTGCACT  
GGGACCGGGAGTGATGTTGGAAGTTATAACCTGTCTCCTGGTACCAAAAGTACCCGGAAAGCCCCAAACTC  
30 ATCATTATGGGACAGTCAGCGGCCCTCGGACTTTCTAGTCGCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACTCGGCC  
TCCCTGACAATCTCTGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGTTGCTATATGCAGGTAGTGGCATT  
25 TACGTCTTGGCAGTGGACCAAGGTACCGTCCTA (**SEQ ID Nº: 104**)

#### **EXEPO 23: LIGAÇÃO DE SFABS E ANTICORPOS COM FcRn**

Para melhor caracterizar os Fabs e seus respectivos IgG1, uma análise SPR 8500/Biacore™ foi realizada em onze clones antagônicos exemplares de anticorpos anti-FcRn que deram positivo para ligação de FcRn com o DK determinado. Os dados exemplares SPR 8500/Biacore™ são fornecidos nas Tabelas 2 e 3. SFabs e anticorpos (IgG) foram testados quanto a sua habilidade de se ligar a FcRn humano (hFcRn) ou FcRn murino (FcRn murino) e pH 6 e 7,5. A ligação foi medida por SPR8500 e por BIACORE™ e é expressa por valores KD (nM). Observou-se que a ligação de 8 clones é independente de pH e dependente de pH 3.

35 **Tabelas 11A a E: Resumo dos dados de ligação SPR 8500 *in vitro* ( $K_D$  (nM)) dos SFabs de ligação com FcRn; Análises das Taxas de Associação e**

## Dissociação

### A. Dados de Ligação

Dados de IgG anti-FcRn antagonista	SPR 8500	SPR 8500	SPR 8500	SPR 8500
Fabs solúveis	FAB sol	FAB sol	FAB sol	FAB sol
	hFcRn sol	hFcRn sol	FcRn murino solúvel	FcRn murino sol
# do clone	K <sub>D</sub> nM @ pH 6	K <sub>D</sub> nM @ pH 7,5	K <sub>D</sub> nM @ pH 6	K <sub>D</sub> nM @ pH 7,5
532A-M0090-F11	9,2	19,1	31,2	9,9
532A-M0064-H04	28	25,9	sem ligação	sem ligação
532A-M0090-F09 (dependente de pH)	5,7	sem ligação	sem ligação	sem ligação
532A-M0084-B03 (dependente de pH)	Não se encaixa	sem ligação	sem ligação	sem ligação
532A-M0062-C09 (dependente de pH)	25	sem ligação	sem ligação	sem ligação
532A-M0055-G12	12	39,7	sem ligação	sem ligação
532A-M0056-G05	13,6	18,1	sem ligação	sem ligação
532A-M0084-B11	17,4	19,6	sem ligação	sem ligação
532A-M0092-D02	3,9	18,7	sem ligação	sem ligação
532A-M0073-E10	82	9,7	sem ligação	sem ligação
532A-M0057-F02	29	11,3	sem ligação	sem ligação

### B. hFcRn pH 6

	kon	koff	KD
17D3	2.77E+05	4.30E-04	1.5E-09
3B3	3.82E+06	1.31E-03	3.4E-10
Fcl Mieloma hIgG	---	---	---
Plasma hIgG	---	---	---
	4.32E+03	2.31E-03	5.3E-07
X0002 - G07	2.06E+04	1.24E-04	6.0E-09
M0055 - G12	1.27E+06	1.53E-02	1.2E-08
M0057 - F02	1.48E+05	4.26E-03	2.9E-08
M0062 - C09	9.44E+04	2.38E-03	2.5E-08
M0064 - H04	1.29E+05	3.68E-03	2.8E-08
M0073 - E10	3.36E+05	2.75E-02	8.2E-08
M0090 - F11	9.68E+04	8.97E-04	9.2E-09
X0002 - A07	---	---	---

### C. hFcRn pH 7,4

	<b>kon</b>	<b>koff</b>	<b>KD (</b>
<b>17D3</b>	3.24E+05	5.23E-04	1.61E-09
<b>apo</b>	2.97E+06	1.76E-03	5.93E-10
FcI	---	---	---
Mieloma hlgG	---	---	---
Plasma hlgG	---	---	---
<b>X0002 - G07</b>	---	---	---
<b>M0055 - G12</b>	2.01E+05	7.96E-03	3.97E-08
<b>M0057 - F02</b>	3.25E+05	3.67E-03	1.13E-08
<b>M0062 - C09</b>	---	---	---
<b>M0064 - H04</b>	1.55E+05	4.02E-03	2.59E-08
<b>M0073 - E10</b>	3.59E+05	3.49E-03	9.71E-09
<b>M0090 - F11</b>	5.94E+04	1.13E-03	1.91E-08
<b>X0002 - A07</b>	---	---	---

#### D. FcRn murino pH 6

	<b>kon</b>	<b>koff</b>	<b>KD</b>
<b>17D3</b>	1.74E+04	6.03E-03	3.40E-07
<b>apo</b>	6.83E+05	1.04E-03	1.50E-09
FcI	2.08E+05	3.29E-03	1.58E-08
Mieloma hlgG	1.30E+05	1.27E-03	9.80E-09
Plasma hlgG	9.13E+04	2.42E-03	2.65E-08
<b>X0002 - G07</b>	9.70E+04	8.62E-04	8.90E-09
<b>M0055 - G12</b>	---	---	---
<b>M0057 - F02</b>	---	---	---
<b>M0062 - C09</b>	---	---	---
<b>M0064 - H04</b>	---	---	---
<b>M0073 - E10</b>	---	---	---
<b>M0090 - F11</b>	1.84E+04	5.73E-04	3.12E-08
<b>X0002 - A07</b>	---	---	---

#### E. FcRn murino pH 7.4

	<b>kon</b>	<b>koff</b>	<b>KD</b>
<b>17D3</b>	---	---	---
<b>3B3</b>	---	---	---
FcI	---	---	---
Mieloma hlgG	---	---	---
Plasma hlgG	---	---	---
<b>X0002 - G07</b>	---	---	---
<b>M0055 - G12</b>	---	---	---
<b>M0057 - F02</b>	---	---	---
<b>M0062 - C09</b>	---	---	---
<b>M0064 - H04</b>	---	---	---
<b>M0073 - E10</b>	---	---	---
<b>M0090 - F11</b>	2.75E+04	7.40E-04	9.96E-09
<b>X0002 - A07</b>	---	---	---

**Tabelas 12A a E: Resumo dos dados de ligação SPR 8500 *in vitro* ( $K_D$  (nM)) dos anticorpos de ligação com FcRn; Análises das Taxas de Associação e Dissociação**

#### A. Dados de Ligação

Dados de IgG anti-FcRn antagonista	SPR 8500	SPR 8500	SPR 8500	SPR 8500
Formato	IgG	IgG	IgG	IgG
	hFcRn	hFcRn	FcRn murino	FcRn murino
# do clone	$K_D @ pH\ 6$	$K_D @ pH\ 7,5$	$K_D @ pH\ 6$	$K_D @ pH\ 7,5$
532A-M0090-F11	2,44	10,8	9,8	9,14
532A-M0064-H04	6,82	12,5	31	sem ligação

<b>532A-M0090-F09 (dependente de pH)</b>	<b>3,64</b>	<b>Não se encaixa</b>	<b>13,9</b>	<b>sem ligação</b>
<b>532A-M0084-B03 (dependente de pH)</b>	<b>2,99</b>	<b>Não se encaixa</b>	<b>29,6</b>	<b>sem ligação</b>
<b>532A-M0062-C09 (dependente de pH)</b>	<b>29,5</b>	<b>Não se encaixa</b>	<b>Não se encaixa</b>	<b>sem ligação</b>
<b>532A-M0055-G12</b>	<b>3,1</b>	<b>10,2</b>	<b>16</b>	<b>sem ligação</b>
<b>532A-M0056-G05</b>	<b>2,48</b>	<b>2,1</b>	<b>22,9</b>	<b>sem ligação</b>
<b>532A-M0084-B11</b>	<b>3,3</b>	<b>2,59</b>	<b>6,43</b>	<b>sem ligação</b>
<b>532A-M0092-D02</b>	<b>17,9</b>	<b>24,2</b>	<b>30,2</b>	<b>sem ligação</b>
<b>532A-M0073-E10</b>	<b>Não se encaixa</b>	<b>Não se encaixa</b>	<b>Não se encaixa</b>	<b>sem ligação</b>
<b>532A-M0057-F02</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>	<b>sem ligação</b>

**B. hFcRn pH 6**

	Kon	Koff	KD
<b>M62-C9 (Fab)</b>	<b>8.12E+04</b>	<b>1.60E-03</b>	<b>1.97E-08</b>
<b>M90-F11(Fab)</b>	<b>9.21E+04</b>	<b>5.63E-04</b>	<b>6.11E-09</b>
<b>M62-C09 (IgG)</b>	<b>2.36E+05</b>	<b>6.95E-03</b>	<b>2.95E-08</b>
<b>M90-F11 (IgG)</b>	<b>1.02E+06</b>	<b>2.48E-03</b>	<b>2.44E-09</b>
<b>3B3</b>	<b>2.30E+06</b>	<b>9.40E-04</b>	<b>4.09E-10</b>
<b>17D3</b>	<b>8.17E+04</b>	<b>1.81E-04</b>	<b>2.22E-09</b>
<b>M92-D2</b>	<b>3.87E+04</b>	<b>6.92E-04</b>	<b>1.79E-08</b>
<b>M56-G05</b>	<b>1.13E+05</b>	<b>2.80E-04</b>	<b>2.48E-09</b>
<b>M84-B03</b>	<b>1.14E+05</b>	<b>3.40E-04</b>	<b>2.99E-09</b>
<b>SA-A08</b>	---	---	---
FcI	---	---	---
Mieloma IgG humano	---	---	---
Plasma IgG humano	<b>3.89E+04</b>	<b>6.85E-04</b>	<b>1.76E-08</b>
<b>X11-5</b>	---	---	---
<b>M55-G12</b>	<b>7.49E+04</b>	<b>2.32E-04</b>	<b>3.10E-09</b>
<b>M73-E10</b>	---	---	---
<b>M84-B11</b>	<b>7.53E+04</b>	<b>2.48E-04</b>	<b>3.30E-09</b>
<b>M64-H04</b>	<b>1.04E+05</b>	<b>7.06E-04</b>	<b>6.82E-09</b>
<b>M90-F09</b>	<b>3.14E+05</b>	<b>1.14E-03</b>	<b>3.64E-09</b>

**C. hFcRn pH 7.4**

5

10

	Kon	Koff	KD
<b>M90-F11(Fab)</b>	9.12E+04	6.45E-04	7.08E-09
<b>M90-F11 (IgG)</b>	1.59E+05	1.73E-03	1.08E-08
<b>SA-A08</b>	---	---	---
<b>FCI</b>	---	---	---
<b>M84-B11</b>	1.31E+05	3.41E-04	2.59E-09
<b>M64-H04</b>	2.17E+05	2.71E-03	1.25E-08
<b>M73-E10</b>	---	---	---
<b>M55-G12</b>	7.78E+04	7.97E-04	1.02E-08
<b>X11-5</b>	---	---	---
<b>M62-C09</b>	---	---	---
<b>M62-C09 IgG</b>	---	---	---
<b>M84-B03</b>	---	---	---
<b>M56-G05</b>	4.14E+05	8.68E-04	2.10E-09
<b>M90-F09</b>	---	---	---
<b>3B3</b>	3.41E+06	2.30E-03	6.75E-10
<b>M92-D2</b>	8.16E+04	1.98E-03	2.42E-08
<b>17D3</b>	1.21E+05	2.42E-04	2.01E-09
Mieloma hlgG humano	---	---	---
Plasma hlgG humano	---	---	---

112

#### D. FcRn murino pH 6

	Kon	Koff	KD
<b>M90-F11 (IgG)</b>	1.19E+05	1.17E-03	9.80E-09
<b>M90-F11(Fab)</b>	4.30E+04	8.72E-04	2.03E-08
<b>M90-F09</b>	3.21E+05	4.46E-03	1.39E-08
<b>M62-C09 (Fab)</b>	---	---	---
<b>M62-C09</b>	---	---	---
<b>M64-H04</b>	7.80E+04	2.42E-03	3.10E-08
<b>M84-B11</b>	3.14E+05	2.02E-03	6.43E-09
<b>M73-E10</b>	---	---	---
<b>M55-G12</b>	1.99E+05	3.20E-03	1.60E-08
<b>X11-5</b>	---	---	---
<b>M84-B03</b>	1.56E+05	4.63E-03	2.96E-08
<b>M56-G05</b>	4.78E+04	1.09E-03	2.29E-08
<b>M92-D2</b>	4.93E+04	1.49E-03	3.02E-08
<b>M55-G12</b>	1.99E+05	3.20E-03	1.60E-08
<b>3B3</b>	---	---	---
Mieloma hlgG humano	2.33E+05	1.42E-03	6.12E-09
Plasma hlgG humano	---	---	---
FcI	---	---	---
SA-A08	---	---	---

#### E. FcRn murino pH 7.4

	Kon	Koff	KD
<b>M90-F11</b>	1.17E+06	3.84E-03	3.29E-09
<b>M90-F11 (IgG)</b>	1.25E+05	1.14E-03	9.14E-09
<b>SA-A08</b>	---	---	---
<b>FCI</b>	---	---	---
<b>M84-B11</b>	---	---	---
<b>M64-H04</b>	---	---	---
<b>M73-E10</b>	---	---	---
<b>M55-G12</b>	---	---	---
<b>X11-5</b>	---	---	---
<b>M62-C09</b>	---	---	---
<b>M62-C09 (IgG)</b>	---	---	---
<b>M84-B03</b>	---	---	---
<b>M56-G05</b>	---	---	---
<b>M90-F09</b>	---	---	---
<b>3B3</b>	---	---	---
<b>M92-D2</b>	---	---	---
<b>17D3</b>	---	---	---
Mieloma hlgG humano	---	---	---
Plasma hlgG humano	---	---	---

#### EXEMPLO24: VALORES IC<sub>50</sub> DE SFABS E ANTICORPOS

Os sFabs e anticorpos IgG de onze clones antagonistas exemplares anti-

- 35 FcRn que deram positivo para ligação com FcRn foram testados em um modelo *in vitro* quanto a sua capacidade de bloquear a ligação de IgG-Fc humano não

específico com FcRn. Culturas células 293 C11 que expressam FcRn humano (hFcRn) ou FcRn murino (FcRn murino) foram tratadas com um sFab ou IgG1 de um clone de ligação positiva, um anticorpo de controle positivo anti-FcRn murino (1G3), um anticorpo de controle positivo anti-FcRn humano (3B3), ou um controle negativo

5 SA-A2. As culturas de células foram tratadas com IgG-Fc não-específicos marcados com ALEXAFLUOR® e incubadas a 4 °C em condições de tampão com pH 6. A quantidade de ligação IgG-Fc-FcRn foi determinada. Os resultados de sFabs exemplares e/ou os respectivos IgGs são apresentados na **Tabela 13**. Os valores IC<sub>50</sub> foram determinados por citometria de fluxo (isto é, FACS) e são expressos em

10 nM.

**Tabela 13: Resumo dos dados de inibição FACS *in vitro* (IC<sub>50</sub> (nM)) de anticorpos que se ligam a FcRn**

Dados de IgG anti-FcRn antagonista	FACS (bloqueio )	FACS (bloqueio )	FACS (bloqueio)	FACS (bloqueio)
IC50	FAB sol	FAB sol	IgG	IgG
	hFcRn (células)	FcRn murino (células)	hFcRn (células)	FcRn murino (células)
# do clone	IC50 nM @ pH 6	IC50 nM @ pH 6	IC50 nM @ pH 6	IC50 nM @ pH 6
532A-M0090-F11	13	6481	2,6	4,9
532A-M0064-H04	63	sem bloqueio	1,8	20
532A-M0090-F09 (dependente de pH)	645	sem bloqueio	4,6	5,5
532A-M0084-B03 (dependente de pH)	754	sem bloqueio	1,8	91
532A-M0062-C09 (dependente de pH)	35	sem bloqueio	3,9	148
532A-M0055-G12	228	sem bloqueio	1,7	30
532A-M0056-G05	337	sem bloqueio	1,4	18
532A-M0084-B11	355	sem bloqueio	1,9	25
532A-M0092-D02	271	sem bloqueio	1,2	15
532A-M0073-E10	110	sem bloqueio	377	161
532A-M0057-F02 (amber stop)	70	sem bloqueio	NA	NA
Ligante Estreptavidina SA-A2 IgG (controle)	NA	NA	562	101

<b>negativo)</b>				
IgG anti-FcRn humano de rato 3B3 principal			9,7	
IgG anti-FcRn murino de camundongo 1G3 principal	NA	NA		1,5

**EXEMPLO 25: TESTE DE EFICÁCIA DE ANTICORPOS QUE SE LIGAM A FcRN EM ANIMAIS**

Experimentos com camundongos transgênicos Tg32B genossubstituídos com FcRn humano mostraram que quatro doses intravenosas diárias consecutivas de

- 5 IgG M90-F11 (também denominado M090-F11 e M0090-F11) reduziram significativamente a meia-vida sérica do marcador IgG humana (hIgG biotinilado) em todas as doses testadas (50, 20, 10 e 5 mg/kg) (**Figuras 23 & 24**). A 50 mg/kg, quatro injeções iv de M55-G12 reduziram apenas moderadamente a meia-vida sérica do marcador, enquanto hIgG M84-B11 não foi eficaz (**Figura 23**). Um  
10 experimento com doses únicas de M90-F11 (20 mg/kg e 5 mg/kg) apresentou redução moderada do marcador Biotina-hIgG1 no soro de camundongos TG32B (**Figura 25**).

O protocolo usado para testar IgGs anti-FcRn em camundongos transgênicos foi:

- 15 1) Administrar 500 mg/kg de marcador hIgG por via intravenosa no tempo 0 (aproximadamente 1% é biotinilado para fins de quantificação)  
2) Anticorpos anti-FcRn administrados por via intravenosa em 24, 48, 72, 96 e 120 horas a 50, 20, 10 e 5 mg/kg  
20 3) Amostras de sangue coletadas em 24, 48, 72, 96, 120 e 168 horas  
4) Quantificar hIgG no soro através do método ELISA

Com base nos dados do camundongo Tg *in vivo*, M90-F11 foi escolhido como o principal candidato para otimização. As 10 alterações de linhagem germinativa que foram introduzidas na cadeia leve M90-F11 são dadas abaixo e na **Figura 29**. As alterações de linhagem germinativa que foram necessárias na cadeia pesada não foram introduzidas, no entanto, o alótípo da cadeia pesada foi alterado de alótípo AZ para F.

5

**CONSTANTE LEVE**

S Q P K A N P T V T L F P P S S E E L Q A CONST: AGTCAGCCAAGGCCAACCCACTGTCACTCTGTTCCGCCCTCCTGTGAGGAGCTCCAAGCC	GGTCAAGGCCAACCCACGGTCACTCTGTTCCGCCCTCCTGTGAGGAGCTCCAAGCC GRMLN: G Q P K A N P T V T L F P P S S E E L Q A
N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W CONST: AACAAAGGCCACACTAGTGTCTGATCACTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCTGG	AACAAAGGCCACACTAGTGTCTGATCACTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCTGG GRMLN: N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W
K A D G S P V K A G V E T T K P S K Q S N CONST: AAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCAGGAGCTGGAGACCAAAACCTCCAAACAGAGCAAC	AAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCAGGAGCTGGAGACGACCAAACCCCTCCAAACAGAGCAAC GRMLN: K A D G S P V K A G V E T T K P S K Q S N
N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S CONST: AACAAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAC	AACAAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAC GRMLN: N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S
Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P A E C S CONST: TACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTGCAGAATGCTCT	TACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA GRMLN: Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S

- 10
- CONST: aminoácido (SEQ ID Nº: 107)
  - CONST: ácido nucleico (SEQ ID Nº: 108)
  - GRMLN: ácido nucleico (SEQ ID Nº: 110)
  - GRMLN: aminoácido (SEQ ID Nº: 109)
  - PESADA: aminoácido (SEQ ID Nº: 111)
  - PESADA: ácido nucleico (SEQ ID Nº: 112)

PESADA: V:V3-23; J:JH1

## FR1-H

PESADA:

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C  
GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTCTTACGTCTTCTTC

GRMLN: GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGCCCTGAGACTCTCCTGT  
E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C

## CDR1-H

PESADA:

A A S G F T F S E Y A M G W V R Q A P G K G  
GCTGCTTCCGGATTCACTTCTCT GAGTACGCTATGGGT TGGGTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGT

GRMLN: GCAGCCTCTGGATTCACCTTAGC AGCTATGCCATGAGC TGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGG  
A A S G F T F S S A Y M S W V R Q A P G K G

## FR2-H

## CDR2-H

PESADA:

L E W V S S I G S S G G Q T K Y A D S V K G  
TTGGAGTGGGTTCTCT TCTATCGTTCTTCTGGTGGCCAGACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGT

GRMLN: CTGGAGTGGGCTCA GCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG  
L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G

## FR3-H

PESADA:

R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A  
CGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAACGACTCTACTTGAGATGAACAGCTTAAGGGCT

GRMLN: CGGTTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC  
R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A

## CDR3-H

## FR4-H

PESADA:

E D T A V Y Y C A R L S T G E L Y W G Q G T  
GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA CTCTAACAGGGAGCTCTAC TGGGGCCAGGGCACC

GRMLN: GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA GA..... TAC TGGGGCCAGGGCACC  
E D T A V Y Y C A K Y W G Q G T

## FR4-H

PESADA:

L V T V S S  
CTGGTCACCGTCTCAAGC

GRMLN: CTGGTCACCGTCTCATCA

GRMLN: ácido nucleico (SEQ ID N°: 114)

GRMLN: aminoácido (SEQ ID N°: 113)

- (a, z) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
- (f) ----------
- (a, z) GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK 5
- (f) ----------R
- (a, z) VEPKSCDKTHTCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVV
- (f) ----------
- (a, z) DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWW
- (f) ----------
- (a, z) LNCKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSPREPQVYTT
- (f) ----------
- (a, z) LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD10
- (f) -----E-M----------
- (a, z) SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\*\*
- (f) ----------

(a, z) (SEQ ID N°: 115)

(f) (SEQ ID N°: 116)

**EXEMPLO 26: LINHAGEM GERMINATIVA, REFORMATAÇÃO E MATURAÇÃO DE AFINIDADE DE CLONE PARENTAL M90-F11**

A variação do alótípico de IgG é mostrada na **Figura 30**, as três alterações de aminoácido (destacadas em **negrito**) de alótípico AZ para F foram introduzidas para IgG M90-F11 de linhagem germinativa, que já tinha 10 alterações de aminoácidos como parte da linhagem germinativa na cadeia leve.

O clone parental M90-F11, conforme linhagem germinativa, teve 10 alterações de aminoácidos na cadeia leve e, como parte da otimização principal, o clone de linhagem germinativa foi reformatado para IgG, que teve sequências para alótípico F na região de cadeia pesada Fc. No total, foram 13 alterações de aminoácidos em relação ao M90-F11 parental, o clone reformatado teve sua sequência de nucleotídeos otimizada para expressão em linhagens de células CHO. O clone que teve sua sequência de nucleotídeos/*Geneart* otimizada recebeu um nome, DX-2500, que foi usado para fazer um *pool* estável. M90-F11 Parental, M90-F11 de Linhagem Germinativa (GL) e DX-2500 foram caracterizados *in vitro* por *Biacore* e FACS, para avaliar a capacidade de ligação e bloqueio.

As **Tabelas 14 e 15** contêm os resultados das análises FACS e *Biacore*, comparando os IgGs altamente purificado, parental, de linhagem germinativa e reformatado:

**Tabela 14: Análise *Biacore*: o hFcRn imobilizado no *chip* e a IgG foram estendidos sobre o *chip* e a análise FACS (IC50).**

Dados do anticorpo anti-FcRn antagonista	biacore	biacore	biacore	biacore	biacore	biacore	FACS (bloqueio)
	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn (células)
# do clone	Kass. @pH 6	Kdis. @pH 6	K <sub>d</sub> @pH 6	Kass. @pH 7.4	Kdis. @pH 7.4	K <sub>d</sub> @pH 7.4	IC50 nM @ pH 6
532A-M0090-F11	2,13E+06	2,52E-04	1,18E-10	9,09E+05	7,02E-04	7,72E-10	0,43
532A-M0090-F1 1 (alterações LC de linhagem germinativa)	4,45E+06	7,64E-04	1,72E-1 0	9,96E+05	7,76E-04	7,79E-10	0,38
DX-2500 (alterações LC de linhagem germinativa & alótípico HC)	2,11 E+06	3,36E-04	1,60E-1 0	1,26E+06	3,38E-04	2,68E-10	0,65

**Tabela 15: Análise *Biacore*: o hFcRn imobilizado no *chip* e a IgG foram estendidos sobre o *chip*.**

Dados do anticorpo anti-FcRn antagonista	biacore	biacore	biacore	biacore	biacore	biacore
	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn
# do clone	Kass. @pH 6	Kdis. @pH 6	K <sub>d</sub> @pH 6	Kass. @pH 7.4	Kdis. @pH 7.4	K <sub>d</sub> @pH 7.4
532A-M0090-F11	3,03E+05	3,12E-03	1,03E-08	1,81 E+05	3,73E-03	2,05E-08
532A-M0090-F1 1 (alterações LC de linhagem germinativa)	5,74E+05	1,72E-02	2,99E-08	4,33E+05	1,52E-02	3,52E-08
DX-2500 (alterações LC de linhagem germinativa & alótípico HC)	6,42E+05	1,77E-02	2,76E-08	3,72E+05	7,52E-02	2,02E-08

Uma experiência prévia com anticorpo monoclonal anti-FcRn sugeriu que o Kdis. em pH 7,4 é crucial para a eficácia *in vivo* do anticorpo. Tornou-se evidente durante a análise *biacore* que, quando o anticorpo foi imobilizado no *chip* e o alvo hFcRn foi estendido sobre o *chip*, o Kdis. foi muito mais rápido para o anticorpo de 5 linhagem germinativa e DX-2500 em ambos os pHs 6 e 7,4. Foi tomada a decisão de maturar a afinidade do M90-F11 de linhagem germinativa para selecionar os clones com valor de Kdis melhorado em relação ao DX2500.

Uma abordagem paralela foi utilizada para maturar a afinidade do M90-F11 de linhagem germinativa. Três bibliotecas diferentes (LC embaralhada, biblioteca CDR 10 1 & 2 e 3 CDR) foram construídas e estão representadas na **Figura 26**. Uma cadeia leve de linhagem germinativa foi usada para construir as bibliotecas 2 e 3, a fim de evitar a otimização adicional da sequência após selecionar o objetivo maturado por afinidade.

#### *PROTOCOLOS DE SELEÇÃO*

15 Fabs solúveis (sFabs) foram identificados a partir da biblioteca de apresentação de fagomídeos M90-F11 maturada por afinidade, que exibe fragmentos Fab. Duas seleções diferentes, utilizando (shFcRn) solúvel humano e células 293 C11 que expressam a proteína FcRn humana foram realizadas utilizando três bibliotecas diferentes de maturação por afinidade. Outras seleções 20 também foram realizadas usando uma combinação de células e alvos de proteína usando a mesma estratégia de eluição, conforme descrito abaixo:

i) Seleções contra shFcRn biotinilado: Duas rodadas de seleção contra shFcRn biotinilado foram realizadas com depleção em esferas de estreptavidina. Permitiu-se a ligação dos fagomídeos com o alvo em tampão de ligação ácido (pH 6) 25 e foram então eluídos com IgG M90-F11 parental em tampão pH 7,4. Após a eluição/lavagem competitiva, todos os fagos ligados restantes foram eluídos por infecção direta das células com as esferas. A produção do fago eluído foi usada como insumo para a próxima rodada de seleção. A produção da rodada 2 foi utilizada na seleção da rodada 3 alternativa contra células hFcRn-transfetadas, 30 seguido de uma seleção de quarta rodada, usando seleções de shFcRn biotinilado com a mesma estratégia de eluição.

ii) Seleções contra células que expressam hFcRn: Duas rodadas de seleção contra células hFcRn-transfetadas foram realizadas. Permitiu-se a ligação dos fagomídeos com células em tampão de ligação ácido (pH 6) a 4 graus e então foram 35 eluídos com IgG M90-F11 parental em tampão pH 7,4. Após a eluição/lavagem competitiva, todos os fagos ligados restantes foram eluídos por lise celular, com

esferas de estreptavidina magnética e posterior infecção de bactérias. A produção do fago eluído é usada como insumo para a próxima rodada de seleção. Duas rodadas de seleção adicionais contra shFcRn biotinilado foram realizadas conforme descrito em (i).

## 5 TRIAGEM ELISA PARA INIBIDORES FAB DE FcRN

Para identificar os ligantes de hFcRn, a triagem principal da produção das rodadas 3 e 4 de cada braço de seleção (4 por biblioteca) contra shFcRn biotinilado em fago ELISA foi realizada em pH 6 e 7,4. Aproximadamente 1.152 Fabs primários ELISA-positivos no fagomídeo foram selecionados e DNA-sequenciados.

10 Cento e setenta e oito fagomídeos singulares de três bibliotecas maturadas por afinidade (16 de biblioteca embaralhada de cadeia leve, 46 da biblioteca CDR 1 & 2 e 116 da biblioteca CDR3) que foram ligantes com hFcRn independentes de pH, foram selecionados e subclonados para expressão como sFabs.

15 dos 16 clones de fagomídeos selecionados da biblioteca LC tinham o mesmo CDR que o M90-F11 parental, sugerindo que a estratégia de seleção e triagem foi induzida no enriquecimento para os clones parentais. Os clones de FAB sol maturados por afinidade (~165) foram submetidos a análise SPR de alto rendimento e classificados por taxa de dissociação pH 7,4 e por valores KD pH 6 e houve 21 clones maturados por afinidade da biblioteca CDR3 e um clone da biblioteca CDR1 & 2 que foram melhor do que M90-F11 de Linhagem Germinativa. Com base nos dados de triagem SPR de alto rendimento, o clone M0159-C09 maturado por afinidade a partir da biblioteca CDR 1 & 2 foi convertido na posição HV CDR 1 & 2 dos M0157-H04 e M0157-E05 maturados por afinidade a partir da biblioteca CDR3. Os dois clones híbridos construídos M0171-A01 (também denominados M171-A01) e M0171-A03 (também denominado M171-A03) teve HV CDR 1, 2 & 3 de maturação por afinidade completa com as sequências de M90-F11 LC de Linhagem Germinativa.

No total, houve 24 clones sFAB (M90-F11 parental e de Linhagem Germinativa, 19 da biblioteca CDR3, 1 da biblioteca CDR 1 & 2 e 2 clones híbridos) que foram sequenciados, purificados em escala média e classificados por análise SPR repetida (**Tabela 16**) e suas propriedades antagônica anti-FcRn confirmadas em um ensaio de bloqueio de Fc-FcRn usando análise FACS.

**Tabela 16: 22 sequências principais de cinética de ligação de FAB solúvel maturado por afinidade, classificação e HV-CDR**

1ª escala média - 2º SPR	pH 7,4			pH 6,0			Melhoria Kdis. em Vezes em M90-F11 de Lijnagem Germínativa		pH 7,4	Diferenças de Sequência CDR		
# do Clone Principal	ka (1/Ms)	Kdis. (1/s)	KDIS. (M)	ka (1/Ms)	Kdis. (1/s)	KDIS. (M)	pH 7,4	pH6,0	Classificação	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3

532A-M0171-A03	1,3E+05	1,7E-05	1,3E-10	1,3E+05	1,8E-04	1,4E-09	261,0	41,5	1	VYAMG	SIGSSGGPTKYADSVKG	LSIRELV
532A-M0171-A01	1,6E+05	2,3E-04	1,5E-09	1,6E+05	2,9E-04	1,9E-09	19,2	25,7	3	VYAMG	SIGSSGGPTKYADSVKG	LSIVDSY
532A-M0161-B04	1,7E+05	2,2E-04	1,3E-09	1,6E+05	1,9E-04	1,2E-09	20,5	39,6	2	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVRG	LATGDSY
532A-M0157-F09	1,7E+05	2,8E-04	1,6E-09	1,8E+05	2,9E-04	1,6E-09	16,2	26,0	5	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELI
532A-M0157-B08	1,6E+05	3,5E-04	2,2E-09	1,6E+05	2,9E-04	1,8E-09	12,7	25,4	8	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIREL5
532A-M0157-H04	1,7E+05	3,6E-04	2,2E-09	1,7E+05	3,0E-04	1,8E-09	12,4	25,0	10	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELV
532A-M0159-A07	1,9E+05	2,5E-04	1,4E-09	1,8E+05	2,6E-04	1,4E-09	17,7	29,1	4	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LS LGDSY
532A-M0158-H06	2,1E+05	3,5E-04	1,7E-09	2,1E+05	3,1E-04	1,5E-09	12,9	24,1	7	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIVDSF
532A-M0157-A12	1,8E+05	4,9E-04	2,8E-09	1,5E+05	5,1E-04	3,3E-09	9,1	14,7	16	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELD
532A-M0158-C04	1,5E+05	4,2E-04	2,7E-09	1,5E+05	4,5E-04	3,0E-09	10,7	16,7	12	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELH
532A-M0157-C05	1,8E+05	4,7E-04	2,6E-09	2,0E+05	4,2E-04	2,1E-09	9,5	17,9	15	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIREL5
532A-M0155-F05	1,8E+05	5,4E-04	3,1E-09	1,9E+05	4,6E-04	2,5E-09	8,3	16,3	19	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIDDSY
532A-M0158-A03	1,4E+05	3,5E-04	2,5E-09	1,4E+05	4,8E-04	3,4E-09	12,9	15,6	6	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTVELD
532A-M0159-A10	1,6E+05	4,2E-04	2,6E-09	1,6E+05	4,0E-04	2,5E-09	10,6	18,6	13	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELF
532A-M0157-D11	1,7E+05	4,6E-04	2,6E-09	1,7E+05	3,9E-04	2,3E-09	9,8	19,1	14	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRDSDY
532A-M0155-D12	1,4E+05	5,1E-04	3,6E-09	1,5E+05	4,5E-04	3,0E-09	8,8	16,6	18	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIDDFY
532A-M0157-D04	1,9E+05	5,1E-04	2,7E-09	1,8E+05	4,4E-04	2,5E-09	8,9	17,0	17	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELF
532A-M0155-G01	1,6E+05	5,7E-04	3,5E-09	1,7E+05	5,1E-04	2,9E-09	7,9	14,6	20	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELY
532A-M0157-E05	1,8E+05	3,6E-04	2,0E-09	1,8E+05	3,1E-04	1,7E-09	12,6	24,1	9	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIVDSY
532A-M0159-C09	1,4E+05	9,1E-04	6,6E-09	1,3E+05	7,9E-04	6,0E-09	4,9	9,5	22	VYAMG	SIGSSGGPTKYADSVKG	LSTGELY
532A-M0161-G06	1,2E+05	8,1E-04	6,9E-09	1,7E+05	4,2E-04	2,6E-09	5,6	17,7	21	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELH
M90-F11 Parental	1,4E+05	1,9E-03	1,3E-08	1,4E+05	1,8E-03	1,2E-08	2,3	4,7	23	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTGELY
532A-M0155-H05	2,9E+05	6,1E-03	2,1E-08	2,0E+06	3,4E-02	1,7E-08	0,7	0,2	26	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTGALS
M90-F11 de Linhagem Germinativa	1,9E+05	4,5E-03	2,4E-08	6,5E+05	7,5E-03	1,2E-08	1,0	1,0	25	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTGELY

1ª Escala Média – 2º SPR	Diferenças de Sequência CDR			SEQ ID N°
# do Clone Principal	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3	
532A-M0171-A03	VYAMG	SIGSSGGPTKYADSVKG	LSIRELV	117
532A-M0171-A01	VYAMG	SIGSSGGPTKYADSVKG	LSIVDSY	118
532A-M0161-B04	EYAMG	SIGSSGGQIKYADSVKG	LAIGDSY	119
532A-M0157-F09	EYAMG	SIGSSGGQIKYADSVKG	LSIRELI	120
532A-M0157-B08	EYAMG	SIGSSGGQIKYADSVKG	LSIREL5	121
532A-M0157-H04	EYAMG	SIGSSGGQIKYADSVKG	LSIRELV	122
532A-M0159-A07	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSLGDSY	123
532A-M0158-H06	EYAMG	SIGSSGGQIKYADSVKG	LSIVDSF	124
532A-M0157-A12	EYAMG	SIGSSGGQIKYADSVKG	LSIRELD	125
532A-M0158-C04	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELH	126
532A-M0157-C05	EYAMG	SIGSSGGQIKYADSVKG	LSIREL5	127
532A-M0155-F05	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIDDSY	128
532A-M0158-A03	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIVELD	129
532A-M0159-A10	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELF	130
532A-M0157-D11	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRDSDY	131
532A-M0155-D12	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIDDFY	132
532A-M0157-D04	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELF	133
532A-M0155-G01	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELY	134
532A-M0157-E05	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIVDSY	135
532A-M0159-C09	VYAMG	SIGSSGGPTKYADSVKG	LSTGELY	136
532A-M0161-G06	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELH	137
M90-F11 Parental	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTGELY	138
532A-M0155-H05	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTGALS	139
M90-F11 de Linhagem Germinativa	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTGELY	140

Tabela 16A: Sequências correspondentes à Tabela 16

5 Todos os 22 clones de sFAB foram reformatados para IgG, mas somente 8 IgG foram expressos, purificados e submetidos a análise *Flexchip* em pH 6 e 7,4.

Com base nos dados SPR 8500 *Flexchip*, os 4 clones de IgG seguintes maturados por afinidade foram selecionados para estudo *in vitro* (análise *Biacore*) e *in vivo* em camundongo transgênico hFcRn.

- A Tabela 17A mostra o número total de alterações de aminoácidos no HV-CDR1 & 2 ou 3 dos 4 IgG maturados por afinidade, em comparação com o clone parental ou DX2500.

**Tabela 17A: 4 sequências principais de IgG LV maturado por afinidade & HV-CDR e # de mutação, comparado ao M90-F11 parental**

Nome Inicial	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M90-F11 Parental	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTGELY
DX-2500	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTGELY
532A- M0171-A03	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	VYAMG	SIGSSGGPTKYADSVKG	LSIRELV
532A- M0171-A01	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	VYAMG	SIGSSGGPTKYADSVKG	LSIVDSY
532A- M0159-A07	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSLGDSY
532A- M0161-B04	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LAIGDSY

- \* 10 alterações de Linhagem Germinativa, 3 alterações devido à troca de alótipo de AZ para F + mutação HV-CDR

SEQ ID Nºs	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M90-F11 Parental	141	142	143	144	145	146
Dx-2500	147	148	149	150	151	152
532A-M0171-A03	153	154	155	156	157	158
532A-M0171-A01	159	160	161	162	163	164
532A-M0171-A07	165	166	167	168	169	170
532A-M0171-B04	171	172	173	174	175	176

**Tabela 17 SEQ ID Nºs A1 correspondentes à Tabela 17A**

- A análise *Biacore* dos 4 clones maturados por afinidade feita em pH 7,4, imobilizando-se a IgG no *chip* e hFcRn deslizado e seus dados brutos e melhoria em vezes (Kdis. e Kd) sobre o clone DX-2500 e M90-F11 parental é apresentada na Tabela 17B.

**Tabela 17B: 4 sequências principais de cinética de ligação de IgG maturado por afinidade, melhoria em vezes sobre DX-2500 & M90-F11 Parental**

# do Clone + Método SPR	Comparação dos Dados de Biacore feita em pH 7.4			Melhoria Kdis. em Vezes		Melhoria Kd em Vezes	
	Ka s-1 M-1	Kd s-1	KD (M)	DX2500	M90-F11	DX2500	M90-F11
M171-A01 IgG Biacore	1.26E+05	1.92E-04	1.52E-09	103	16	58	12
M171-A03 IgG Biacore	1.42E+05	2.84E-04	2.00E-09	69	11	44	9
M159-A07 IgG Biacore	1.27E+05	6.88E-04	5.40E-09	29	4	16	3
M161-B04 IgG Biacore	1.21E+05	8.57E-04	7.06E-09	23	3	12	3
M90-F11 parental Biacore	1.61E+05	2.99E-03	1.86E-08	7	1	5	1
DX-2500 Biacore	2.24E+05	1.97E-02	8.79E-08	1	0.15	1	0.21

O protocolo utilizado para testar IgG anti-FcRn maturado por afinidade e FAB

sólivel em camundongos transgênicos hFcRn foi:

- 6 grupos (1 placebo, 4 IgG, 1 Fab. 4 camundongos/grupo)
  - Dose intravenosa de 495 mg/kg hIgG + 5 mg/kg de Biotina-hIgG no momento = 0 hora
- 5 • Dose intravenosa de 5 ou 20 mg/kg de Ab (1,67 ou 6,67 mg/kg de Fab) no momento = 24 horas:
- M171-A01-IgG,
  - M171-A03-IgG,
  - M159-A07-IgG,
- 10 • M161-B04-IgG ou
- S32A-M171-A01-Fab
  - Amostras de sangue coletadas em 24 (pré-dose), 30, 48, 72, 96, 120 e 168 horas.
- 15 • Níveis séricos de Biotina-hIgG quantificados utilizando captura de estreptavidina/detecção de Fc por método ELISA e IgG total quantificado usando captura de Fab/detecção de Fc por método ELISA.

Com base nos dados *in vivo* mostrados nas **Figuras 27 e 28** e na **Tabela 18** abaixo, M0161-B04 e M0171-A01 foram selecionados para serem testados de igual para igual com M90-F11 e DX-2500 em camundongos Tg32B.

**20 Tabela 18: Efeito de IgG maturado por afinidade e FAB solúvel na aceleração do catabolismo de hIgG em camundongos Tg32B: Dose Intravenosa de 5 & 20 mg/kg (IgG de Biotina & IgG Total).**

Nome do IgG	% de PBS controle de Biotina-IgG remanescente no soro em 168 horas			
	5mg/kg		20 mg/kg	
	(1,7mg/kg sFab)	(6,7mg/kg sFab)	(1,7mg/kg sFab)	(6,7mg/kg sFab)
M90-F11 Parental	77	63	NA	NA
532A- M0171-A01	124	45	96	40
532A- M0171-A03	128	66	84	44
532A- M0159-A07	131	59	96	40
532A- M0161-B04	100	41	76	24
S32A-M171-A03-sFab	152	103	140	108

#### **Exemplo 27: Efeito dos anticorpos anti-FcRn no catabolismo de hIgG**

Estudos *in vivo* com anticorpos anti-FcRn demonstraram eficácia na depleção do IgG circulante. Foi apresentada uma depleção dependente da dose em duas espécies, camundongos e macacos, e por duas vias de administração, intravenosa e subcutânea. Nos macacos, a redução de IgG não foi acompanhada por nenhuma alteração no IgA circulante, IgM, ou albumina sérica.

A) Efeito dos anticorpos anti-FcRn no catabolismo de hIgG em camundongos

30 No dia 0, foi administrada IgG humana em camundongos Tg32B (FcRn de

camundongo e nocaute de  $\beta$ 2-macroglobulina de camundongo)/genossubstituição (FcRn humano e genossubstituição de  $\beta$ 2-macroglobulina). No dia 1 e no dia 7 foram administradas doses diferentes aos camundongos por via intravenosa de anticorpos M161-B04 (DX-2504) e M171-A01 anti-FcRn. O nível de IgG humana no soro dos camundongos foi avaliado durante 14 dias. Conforme mostrado na Figura 31, o nível de IgG humana foi reduzido significativamente durante o período do dia 14, para cada um dos anticorpos administrados. A diminuição na IgG dependeu da concentração de anticorpos anti-FcRn administrados.

5 B) Efeito dos anticorpos anti-FcRn no catabolismo de hIgG em camundongos por administração subcutânea.

10 No dia 0, foi administrada IgG humana em camundongos Tg32B (FcRn de camundongo e nocaute de  $\beta$ 2-macroglobulina de camundongo)/genossubstituição (FcRn humano e genossubstituição de  $\beta$ 2-macroglobulina). No dia 1 e no dia 7 foram administradas doses diferentes aos camundongos por via subcutânea do anticorpo M161-B04 (DX-2504) anti-FcRn. O nível de IgG humana no soro dos camundongos foi medido durante 14 dias. Conforme mostrado na Figura 32, o nível de IgG humana foi reduzido significativamente durante o período do dia 14, para cada um dos anticorpos administrados. A diminuição na IgG dependeu da concentração dos anticorpos anti-FcRn administrados. A eficácia da administração subcutânea é similar à administração intravenosa.

15 C) Efeito dos anticorpos anti-FcRn no catabolismo de hIgG em macacos *cynomolgus*

20 Foram administradas a macacos *cynomolgus* diferentes doses de anticorpos M161-B04 (DX-2504) anti-FcRn e um controle do veículo. A Figura 33 mostra a cronologia de administração (Figura 33A) e os resultados para o controle (Figura 33B). O nível de IgG no soro dos macacos foi medido durante 14 dias. Conforme mostrado nas Figuras 34 e 35 (macacos individual) e Figura 36 (dados da média do grupo), o nível de IgG foi reduzido significativamente durante o período do dia 14, para cada um dos anticorpos administrados. A diminuição na IgG dependeu da concentração dos anticorpos anti-FcRn administrados. A eficácia da administração subcutânea é similar à administração intravenosa. As Figuras 37A a 37C mostram que os níveis séricos de IgA, IgM e albumina não são afetados pela administração do anticorpo anti-FcRn.

25 Os conteúdos de todas as referências citadas, incluindo referências bibliográficas, patentes emitidas, pedidos de patente publicados ou não publicados citados ao longo deste pedido, bem como os listados abaixo, são expressamente

incorporados aqui por referência em suas totalidades. Em caso de conflito, o presente pedido, incluindo quaisquer definições aqui contidas, prevalecerá.

Um número de modalidades da invenção foi descrito. No entanto, será entendido que várias modificações podem ser feitas, sem se afastar do âmbito e do escopo da invenção. Assim, outras modalidades estão dentro do escopo das reivindicações seguintes.

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma sequência de domínio variável de cadeia pesada (HC) de imunoglobulina e uma sequência de domínio variável de cadeia leve (LC) de imunoglobulina,

5 em que as sequências de domínio variável de cadeia pesada e de cadeia leve de imunoglobulina formam um sítio de ligação do antígeno que se liga a FcRn humano, e em que o anticorpo inclui uma ou mais das seguintes características:

(a) uma CDR humana ou região de estrutura humana;

(b) a sequência de domínio variável de LC de imunoglobulina compreende

10 uma ou mais CDRs que são pelo menos 85% idênticas a uma CDR de um domínio variável de LC de M0161-B04, M0171-A01, DX2500, M0171-A03, M0159-A07 ou M0090-F11;

15 (c) a sequência de domínio variável de HC de imunoglobulina compreende uma ou mais CDRs que são pelo menos 85% idênticas a uma CDR de um domínio variável de HC de M0161-B04, M0171-A01, DX2500, M0171-A03, M0159-A07 ou M0090-F11;

20 (d) a sequência de domínio variável de LC de imunoglobulina é pelo menos 85% idêntica a um domínio variável de LC de M0161-B04, M0171-A01, DX2500, M0171-A03, M0159-A07 ou M0090-F11;

25 (e) a sequência de domínio variável de HC de imunoglobulina é pelo menos 85% idêntica a um domínio variável de HC de M0161-B04, M0171-A01, DX2500, M0171-A03, M0159-A07 ou M0090-F11, e

30 (f) o anticorpo liga-se a um epítopo que se sobrepõe com um epítopo ligado por M0161-B04, M0171-A01, DX2500, M0171-A03, M0159-A07 ou M0090-F11.

2. Anticorpo isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de (a) ser selecionado do grupo consistindo de M0161-B04, M0171-A01, DX2500, M0171-A03, M0159-A07 e M0090-F11, (b) que compreende as CDRs de M0161-B04, M0171-A01, DX2500, M0171-A03, M0159-A07 e M0090-F11, ou (c) que é pelo menos 85% idêntico a um anticorpo selecionado do grupo consistindo de M0161-B04, M0171-A01, DX2500, M0171-A03, M0159-A07 e M0090-F11.

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que (a) a sequência de domínio variável de HC compreende uma sequência de domínio variável de M0161-B04 e a sequência de domínio variável de LC compreende uma sequência de domínio variável de M0161-B04; (b) a sequência de

domínio variável de HC comprehende uma sequência de domínio variável de M0171-A01 e a sequência de domínio variável de LC comprehende uma sequência de domínio variável de M0171-A01; (c) a sequência de domínio variável de HC comprehende uma sequência de domínio variável de DX2500 e a sequência de domínio variável de LC comprehende uma sequência de domínio variável de DX2500; (d) a sequência de domínio variável de HC comprehende uma sequência de domínio variável de M0171-A03 e a sequência de domínio variável de LC comprehende uma sequência de domínio variável de M0171-A03; (e) a sequência de domínio variável de HC comprehende uma sequência de domínio variável de M0159-A07 e a sequência de domínio variável de LC comprehende uma sequência de domínio variável de M0159-A07; ou (f) a sequência de domínio variável de HC comprehende uma sequência de domínio variável de M0090-F11 e a sequência de domínio variável de LC comprehende uma sequência de domínio variável de M0090-F11.

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo se liga a um epítopo de FcRn ligado por M0161-B04, M0171-A01, DX2500, M0171-A03, M0159-A07, ou M0090-F11.

5. Anticorpo isolado, ou um fragmento do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que se liga a FcRn humano, em que o anticorpo é gerado contra a cadeia pesada de FcRn humano ou um fragmento da mesma, em que o anticorpo funciona como um inibidor não competitivo de IgG que se liga a FcRn humano, e em que o anticorpo não se liga a β2-microglobulina.

6. Composição farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que comprehende o anticorpo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

7. Método para detectar um FcRn em uma amostra, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método comprehende:

colocar a amostra em contato com o anticorpo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5; e

detectar uma interação entre o anticorpo e o FcRn, se presente.

8. Método para modular uma atividade de FcRn, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método comprehende:

colocar um FcRn em contato com o anticorpo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, desse modo, modulando a atividade do FcRn.

11. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5,

• : **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para uso na modulação de uma atividade do FcRn em um indivíduo humano.

10. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5,

• : **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para uso no tratamento de um distúrbio 5 autoimune e / ou modular sintomas de um distúrbio autoimune.

• : 11. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio autoimune é um distúrbio selecionado do grupo consistindo de: 10 artrite reumatoide (AR), lúpus eritematoso sistêmico (LES), Miastenia Gravis (MG), Doença de Graves, Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI), Síndrome de Guillain-Barré, miocardite autoimune, Glomerulonefrite Membranosa, diabetes mellitus tipo I ou tipo II, esclerose múltipla, síndrome de Reynaud, tireoidite autoimune, gastrite, doença celíaca, vitiligo, hepatite, cirrose biliar primária, doença inflamatória intestinal, espondiloartropatias, encefalomielite autoimune experimental, neutropenia imune, diabetes juvenil e as respostas imunes associadas com 15 hipersensibilidade tardia mediada por citocinas, linfócitos-T normalmente encontrados na tuberculose, sarcoidose e polimiosite, poliarterite, vasculite cutânea, pênfigo, penfigoide, síndrome de Goodpasture, doença de Kawasaki, esclerose sistêmica, síndrome do anti-fosfolipídio e síndrome de Sjogren.

12. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5,

20 **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para uso na modulação de meia vida/níveis de IgG circulante em um indivíduo.

13. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para uso na redução da concentração de anticorpos indesejados em um indivíduo.

25 14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo indesejado é natalizumab.

15. Anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga a FcRn humano, é gerado contra a cadeia pesada de FcRn humano ou fragmento da mesma, é um inibidor não competitivo de IgG que se liga a FcRn humano e não se liga a  $\beta$ 2-microglobulina,

30 **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para uso na redução da ligação de IgG ao FcRn em um indivíduo.

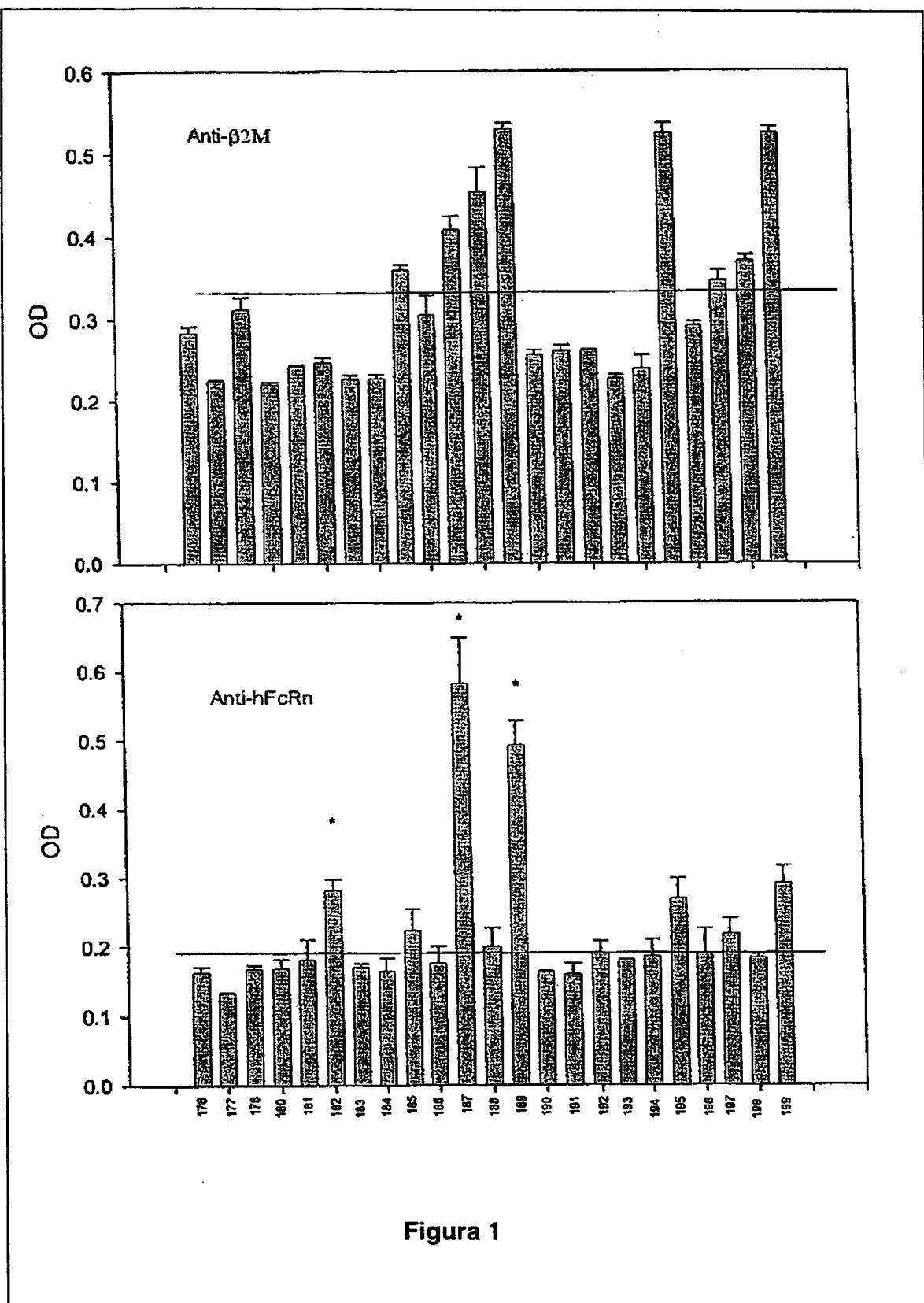
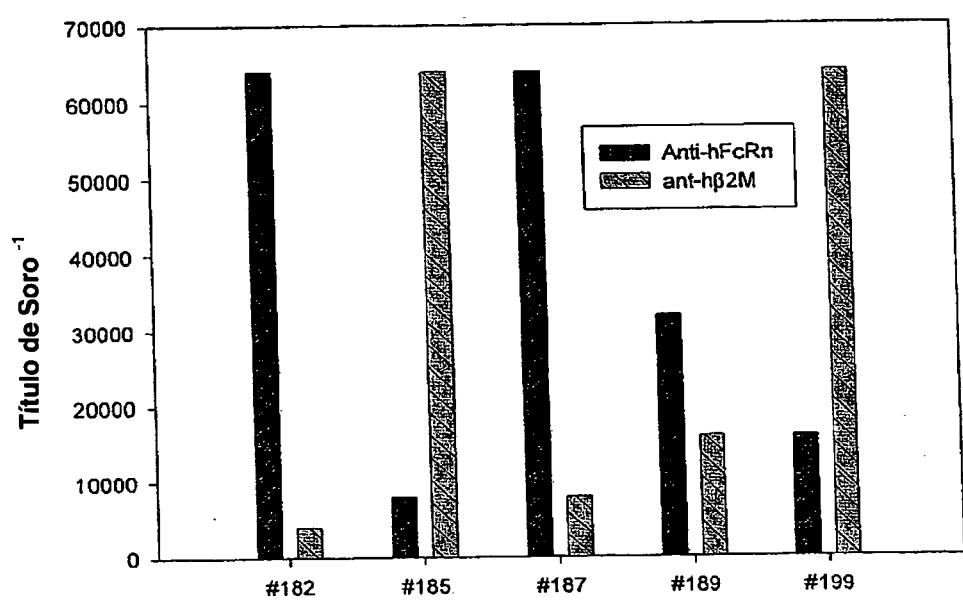


Figura 1



**Figura 2**

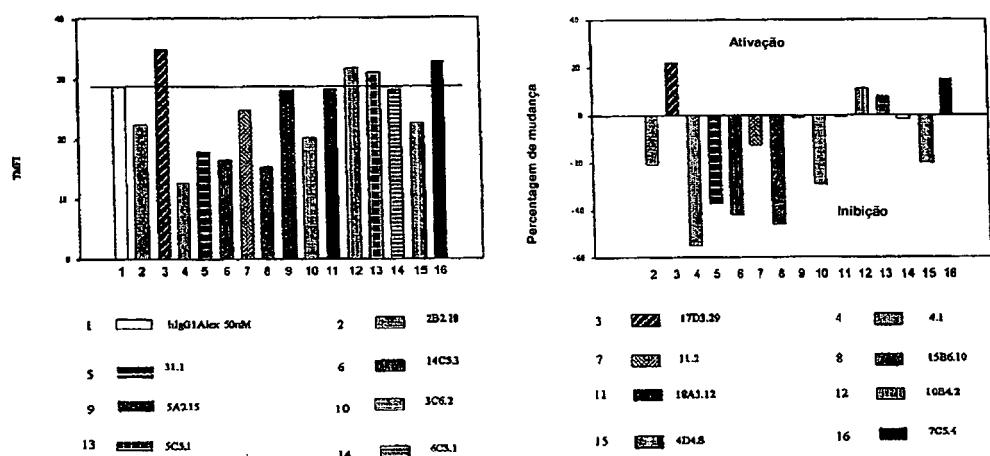


Figura 3A

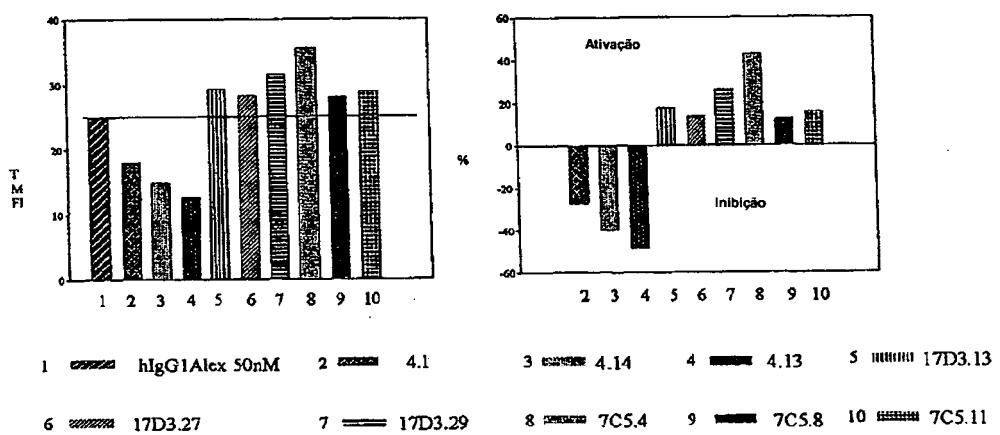
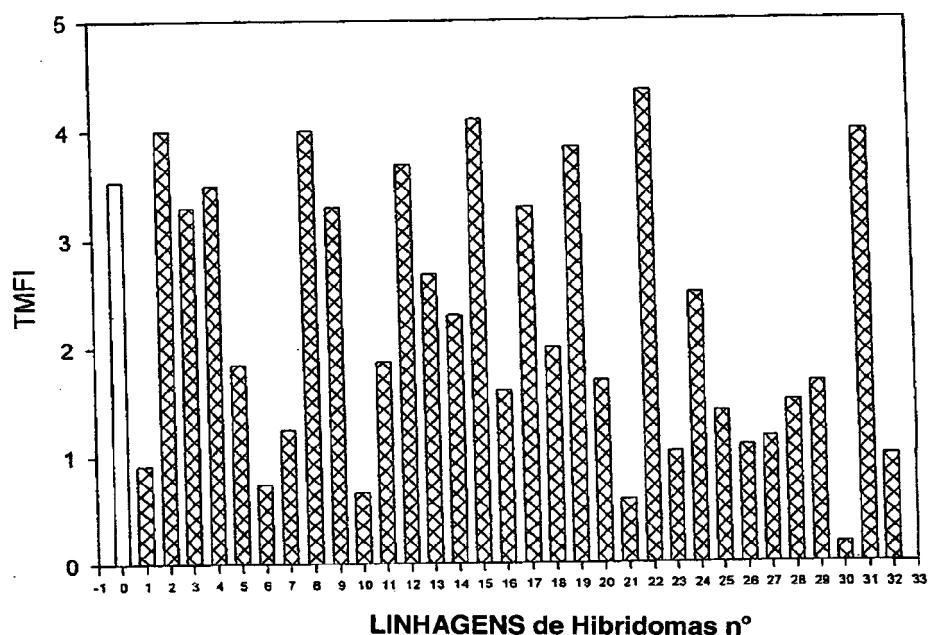


Figura 3B



0: TMFI do tubo contendo hIgG1 marcado com Alexa fluor 88 sozinho

1: TMFI de controle positivo 15B6.1 (anti-hFcRn bloqueando mAB da fusão n° 182

2-4, 6-7, 12-13, 15-17, 19-20, 22-28, 31-32: susp. mAB anti-hFcRn

5, 8, 10, 11, 14, 18, 21, 29 e 30: susp. mAB β-2M anti-humano

Figura 4A

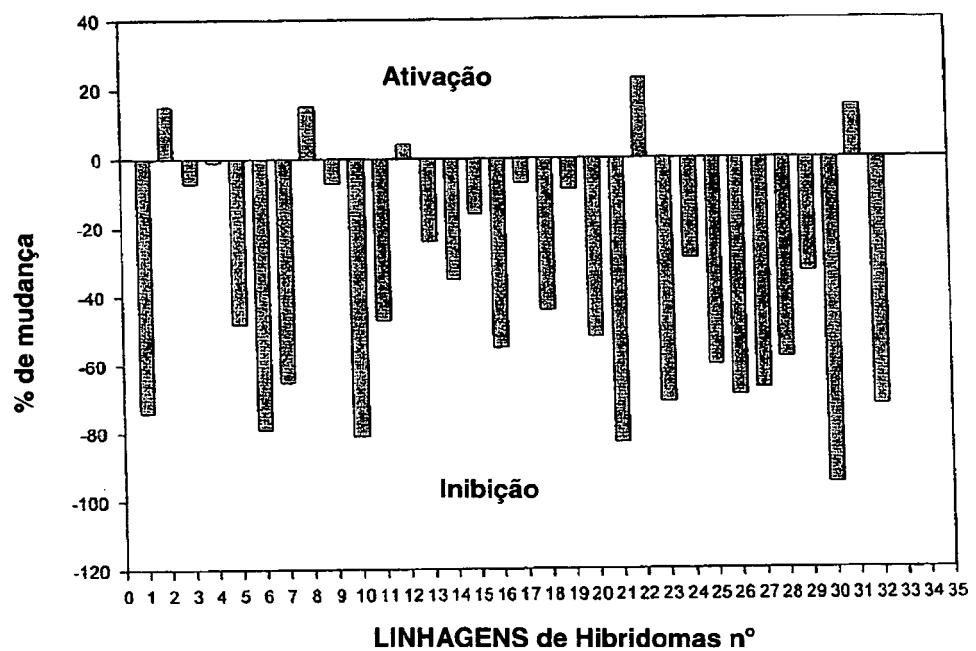
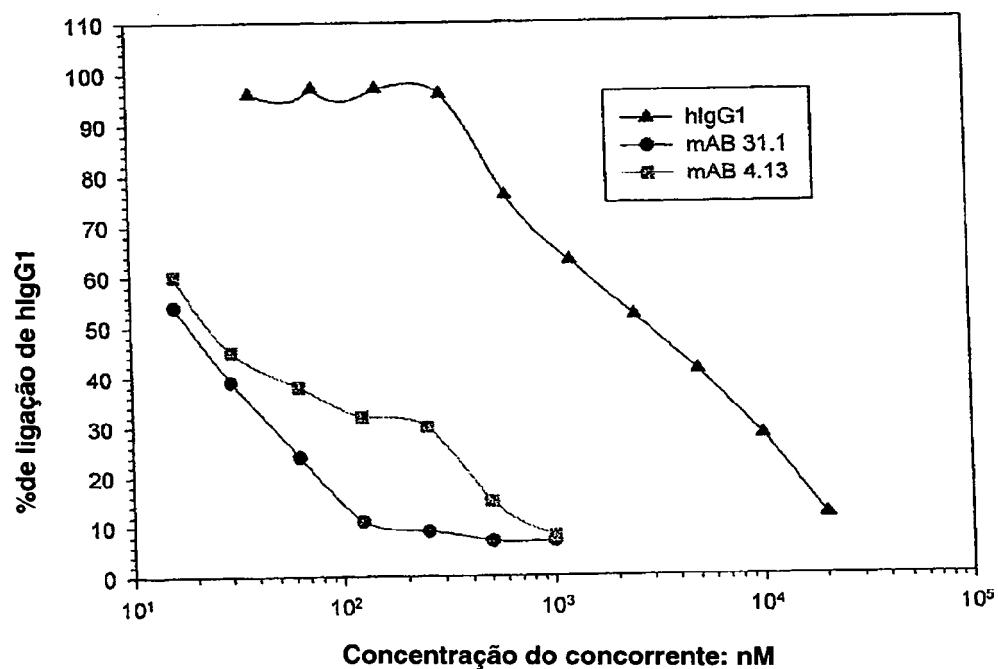
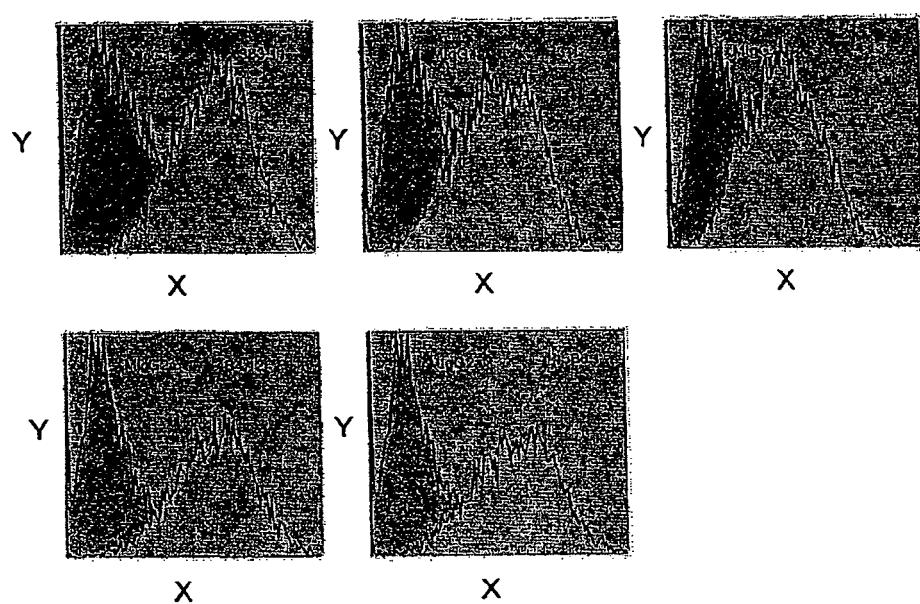


Figura 4B

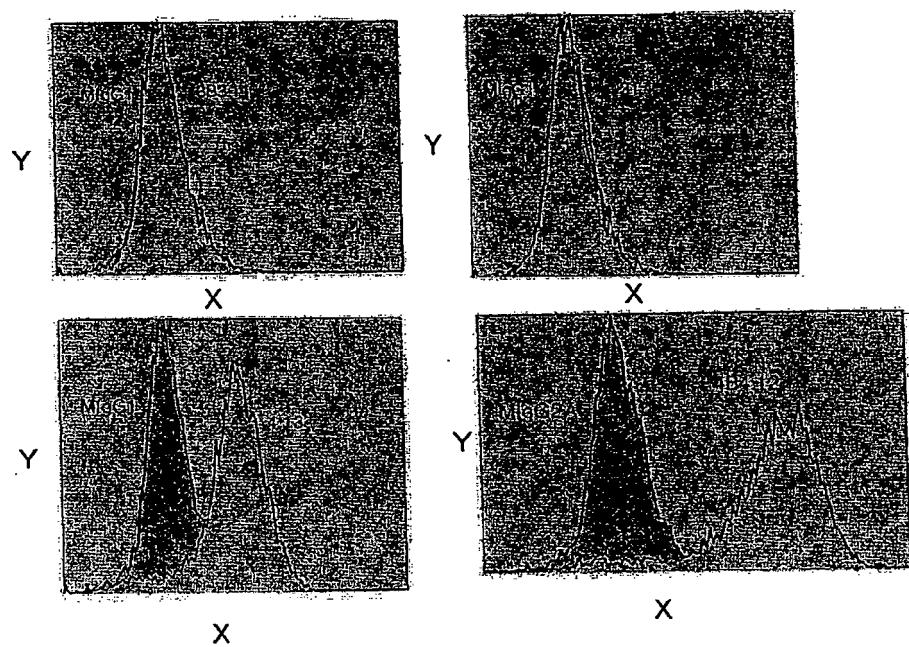


**Figura 5A**



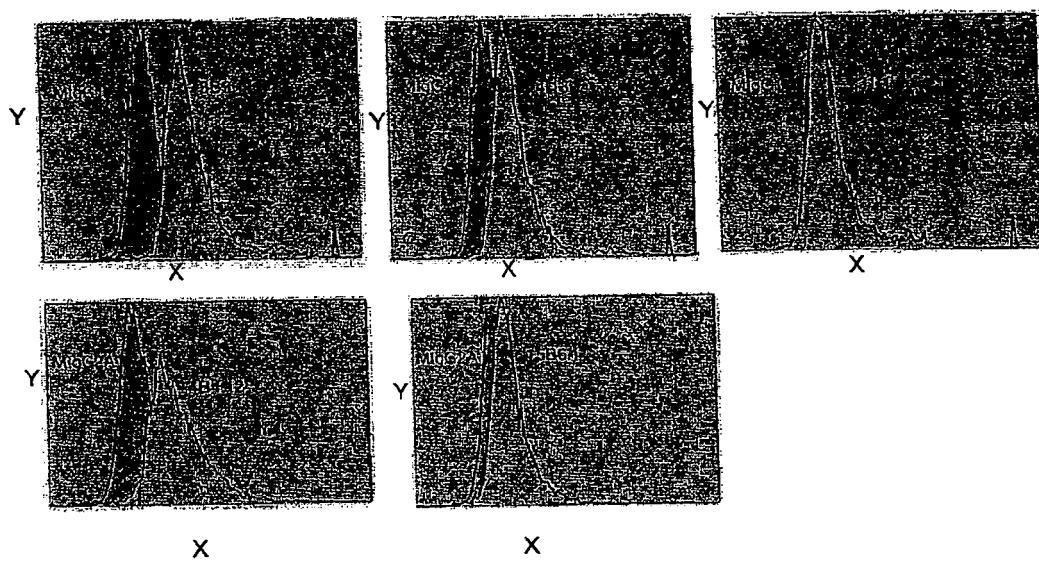
X é a intensidade fluorescente  
Y é o número de células

**Figura 6**



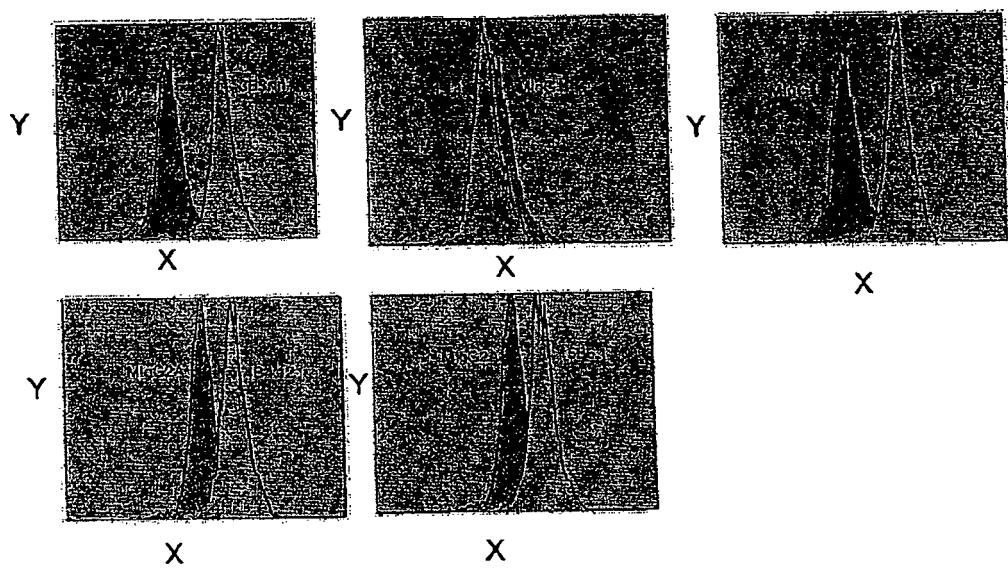
X é a intensidade fluorescente  
Y é o número de células

**Figura 7**



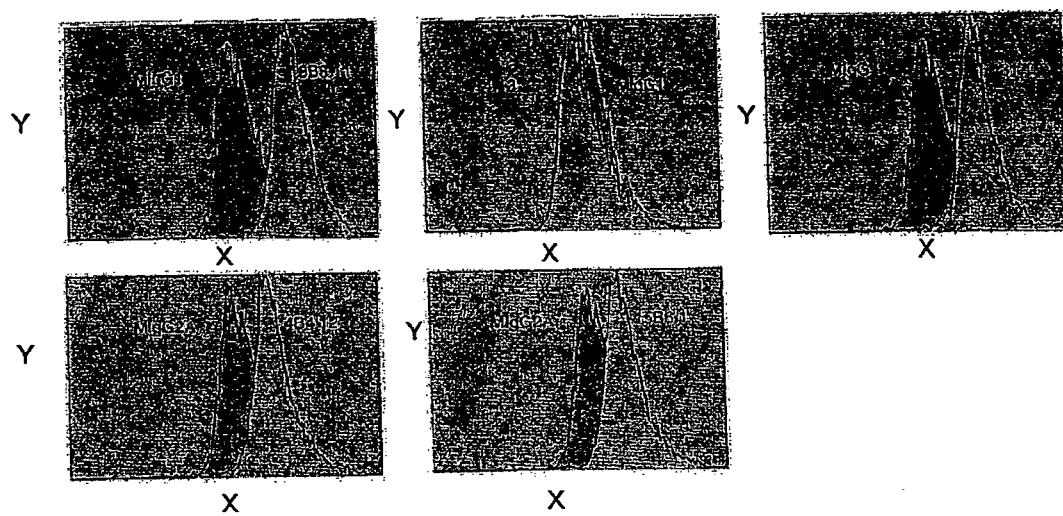
**X é a intensidade fluorescente**  
**Y é o número de células**

**Figura 8**



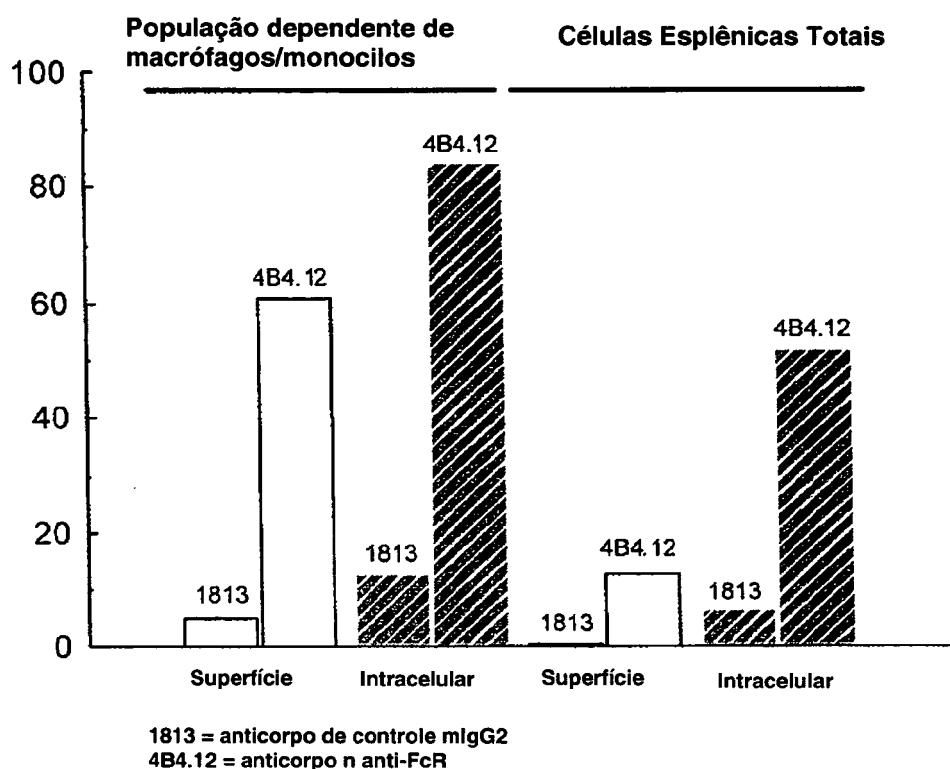
X é a intensidade fluorescente  
Y é o número de células

**Figura 9**



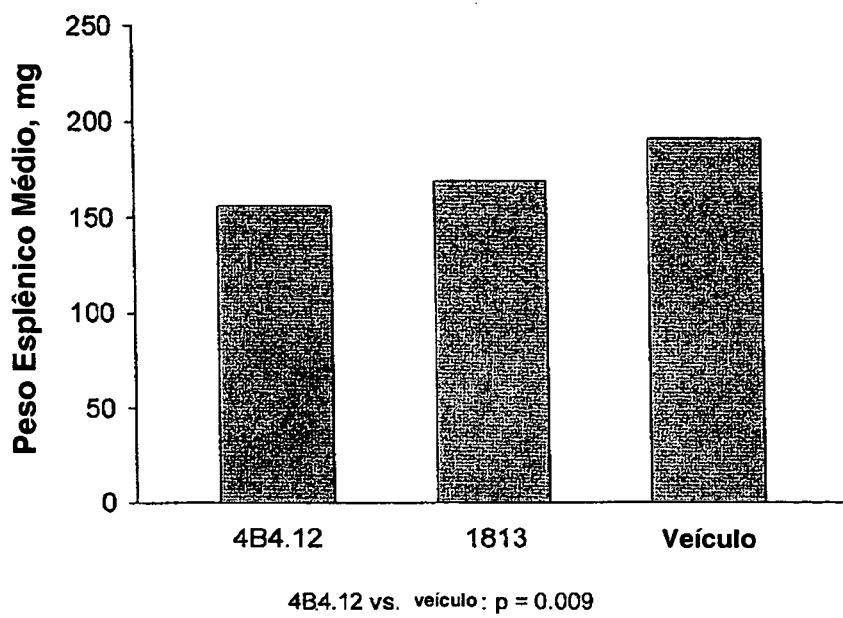
**X é a intensidade fluorescente  
Y é o número de células**

**Figura 10**

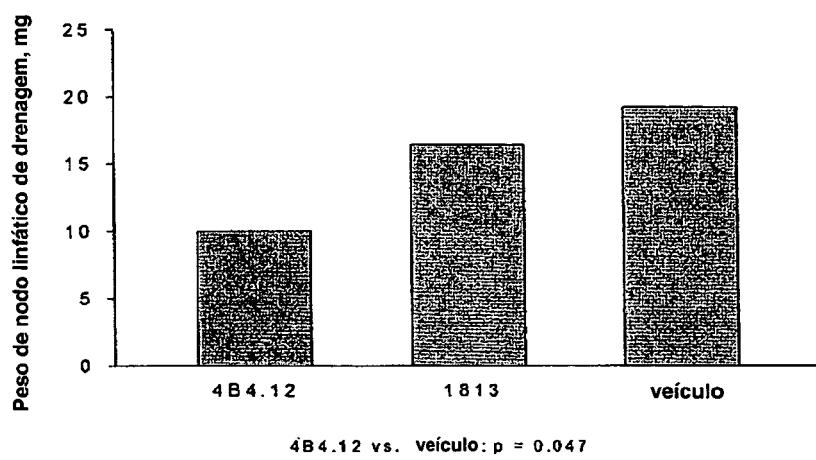


**Figura 11A**

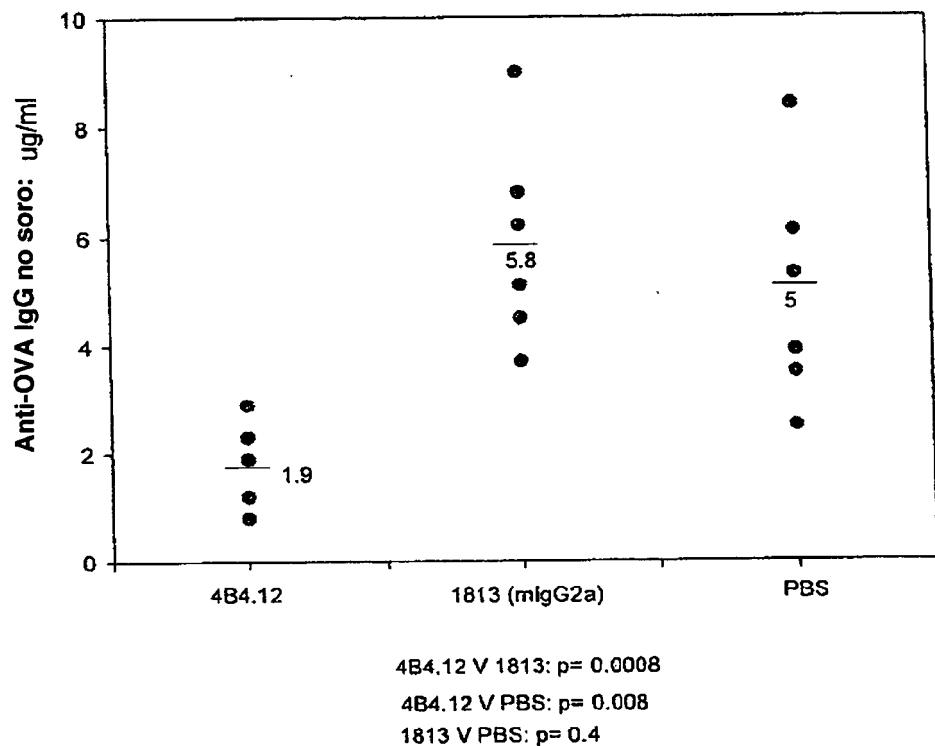
**Figura 11B**



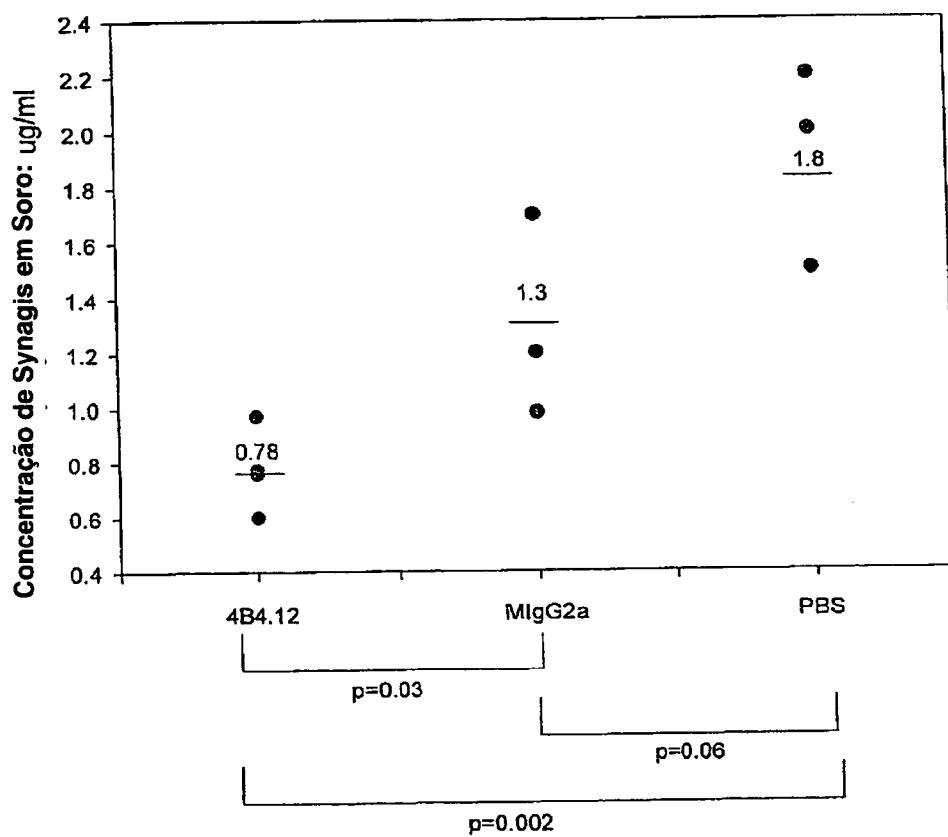
**Figura 12A**



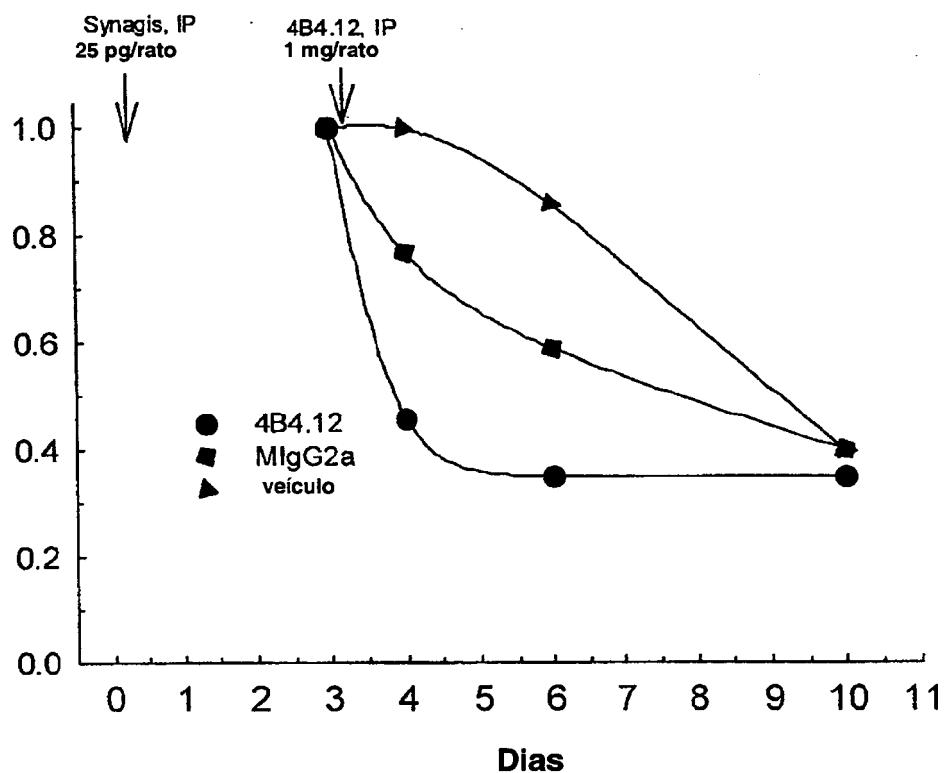
**Figura 12B**



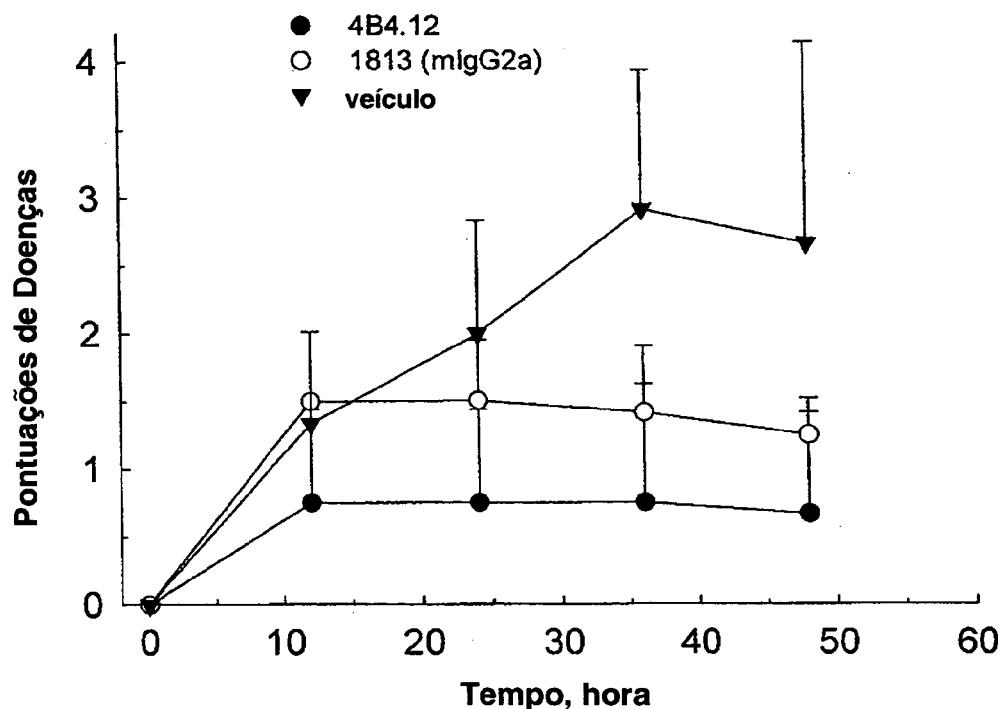
**Figura 13**



**Figura 14**

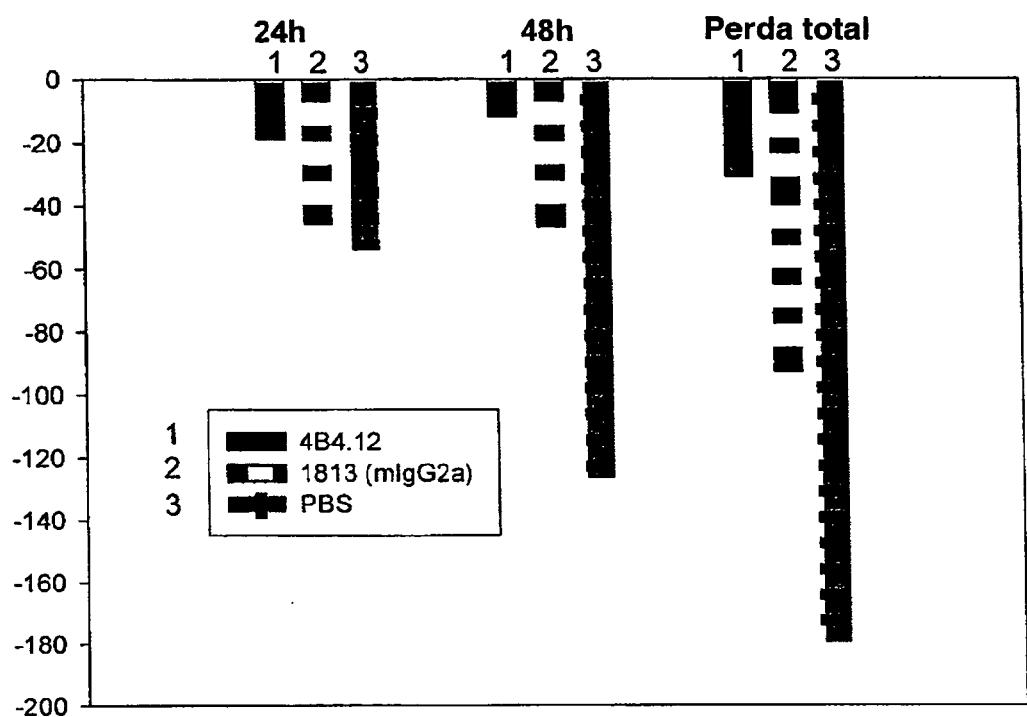


**Figura 15**



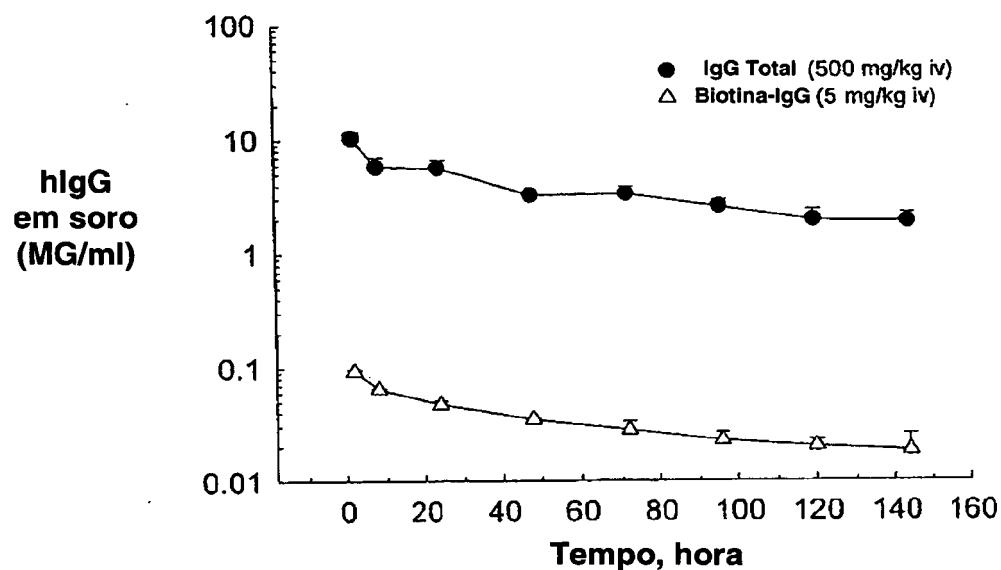
**Teste T do Aluno:**  
4B4.12 vs. 1813:  $p = 0,00001$   
4B4.12 vs. veículo:  $p = 0,006$   
1813 vs. veículo:  $p = 0,07$

**Figura 16**



**Figura 17**

**IgG Humano Intravenoso em Camundongo Tg32B**  
 (hFcRn +/+, h $\beta$ 2m +/+, mFcRn -/-, m $\beta$ 2m -/-)



	$t_{1/2}$ (hr)	Cmax (mg/ml)	AUC (hr*mg/ml)
Total IgG	78	10.41	739
Biotina IgG	87	0.093	7.19

**Figura 18**

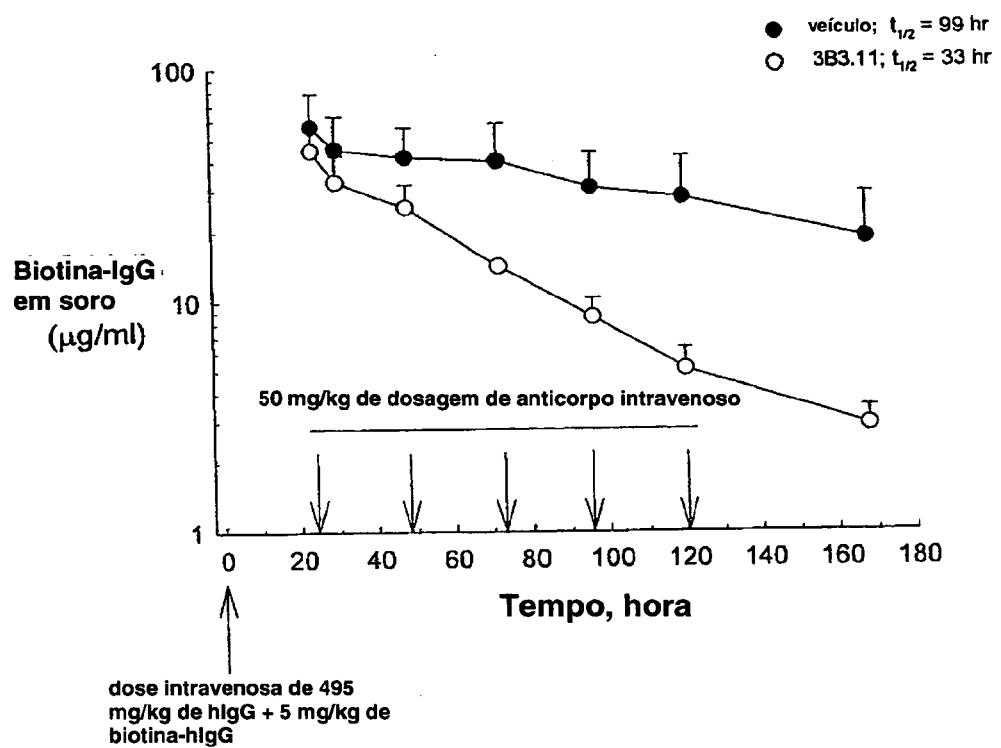
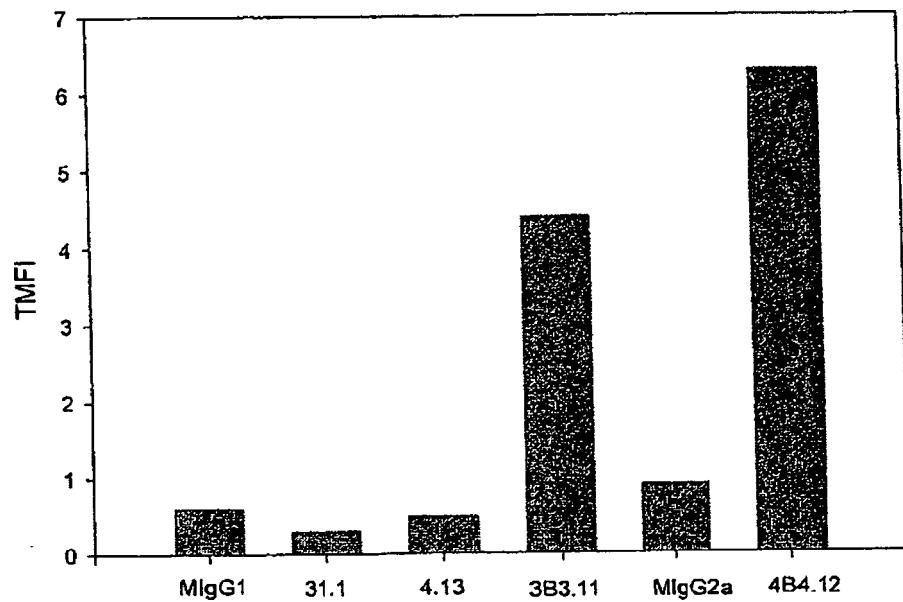
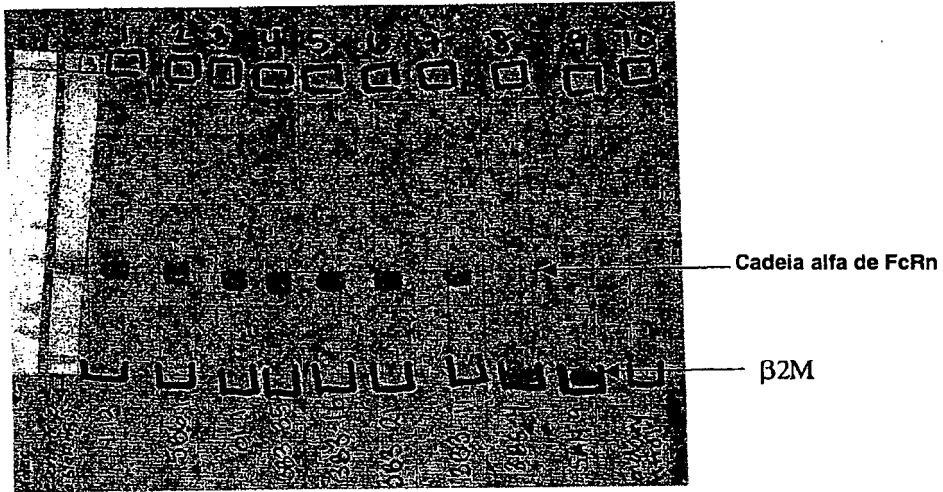


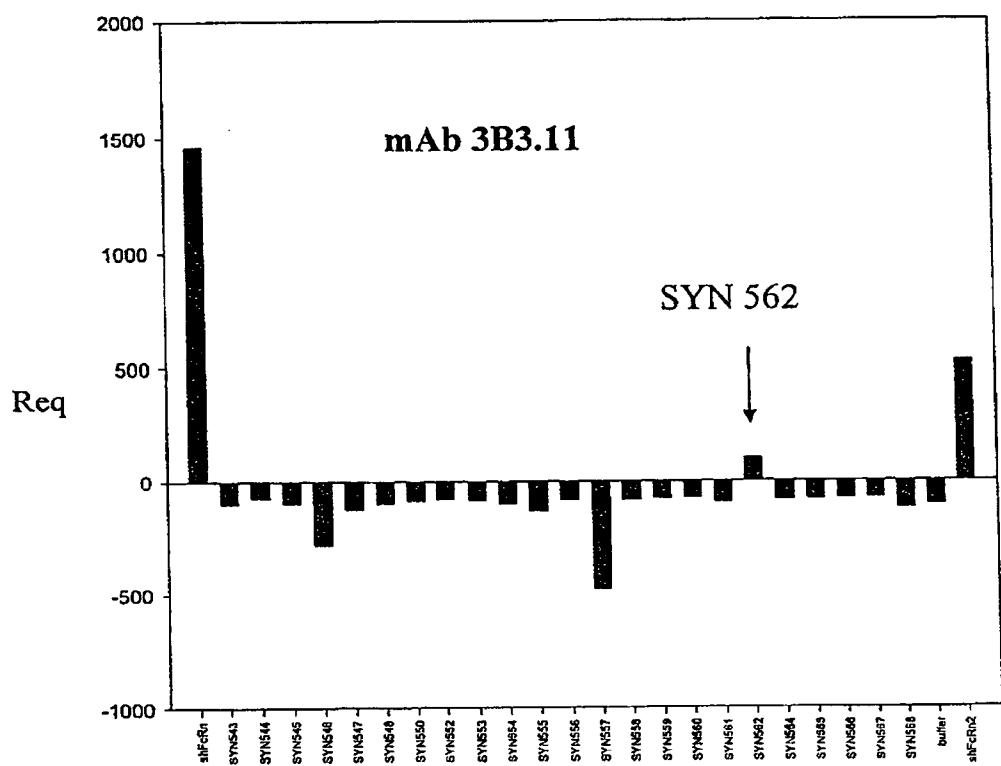
Figura 19



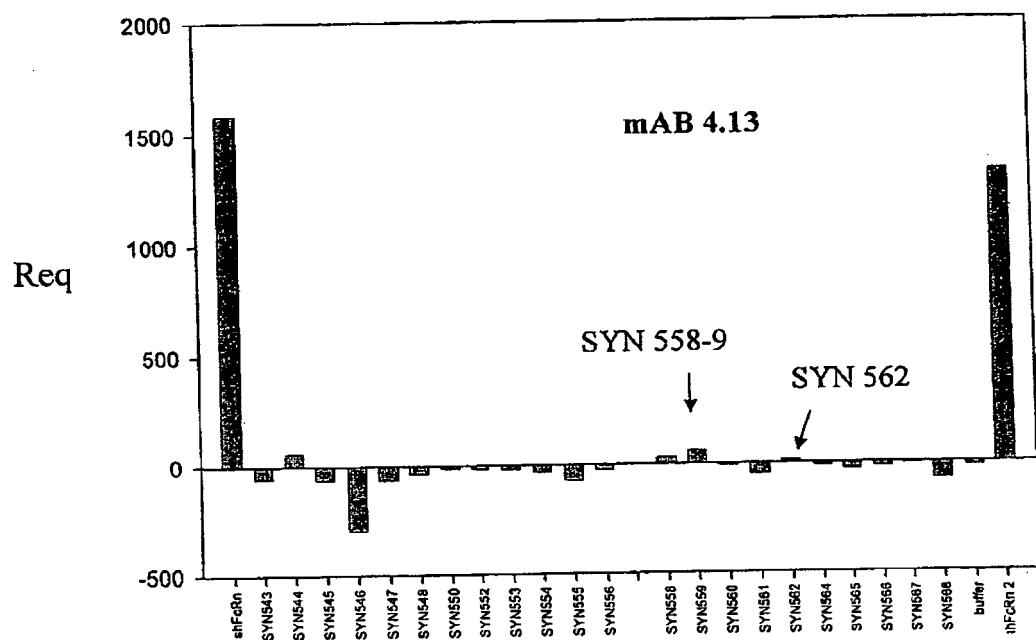
**Figura 20**



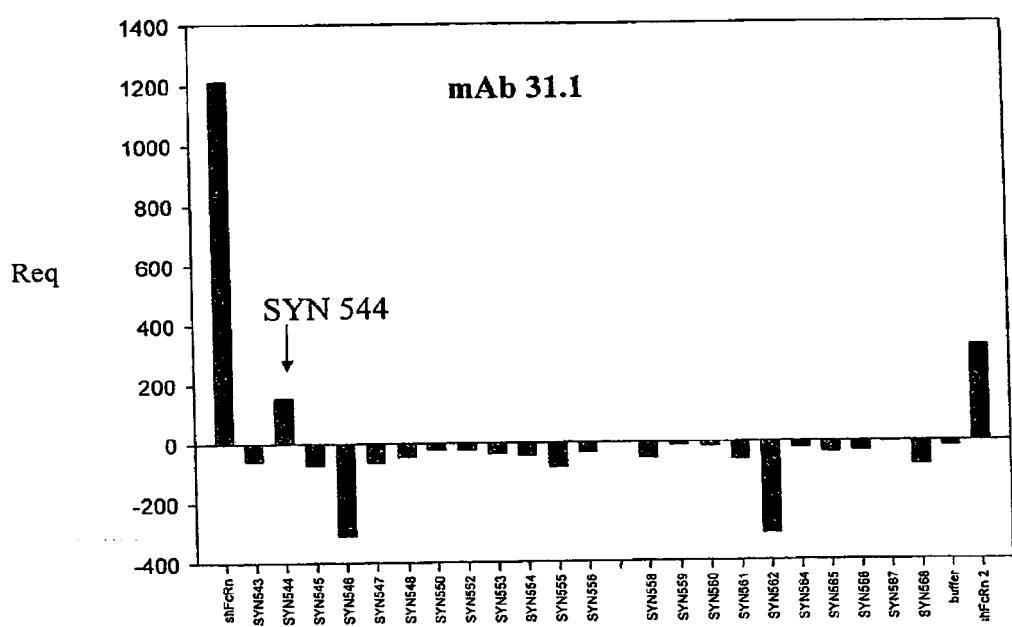
**Figura 21**



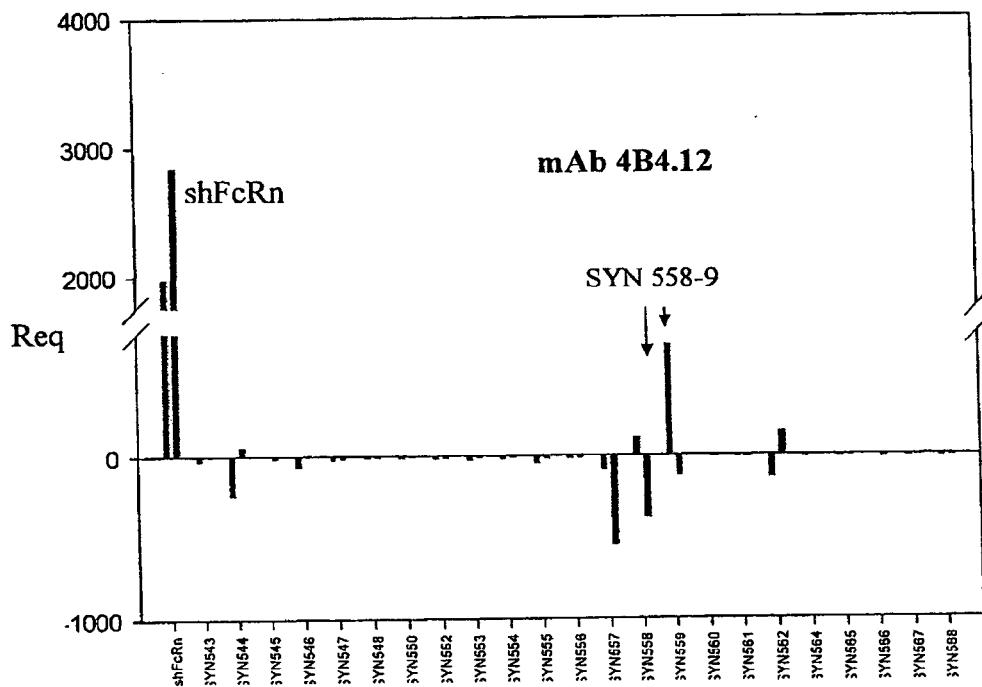
**Figura 22A**



**Figura 22B**

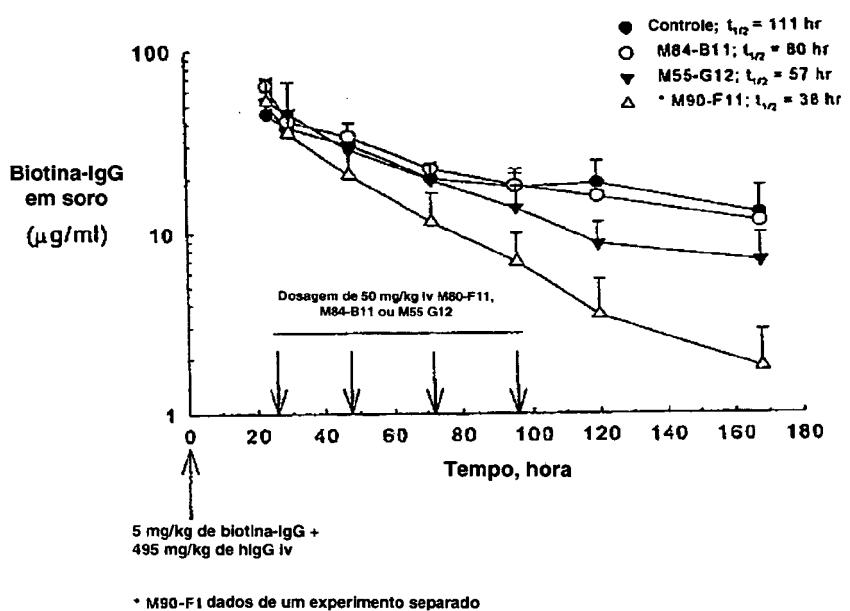


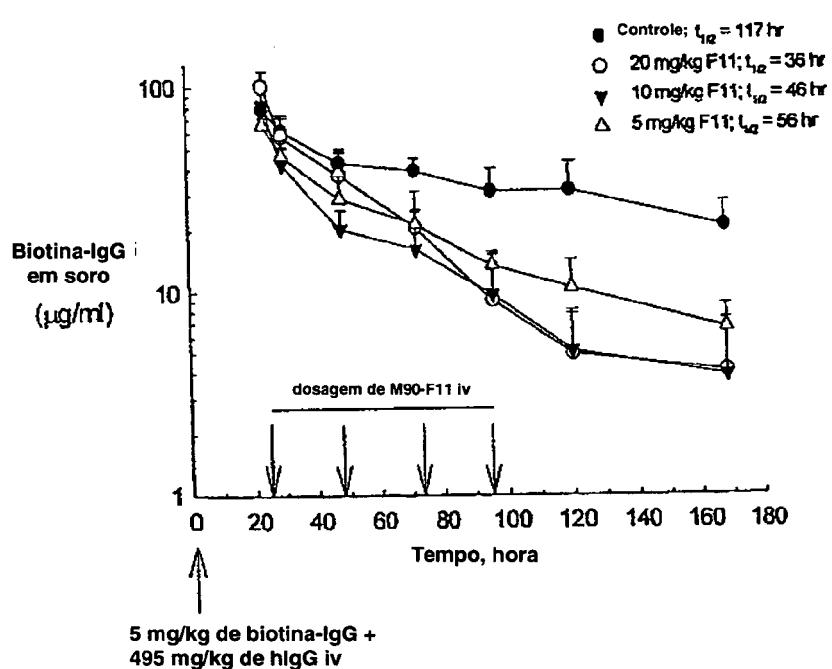
**Figura 22C**



**Figura 22D**

FIGURA 23



**FIGURA 24**

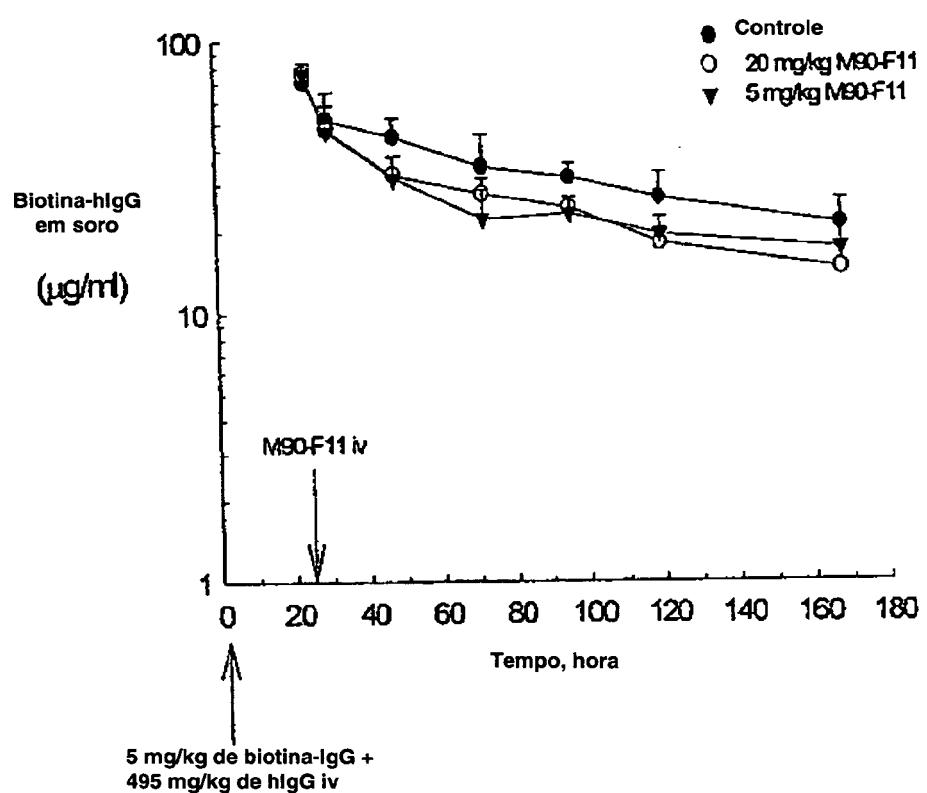
**FIGURA 25**

FIGURA 26

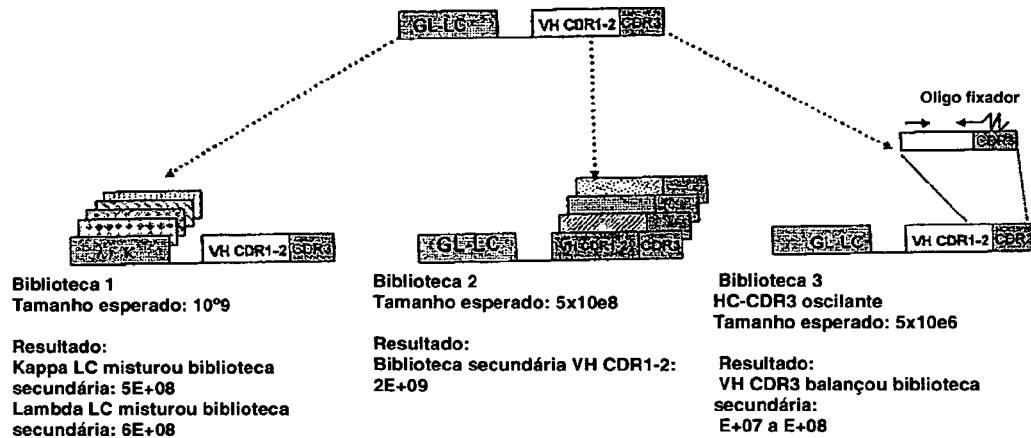
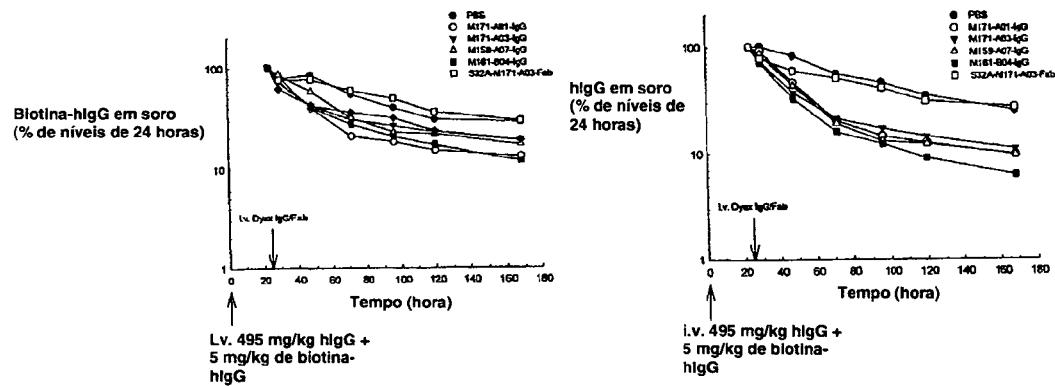
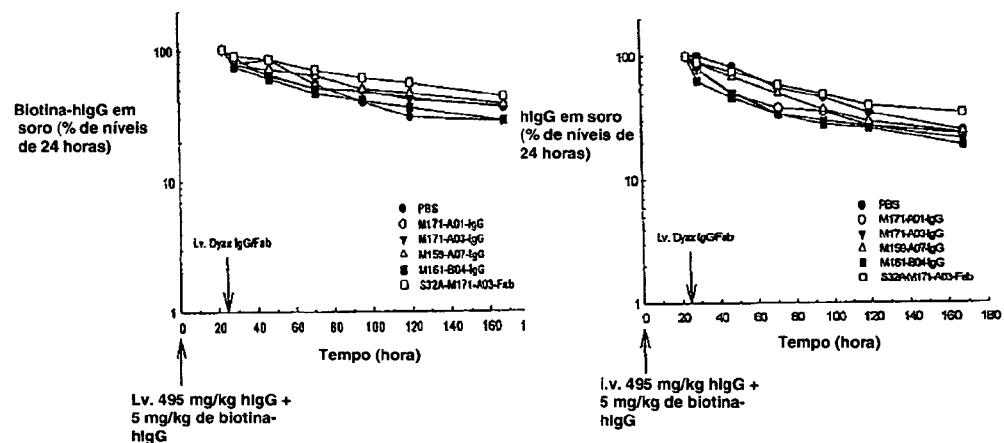


FIGURA 27



**FIGURA 28**

**FIGURA 29**

**532A-M0090-F11 (532A-R0004-E04)**  
**LEVE: V:VL2\_2b2; J:JL1**

FR1-L	CDR1-L	FR2-L	CDR2-L
532A-M0090-F11: QSVLTQASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQKYPGKAPKLIIY	GDSQRPS
LINHAGEM	QSALTQASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGSYNLVS	WYOQHPGKAPKLMIIY

FR3-L	CDR3-L	FR4-L
532A-M0090-F11: GLSSRFSGSKSGNSASLTISGLQAEDADYYCC	SYAGSGIYYV	FGSGTKVTVL
LINHAGEM	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCC	SYAGSSTFYV

532A-M0090-F11 (ID DE SEQ N° 177);  
 LINHAGEM GERMINATIVA: (ID DE SEQ N° 178)

---

-----  
 LC-lambda1

532A-M0090-F11-C  
 SPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYL

LINHAGEM GERMINATIVA-C:  
 GPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYL

532A-M0090-F11-C    SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (ID DE SEQ N° 179)  
 LINHAGEM            SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (ID DE SEQ N° 180)

-----  
 PESADO: V:VH3-23; J:JH4

FR1-H	CDR1-H	FR2-H	CDR2-H
532A-M0090-F11: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	EYAMG	WVRQAPGKGLEWVS	
SIGSSGGQTKY			
LINHAGEM	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
AISGGGGSTYY			

FR3-H	CDR3-H	FR4-H
532A-M0090-F11: ADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	LSTGEELY	WGQGTLVTVSS
LINHAGEM	ADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	Y WGQGTLVTVSS

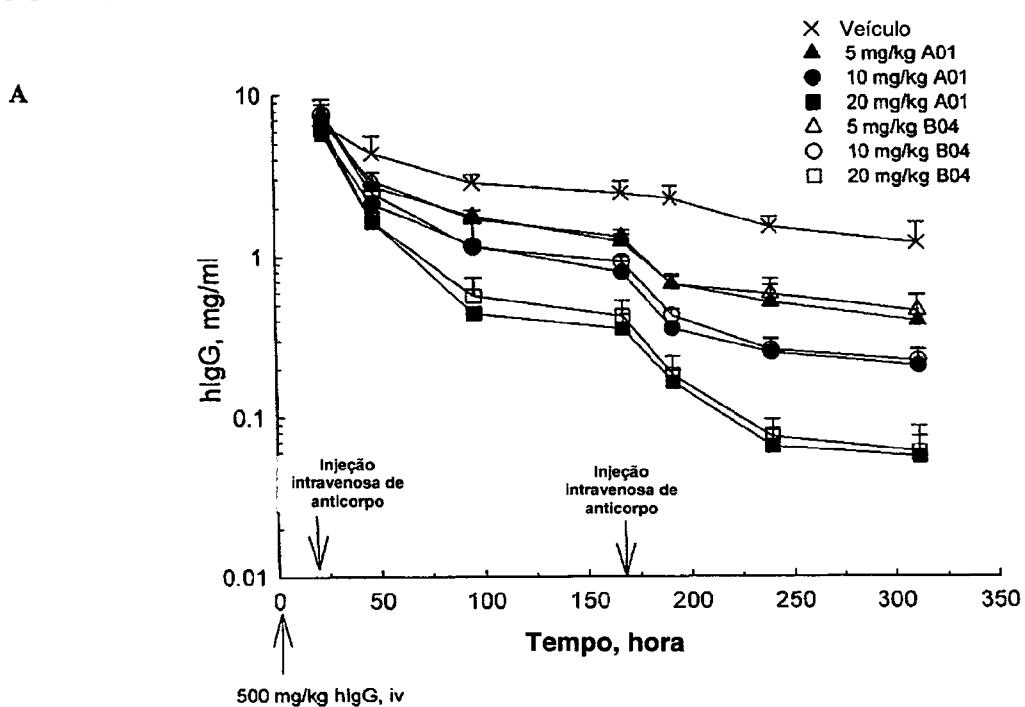
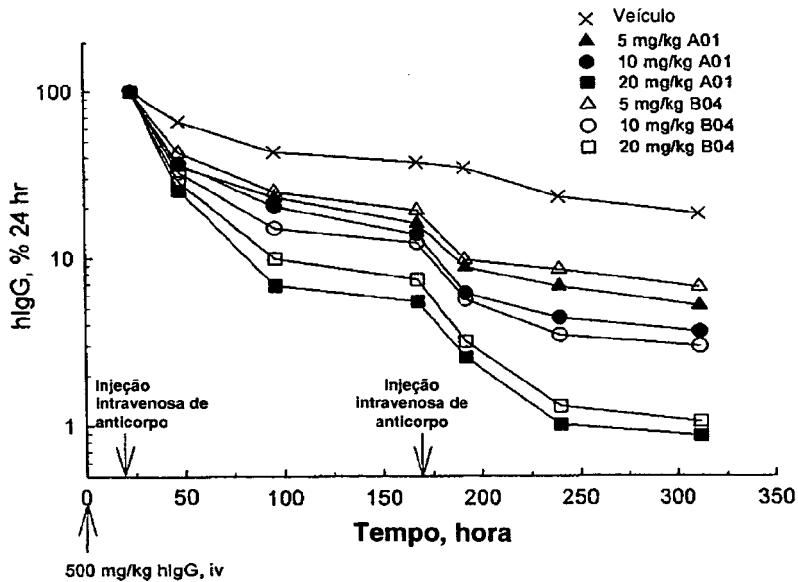
532A-M0090-F11 (ID DE SEQ N° 111);  
 LINHAGEM GERMINATIVA (ID DE SEQ N° 113);

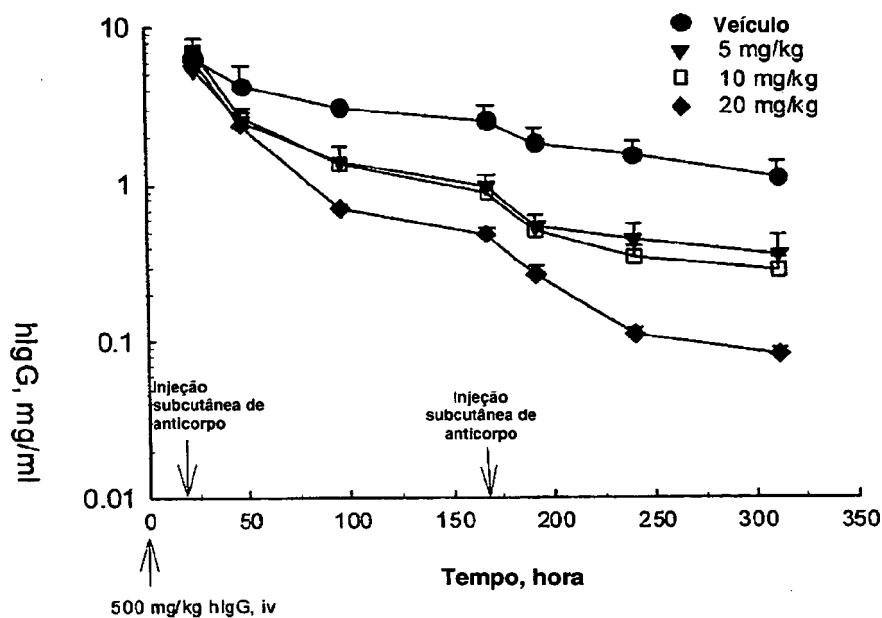
**FIGURA 30**

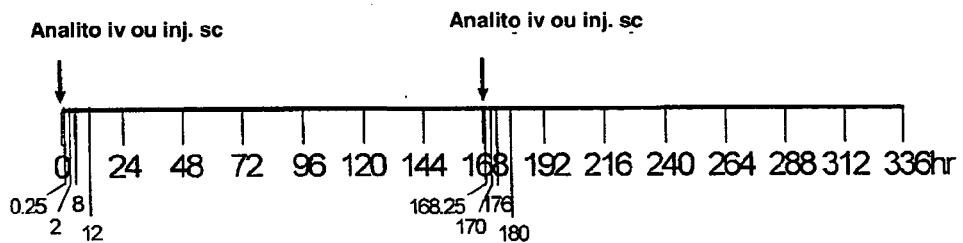
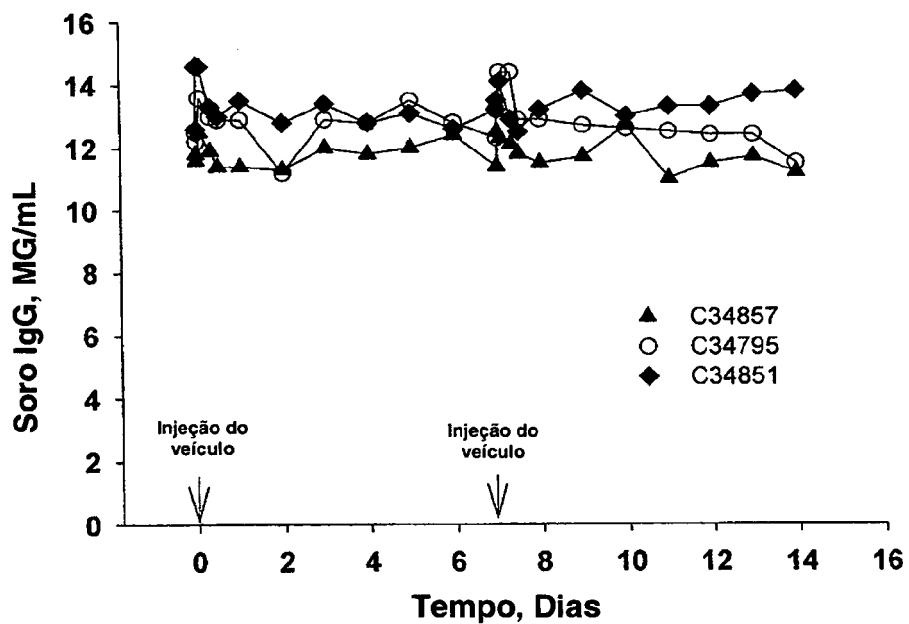
• (a, z) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTS  
• (f) -----  
• (a, z) GVHTFPAVLQSSGLYSISSLSSVTVPSQLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK-----R  
• (f) -----  
• (a, z) VEFKSCDKTHTCFFCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
• (f) -----  
• (a, z) DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
• (f) -----  
• (a, z) LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSPREPQVYT  
• (f) -----  
• (a, z) LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTPPVLD  
• (f) -----E-M-----  
• (a, z) SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\*  
• (f) -----

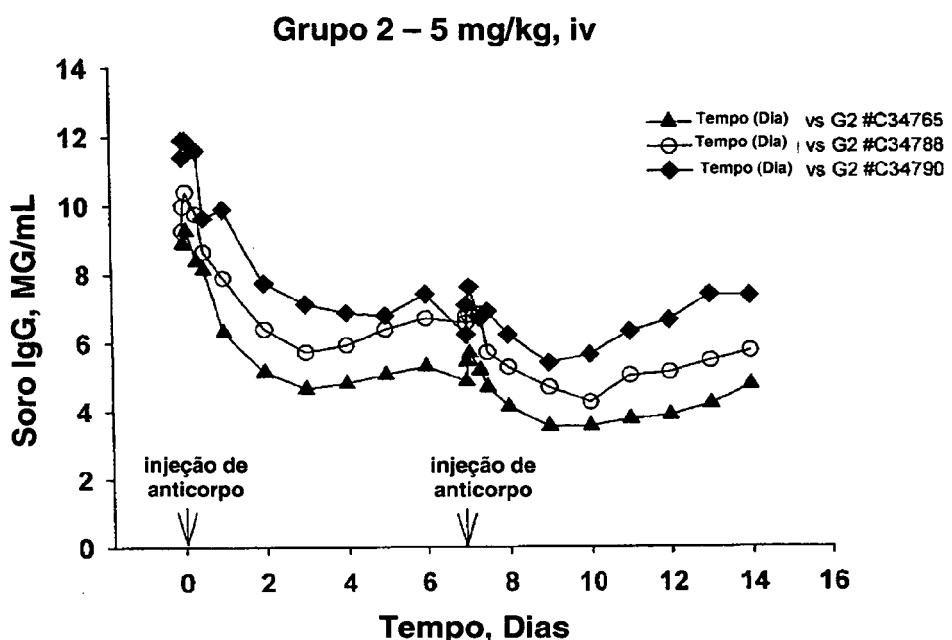
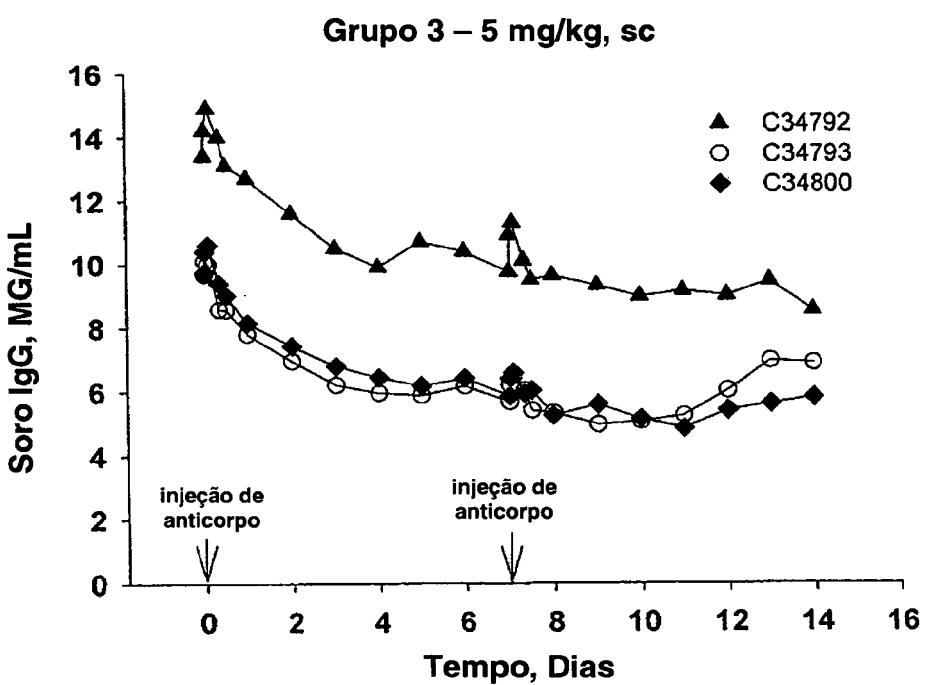
(a, z) (ID DE SEQ N° 115)

(f) (ID DE SEQ N° 116)

**FIGURA 31****Catabolismo de hIgG em Camundongo Tg32B****B****Catabolismo de hIgG em Camundongo Tg32B**

**FIGURA 32****Catabolismo de hIgG em Camundongo Tg32B**

**FIGURA 33****A****B****Grupo 1 - Controle**

**FIGURA 34****A****B**

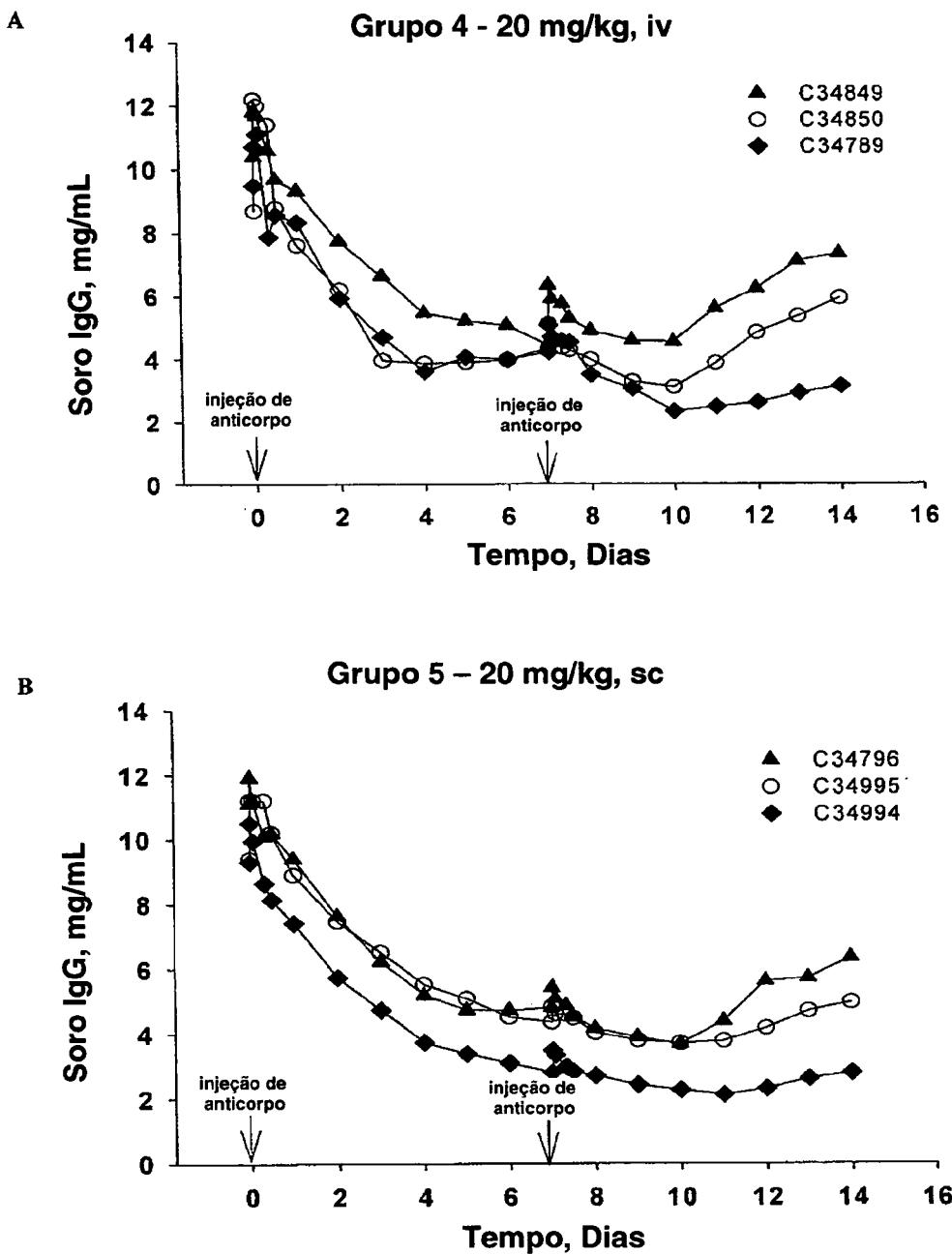
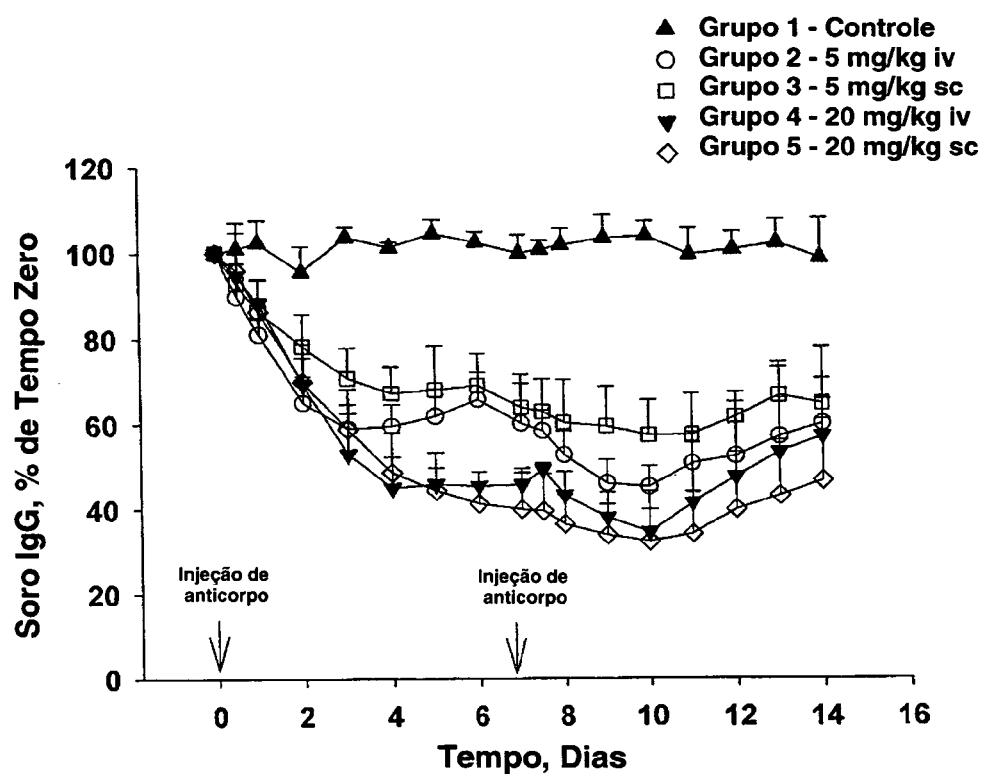
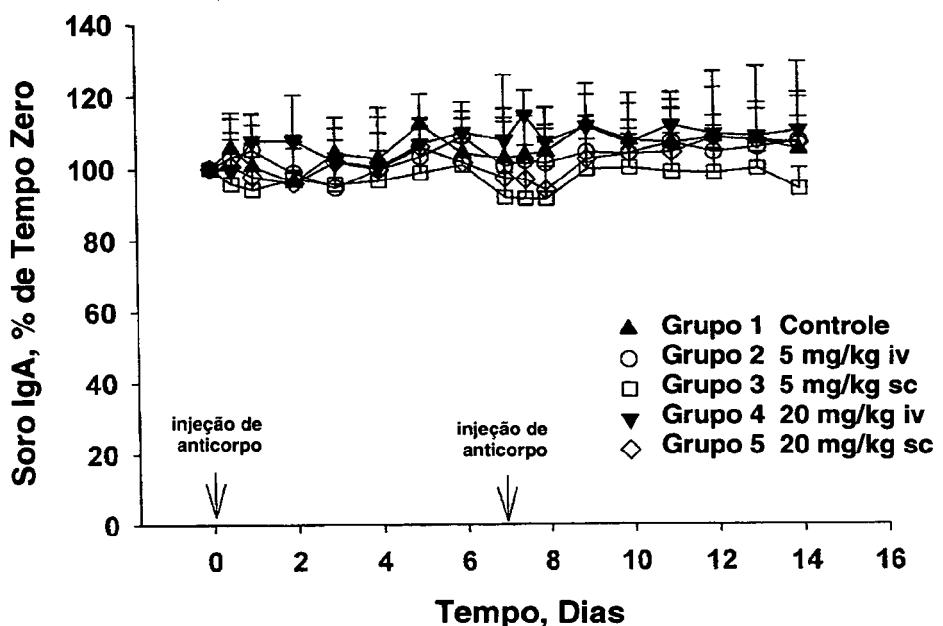
**FIGURA 35**

FIGURA 36



**FIGURA 37****A**

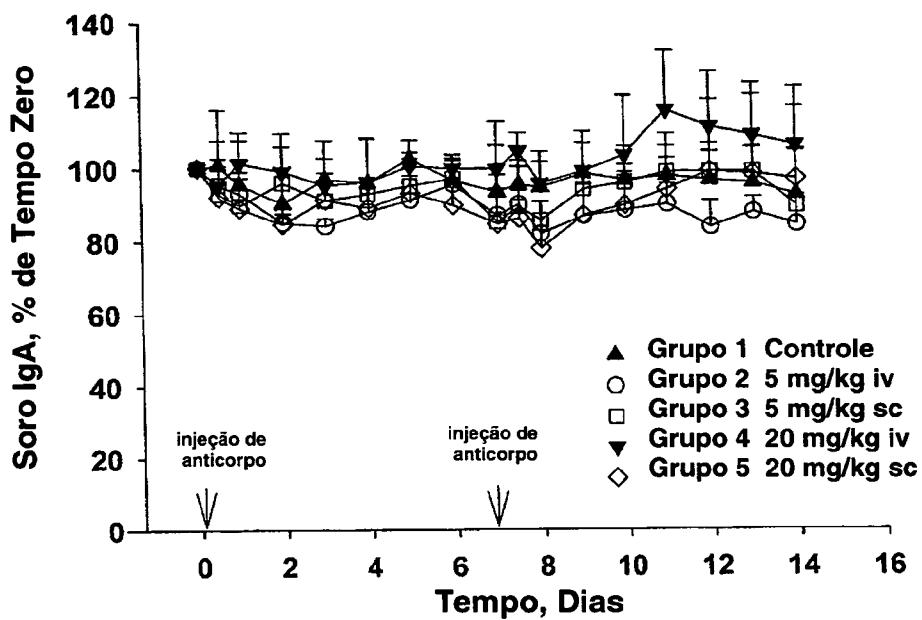
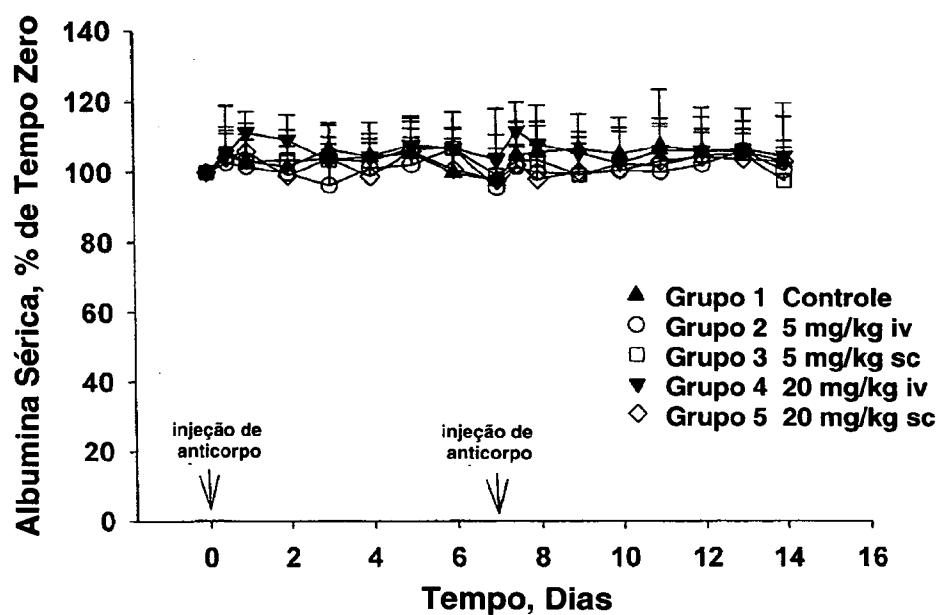
**FIGURA 37****B**

FIGURA 37

C



**FIGURA 38****DX-2504 (532A-M0161-B04)****Gene V Leve = VL2\_2b2; gene J = JL1**

LINHAGEM GERMINATIVA:	FR1-L	CDR1-L	FR2-L	CDR2-L
DX-2504:	QSALTQPASVSGSPGQSTITISC	[REDACTED]	WYQQHPGKAPKLMIY	[REDACTED]
	QSALTQPASVSGSPGQSTITISC	[REDACTED]	WYQQHPGKAPKLMIY	[REDACTED]

LINHAGEM GERMINATIVA:	FR3-L	CDR3-L	FR4-L
DX-2504:	GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC	[REDACTED]	FGTGTKVTVL
	GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC	[REDACTED]	FGTGTKVTVL

LINHAGEM  
GERMINATIVA:  
**ID DE SEQ N° 181) ; DX-2504 (ID DE SEQ N° 182)**

**Gene V Pesado = VH3-23; gene J = JH3**

CDR2-H LINHAGEM GERMINATIVA:	FR1-H	CDR1-H	FR2-H
DX-2504:	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	[REDACTED]	WVRQAPGKGLEWVS
	EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	[REDACTED]	WVRQAPGKGLEWVS

LINHAGEM GERMINATIVA:	FR3-H	CDR3-H	FR4-H
DX-2504:	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	[REDACTED]	WGQGTMVTVSS
	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	[REDACTED]	WGQGTMVTVSS

**LINHAGEM GERMINATIVA: (ID DE SEQ N° 183); DX-2504 (ID DE SEQ N° 184)****Alinhamentos Superiores contra seqüências de LINHAGENS Germinativas**

DX-2504: QSALTQPASVSGSPGQSTITISC	[REDACTED]	WYQQHPGKAPKLMIY	[REDACTED]
VL2_2b2: QSALTQPASVSGSPGQSTITISC	[REDACTED]	WYQQHPGKAPKLMIY	[REDACTED]
VL2_2e2: QSALTQPASVSGSPGQSVTISC	[REDACTED]	WYQQHPGKAPKLMIY	[REDACTED]
VL2_2a2: QSALTQPASVSGSPGQSTITISC	[REDACTED]	WYQQHPGKAPKLMIY	[REDACTED]
VL2_2c: QSALTQPPSASGSPGQSVTISC	[REDACTED]	WYQQHPGKAPKLMIY	[REDACTED]
VL2_2d: QSALTQPPSVSGSPGQSVTISC	[REDACTED]	WYQQPPGTAPKLMIY	[REDACTED]

DX-2504: GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC	[REDACTED]	FGTGTKVTVL
VL2_2b2: GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC	[REDACTED]	
VL2_2e2: GVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC	[REDACTED]	
VL2_2a2: GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC	[REDACTED]	
VL2_2c: GVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC	[REDACTED]	
VL2_2d: GVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC	[REDACTED]	

DX-2504: ID DE SEQ N° 185; VL2\_2b2: ID DE SEQ N° 186; VL2\_2e2: ID DE SEQ N° 187;  
VL2\_2a2: ID DE SEQ N° 188; VL2\_2c: ID DE SEQ N° 189; VL2\_d: ID DE SEQ N° 190;

## RESUMO

### "ANTICORPOS CONTRA FcRn E USOS DOS MESMOS"

Esta divulgação fornece, entre outras coisas, proteínas que se ligam a FcRn, por exemplo, imunoglobulinas, que inibem FcRn com alta afinidade e seletividade. As proteínas que se ligam a FcRn podem ser usadas para tratar uma variedade de distúrbios, incluindo 5 distúrbios autoimunes.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

**Código de Controle**

Campo 1



2ACA21F1ECCB5870

Campo 2



56622218F0C5EDBF

**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: 118234-0 Listagem de Sequencia.txt
- Data de Geração do Código: 17-12-2010
- Hora de Geração do Código: 14:10:00
- Código de Controle:
  - Campo 1: 2ACA21F1ECCB5870
  - Campo 2: 56622218F0C5EDBF