

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.07.10	(73) Titular(es): ADIENNE S.R.L.	
(30) Prioridade(s): 2002.07.11 IT MI20021527	VIA BROSETA 64/B 24128 BERGAMO	IT
(43) Data de publicação do pedido: 2005.05.11	(72) Inventor(es): FRANCESCO TEDESCO	IT
(45) Data e BPI da concessão: 2011.04.20 140/2011	ROBERTO MARZARI	IT
	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA	
	AV LIBERDADE, N.º. 69 1250-148 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-COMPONENTE C5 DO SISTEMA DE COMPLEMENTO E SUA UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A ANTICORPOS RECOMBINANTES DE ORIGEM HUMANA ESPECÍFICOS PARA O COMPONENTE C5 DO COMPLEMENTO ACTIVADO E CARACTERIZADO PELA CAPACIDADE DE INIBIR A CONVERSÃO DA CADEIA ALFA DE C5 A C5A E C5B. ALÉM DISSO, A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A SEQUÊNCIAS DE NUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAM TAIS ANTICORPOS E À UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA TANTO DO POLIPÉPTIDO COMO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEÓTIDOS, EM PARTICULAR PARA A TERAPÊUTICA DE DOENÇAS QUE ENVOLVEM LESÃO NO TECIDO QUE DERIVA DA ACTIVAÇÃO DESCONTROLADA DO SISTEMA DE COMPLEMENTO.

RESUMO**"ANTICORPOS ANTI-COMPONENTE C5 DO SISTEMA DE COMPLEMENTO E SUA UTILIZAÇÃO"**

A presente invenção refere-se a anticorpos recombinantes de origem humana específicos para o componente C5 do complemento activado e caracterizado pela capacidade de inibir a conversão da cadeia alfa de C5 a C5a e C5b. Além disso, a presente invenção refere-se a sequências de nucleótidos que codificam tais anticorpos e à utilização terapêutica tanto do polipéptido como das sequências de nucleótidos, em particular para a terapêutica de doenças que envolvem lesão no tecido que deriva da activação descontrolada do sistema de complemento.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS ANTI-COMPONENTE C5 DO SISTEMA DE COMPLEMENTO E SUA UTILIZAÇÃO"

CAMPO DA INVENÇÃO E ANTECEDENTES DA TÉCNICA

A activação do sistema de complemento (sistema C) representa um mecanismo importante na defesa imune. Ao mesmo tempo representa uma arma de dois gumes devido a que por um lado garante a protecção do hospedeiro, mas por outro lado é capaz de danificar tecidos quando se activa o complemento por várias circunstâncias patológicas. A susceptibilidade aumentada a infecções bacterianas e distúrbios auto-ímmunes observados nos pacientes com deficiências herdadas do sistema C claramente demonstra a importância particular deste sistema na protecção do hospedeiro contra agentes infecciosos e na eliminação de imunocomplexos. Estas funções protectoras resultam da activação do complemento em tipo cascata que gera produtos biologicamente activos. Alguns deles, tais como C1q, C3b e C3bi, opsonizam os agentes infecciosos permitindo sua eliminação. Em seu lugar outros, tais como C5a e C5b67, têm a função de recrutar células fagocíticas no lugar de inflamação ou lisar alvos sensíveis como no caso do complexo de ataque a membrana (MAC). Desafortunadamente estas moléculas, uma vez que são produzidas, não são capazes de diferenciar entre alvos endógenos e exógenos e provocariam lesão grave a tecidos e células se estes não estivessem protegidos por potentes inibidores de membrana ou extracelulares que agem em diversos níveis na cascata de activação do complemento. No entanto, a acção dos inibidores fica sobrecarregada em presença de uma activação massiva do sistema C, em doenças infecciosas graves ou distúrbios auto-ímmunes e o complemento activado provoca destruição do tecido e celular.

O fragmento C5a e o complexo terminal C (TCC) estão entre os produtos envolvidos na destruição do tecido em vários processos inflamatórios. Podem encontrar-se estes produtos de activação em níveis acima do normal em fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e em fluido cerebrospinal de pacientes com várias doenças do sistema nervoso central. Também foram encontrados níveis elevados de C5a em pacientes com politraumatismos assim como em pacientes com lesões de isquemia do miocárdio e reperfusão.

Portanto, agora se reconhece o papel de C5a no desenvolvimento destas doenças. Isto é demonstrado pelos sinais de stress pulmonar, hipotensão e leucopenia mostradas por animais que receberam injeção intravenosa desta anafilatoxina. Além disso, a instilação nos brônquios de C5a é capaz de induzir reacções inflamatórias fortes em pulmão de coelho.

O TCC é gerado a partir do fragmento C5b libertado por clivagem enzimática de C5 pela acção de C5 convertase. Recentemente foi demonstrado que TCC induz inflamação devido à lesão do tecido derivada de sua actividade lítica e de numerosos efeitos não citotóxicos sobre fagócitos e outros tipos celulares.

O TCC foi identificado em vários tecidos em diversas afecções patológicas, incluindo artrite reumatóide, glomerulopatia, esclerose múltipla, neuropatias periféricas desmielinizantes, aterosclerose e enfarte de miocárdio. O desenvolvimento de modelos animais experimentais destas doenças com deficiências selectivas em componentes C tardios contribuiu adicionalmente a definir o papel de estes componentes no desenvolvimento de lesão do tecido.

Devido ao papel fundamental desempenhado por C5a e TCC em promover a inflamação crónica e a lesão do tecido, foram realizadas várias tentativas para neutralizar os componentes tardios do complexo C como estratégia terapêutica para prevenir estas complicações em doenças

associadas a activação de C5. Esta molécula resulta ser um alvo terapêutico ideal, já que sua neutralização inibe a sequência tardia de eventos de activação da cascata, sem interferir com a actividade opsonizadora dos componentes precoces desta cascata. Anticorpos monoclonais de ratinho específicos para C5 humano, de ratinho e de rato e capazes de inibir a produção de C5a e do complexo de ataque a membrana (MAC) já estão disponíveis no mercado. Os anticorpos anti-C5 foram utilizados com sucesso em ratinhos para evitar o desenvolvimento de artrite induzida por colagénio e para melhorar o ciclo clínico de glomerulonefrite, e em ratos para reduzir isquemia do miocárdio e reperfusão.

Nos últimos anos foram produzidos dois anticorpos de cadeia simples (anticorpo de cadeia simples ou fragmento variável de cadeia simples, scFv) ambos dos quais são descritos na Pedido de Patente WO 95/29697. Estes anticorpos são capazes de penetrar tecidos mais rapidamente que o anticorpo completo. O primeiro anticorpo de cadeia simples obtido por montagem de regiões variáveis de um anticorpo de ratinho para C5 conserva a capacidade do anticorpo original de inibir a montagem do MAC e bloquear parcialmente a produção de C5a (Evans, M. J e col, 1995, Mol. Immunol. 32:1183). Além disso, este anticorpo é capaz de prevenir os depósitos de C5b-9 no coração com reperfusão de plasma humano ou em insuficiência cardíaca. O segundo scFv é um anticorpo de ratinho humanizado anti-C5 que é obtido por inserção de regiões CDR murinas (regiões determinantes de complementaridade) na estrutura da região variável das cadeias leve e pesada humanas. Este anticorpo (Thomas, T. C. et al., 1996, Mol. Immunol. 33:1389) é capaz de inibir a formação de C5a e C5b-9 embora o epítipo reconhecido mapeado ao redor dos aminoácidos 860-865 da molécula C5 e que corresponde ao péptido KSSKC, resulta estar longe do lugar de clivagem de C5 convertase. Além

disso, estudos posteriores (Fitch, J. C. *et al.*, 1999, *Circulation* 100:2499) demonstraram que este anticorpo é capaz de inibir a actividade hemolítica do complemento, atenuar a lesão do miocárdio, lesão cognitiva e hemorragia pós-operatória num grupo de pacientes com derivação cardiopulmonar.

O documento W002/30985 A revela inibidores de C5, que inibem activação de células endoteliais de tipo II, em que a inibição se manifesta pela supressão de E-selectina. Estes inibidores são úteis no tratamento de rejeição de xenoenxertos retardado ou rejeição vascular aguda. Os inibidores incluem moléculas de anticorpo, assim como homólogos, análogos e formas modificadas ou derivadas dos mesmos, incluindo fragmentos de imunoglobulina tais como Fab, F(ab')₂ e Fv, moléculas pequenas, incluindo péptidos, oligonucleótidos, peptidomiméticos e compostos orgânicos. Foram gerados exemplos de anticorpos monoclonais que se ligam a e inibem C5, e são designados MAb 137-76 e MAb 137-30. O documento não especifica o lugar de ligação a anticorpo.

SUMÁRIO

De acordo com um aspecto da invenção, proporciona-se o anticorpo de acordo com a reivindicação 1. Portanto, o principal aspecto da invenção refere-se a um anticorpo de origem humana específico para o componente C5 de complemento activado e caracterizado pelo facto de que inibe a clivagem da cadeia alfa de C5 em C5a e C5b. Em particular, o anticorpo é recombinante e reconhece um epítopo que compreende o lugar proteolítico para a C5 convertase na cadeia alfa do componente de complemento C5.

De acordo com uma forma de realização preferida, o anticorpo recombinante é composto de uma cadeia simples (scFv) que compreende uma região variável da cadeia leve ligada covalentemente com uma região variável da cadeia pesada e, de acordo com um aspecto ainda mais preferido, é

composto de ou compreende ambas as sequências de aminoácidos identificadas como SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4 ou proteínas que têm pelo menos 95% de homologia com a sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID N°: 6 de acordo com a reivindicação 1.

De acordo com um aspecto adicional, a invenção inclui as sequências de nucleótidos isoladas que codificam anticorpos específicos para o componente C5 de complemento activado de acordo com as reivindicações 1 a 9 e em particular que compreendem SEQ ID N°: 5. Um aspecto adicional da invenção refere-se a os vectores que contêm as sequências anteriormente mencionadas. De acordo com um aspecto adicional, a invenção refere-se à utilização terapêutica dos anticorpos, proteínas e sequências de nucleótidos reivindicados para a preparação de fármacos que previnem e tratam doenças que envolvem a activação descontrolada do sistema de complemento, em particular artrite reumatóide, glomerulonefrite, esclerose múltipla, neuropatias periféricas desmielinizantes, aterosclerose.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Avaliação da capacidade de clones anti-C5 scFv Ts-a12 e Ts-a12/22 para inibir a formação de fragmento C5a por meio de um ensaio ELISA (painel A) e um ensaio hemolítico (painel B).

Painel A) O ensaio ELISA mede a quantidade de fragmento C5a libertado no sobrenadante depois de clivagem enzimática de C5, utilizando anticorpos anti-C5 como é descrito no exemplo 6. A incubação de C5 com anticorpos Ts-a12 e Ts-a12/22 da invenção inibe a formação do fragmento C5a. Foram adicionados eritrócitos de ovelha sensibilizados com anticorpos e revestidos até a etapa de complemento C3b (EAC1-3b) à mistura de TS-A12 ou TS-A12/22 e C5, e a mistura foi incubada adicionalmente durante 30 minutos a 37 °C (painel B). Como é mostrado na Figura 1 A e B, os anticorpos TS-A12

e TS-A12/22 inibem a clivagem de C5 por C5 convertase e, portanto, inibem a formação de C5a (Painel A) e de TCC (Painel B).

Símbolos: - ▲ -: Ts-A12/22; - ■ - scFv não relacionado; - ◇ - TS-A12.

Figura 2. Imunotransferência para identificar a cadeia C5 reconhecida por scFv TS-A12/22.

As cadeias alfa e beta de c5 foram separadas por meio de electroforese por meio SDS-PAGE em poliacrilamida a 10% e depois foram transferidos a nitrocelulose. A imunotransferência (pistas 1 e 2) foi desenvolvida com anticorpo TSA-12/22 e foi revelada por incubação com anticorpo monoclonal anti-SV5 (etiqueta SV5) seguida de incubação com um anticorpo de cabra anti-IgG de ratinho marcado com fosfatase alcalina. Pista 1: 100 ng de cadeia alfa de C5; pista 2: 100 ng de cadeia beta; pista 3: mistura das duas cadeias. A imunotransferência na pista 3, utilizada como um controlo positivo, foi desenvolvida com um anticorpo de cabra anti-C5 humano conjugado com biotina que reconhece as cadeias tanto alfa como beta e foi revelada com avidina marcada com fosfatase alcalina. Pode ser visto que scFv TSA-12/22 reconhece a cadeia alfa de C5 na pista 1, mas não a cadeia beta na pista 2.

Figura 3. Inibição da ligação de C5 e scFv da invenção pelo péptido P5A-18 (KDMQLGRLHMKTLTPVSK) que compreende o lugar de clivagem de C5 convertase.

Foram incubadas misturas de scFv TSA-12/22 (1 µg/ml) que continham 200, 400 e 800 ng de péptido P5A-18, com a sequência KDMQLGRLHMKTLTPVSK, que compreende o lugar de clivagem de C5 convertase ou 800 ng de péptido não relacionado CS5, derivado de fibronectina (GEEIQIGHIPREDVDYHLYP SEQ ID N° 16 da lista de sequências) ou 3,5 µg de fragmento C5a ou solução salina (controlo) como é descrito no exemplo 8. A ligação do

anticorpo, pré-incubado em diferentes condições, foi avaliada por ensaio imunoenzimático utilizando C5 em fase sólida. A inibição pelo péptido P5A-18 da ligação entre scFv da invenção e C5 é dependente da dose, variando entre 45% e 90% para concentrações de péptido de 200 e 800 ng, respectivamente. Estes valores correspondem a uma K_i de 1 μM para o péptido P5A-18. Não foi observada inibição utilizando C5A ou o péptido não relacionado.

Figura 4. Inibição de actividade hemolítica de C5 pelo anticorpo TS-A12/22.

Valores de leitura espectrofotométrica realizada a 412 nm para medir a inibição de lise de eritrócitos de ovelha revestidos com EAC1-3b, através da via de activação do complemento clássica (Painel A); ou de eritrócitos de coelho para medir a via alternativa de activação do complemento (Painel B). Foram misturadas quantidades crescentes de C5 com 600 ng do anticorpo scFv da invenção com um scFv não relacionado ou com GVBS em que o scFv da invenção foi solubilizado, como é descrito no exemplo 9. Depois da incubação com soro sem C5, obtido de um paciente com deficiência selectiva deste componente de complemento, a percentagem de hemólise foi medida em comparação com o valor do 100% obtido por lise de eritrócitos num volume igual de H_2O destilada e um branco obtido por ressuspensão de eritrócitos em GBVS.

Símbolos: - \diamond -: TS-A12/22; - \blacksquare - scFv não relacionado; - \blacktriangle - GVBS.

Figura 5. Inibição de actividade hemolítica de C5 em soro de mamíferos pelo anticorpo TS-A12/22.

Foram realizadas medições como é descrito no exemplo 8 utilizando soros de ser humano (painel A), rato (painel B), coelho (painel C), ratinho (painel D).

Símbolos: - ▲ -: GVBS TS-A12/22; - ■ - scFv não relacionado; - ◇ - TS-A12/22.

Figura 6. Inibição de migração intra-articular de Leucócitos Polimorfonucleares (PMN) pelo anticorpo TS-A12/22 em modelos de rato de artrite induzida por antigénio.

Foram incubados Leucócitos Polimorfonucleares (PMN), isolados de lavagem intra-articular de ratos com artrite induzida por instilação de BSA (mBSA), com anticorpo TS-A12/22 ou com um anticorpo não relacionado, como é descrito no exemplo 10. O número de PMN na articulação tratada com o anticorpo da invenção aparece drasticamente reduzida. Solução salina: controlo sem artrite induzida; mBSA: artrite induzida por BSA, não tratada; não relacionado: artrite induzida por BSA, tratada com anticorpo scFv não relacionado; Ts-a12/22: artrite induzida por BSA, tratada com o anticorpo da invenção.

Figura 7. Análise de imunofluorescência de membrana sinovial de ratos com artrite induzida por antigénio.

Foram analisadas secções histológicas de articulações de ratos tratadas com injeção intra-articular de solução salina (A), BSA (B), BSA com TS-A12/22 (C) e BSA com o anticorpo não relacionado (D) por imunofluorescência com respeito à presença de componentes de complemento C3 e C9, como é descrito no exemplo 10. Enfatiza-se que o tratamento com TS-A12/22 não afecta à deposição de C3 mas que reduz significativamente a de C9, confirmando deste modo a inibição de C5.

Figura 8. Representação esquemática de *minicorpos* preparados a partir de sequências ScFv incluindo regiões constantes humana, de ratinho e de rato.

Figura 9. Inibição da via de activação do complemento clássica.

Símbolos: - ▲ -: GVBS; - ■ - scFv não relacionado; - ◇ - TS-A12/22-CH2CH3 (*minicorpo*); - ■ - TS-A12/22 (scFv).

Figura 10. Inibição de migração intra-articular de Leucócitos Polimorfonucleares (PMN) pelo anticorpo TS-A12/22-CH2CH3 (*minicorpo*) em modelos de rato de artrite induzida por antigénio.

Desde a esquerda: barra 1: controlo (mBSA); barra 2: mBSA + TS-A12/22-CH2CH3 (*minicorpo*) injectado no momento 0; barra 3: mBSA + TS-A12/22-CH2CH3 (*minicorpo*) injectado às 6 horas da indução de artrite.

Figura 11. Redução do inchaço das articulações.

O anticorpo, em forma de *minicorpo*, foi injectado no modelo de artrite induzida por mBSA em rato no momento 0 e 6 dias depois do tratamento com BSA. Os valores de percentagem na ordenada foram obtidos com respeito ao diâmetro basal da articulação antes da indução de artrite. Os dias são indicados na abscissa.

Desde a esquerda: barra 1: controlo (mBSA); barra 2: mBSA + TS-A12/22-CH2CH3 (*minicorpo*) injectado no momento 0 desde a indução da artrite; barra 3: mBSA + TS-A12/22-CH2CH3 (*minicorpo*) injectado a as 6 horas desde a indução de artrite.

DESCRIÇÃO DETALHADA da INVENÇÃO

O principal objecto da presente invenção refere-se a um anticorpo de origem humana de acordo com a invenção 1, que tem especificidade para o componente C5 do sistema de complemento e é caracterizado pelo facto de inibir a clivagem da cadeia alfa de C5, também denominada C5 activado, nos fragmentos C5a e C5b. Esta clivagem é produzida como resultado da activação do complemento que é produzida por mecanismos conhecidos.

Depois da activação do Complemento, é produzida uma C5 convertase que cliva a cadeia alfa do factor C5 gerando um fragmento de aproximadamente 70 aminoácidos (aa), conhecido como C5a e um fragmento C-terminal de 925 aminoácidos, C5b.

Os produtos resultantes da activação de C5, C5a e C5b, estão biologicamente activos. Em particular, C5a tem actividade quimiotáctica para leucócitos polimorfonucleares e monócitos, enquanto que o fragmento C5b contribui à formação do complexo de complemento terminal (TCC).

O anticorpo é recombinante.

O anticorpo da invenção é de origem humana, isto é, deriva completamente de um repertório de anticorpos obtido de linfócitos humanos. Estes anticorpos têm regiões tanto complementárias de antígenos (CDR) como flanqueantes de origem humana, ao contrário dos anticorpos humanizados em que somente a flanqueante é de origem humana, enquanto que as CDR são de origem murino.

O presente documento, por anticorpos recombinantes entende-se um anticorpo composto de pelo menos uma região variável derivada da cadeia pesada ou leve de uma imunoglobulina e produzida por meio de técnicas de engenharia genética a partir das sequências de nucleótidos que codificam as regiões caracterizadoras do anticorpo. O anticorpo recombinante é produzida num organismo hospedeiro que habitualmente é uma bactéria, uma levedura ou uma célula eucariota superior (de origem animal ou vegetal). A técnica de engenharia genética permite produzir anticorpos completamente humanos ou seleccionar um formato diferente de anticorpos naturais. Pelo contrário, os anticorpos produzidos pela tecnologia de hibridoma clássica descrita por Milstein *et al.*, somente podem ser de ratinho ou de rato e têm o típico formato de forma em E de anticorpos de quatro cadeias. As quatro cadeias, idênticas por pares, compreendem uma cadeia pesada e uma leve, que consiste cada uma numa região constante e variável, como é descrito por Rathbum, G. *et al.* (1989) em «Immunoglobulin genes», Academic Press, Nova Iorque.

De acordo com a reivindicação 1, o anticorpo recombinante anti-C5 da invenção é caracterizado pelo facto

de reconhecer um epítopo na cadeia alfa do componente C5, que compreende a região de clivagem de C5 convertase. A especificidade de ligação do anticorpo da invenção pelo epítopo que compreende o lugar de clivagem para C5 convertase, que se posiciona entre glicina 733 e arginina 734 de C5 humano de acordo com a numeração da Base de Dados SwissProt para C5 humano (SEQ ID P01031), pode ser verificada *in vitro*. Por exemplo, pode ser verificada por meio de um ensaio ELISA de competição em C5 que utiliza de um péptido sintético, como por exemplo o péptido KDMQLGR↓LHMKTLLPVSK (em que a seta indica o lugar de clivagem proteolítica), que corresponde à região 727-744 da proteína humana madura. De acordo com este aspecto, o anticorpo é caracterizado pela capacidade de reconhecer uma região com pelo menos 80%, preferentemente pelo menos 90%, 95% de homologia com o péptido KDMQLGR↓LHMKTLLPVSK (que corresponde à SEQ ID N° 15). Mais preferentemente reconhece um epítopo de pelo menos 6-10 de aminoácidos composto de 1-5 aminoácidos a montante e 1-5 aminoácidos a jusante a ligação peptídica clivado pela enzima C5 convertase, preferentemente o epítopo é LGRLHM. A região que rodeia o lugar de clivagem está altamente conservada entre várias espécies de mamíferos, portanto, o anticorpo da invenção reconhece com uma eficácia de ligação muito similar a molécula C5 de rato, ratinho, coelho etc. Além disso, o anticorpo tem em cada espécie animal o mesmo efeito de bloquear a conversão de C5 activado em seus fragmentos activos C5a + C5b. O anticorpo recombinante da invenção está preferentemente numa forma de cadeia simples (scFv), inclusive mais preferentemente corresponde a SEQ ID N° 6 e compreende a região variável da cadeia leve ligada covalentemente à região variável da cadeia pesada, directamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos denominada ligador. No presente documento por scFv entende-se um anticorpo de cadeia polipeptídica simples, composto

da região variável da cadeia leve ligada à região variável da cadeia pesada directamente ou por meio de um ligador sintético. Conhecem-se na técnica ligadores compostos de sequências de aminoácidos não naturais (sintéticos) e são descritos por exemplo em (1999): *Combinatorial Chemistry and Technology: Principles, Methods, and application*, Marcel Dekker Inc, NY Estados Unidos. O ligador sintético é preferentemente a sequência de nucleótidos SEQ ID N° 13 da Lista de Sequências.

No anticorpo scFv da invenção, as cadeias VH e VL estão preferentemente na ordem VL-VH desde a extremidade N-ao C-terminal da cadeia polipeptídica. Este formato, em que a extremidade N-terminal consiste numa cadeia VL, confere grande hidrofiliabilidade à proteína completa expressa como tal e às proteínas de fusão que compreendem as regiões tanto VL como VH. Além disso, torna possível a inserção a montante ou a jusante de sequências peptídicas denominadas "etiqueta" ou "sinalizador", que não alteram as características de ligação, mas são utilizadas por exemplo para facilitar a detecção imunológica do anticorpo ou sua produção ou purificação. Para os propósitos da presente invenção, o anticorpo também pode consistir no formato (N-C terminal) VH-VL ou pode conter somente uma das duas cadeias variáveis, preferentemente a cadeia VH que corresponde a SEQ ID N° 4, também em associação com diferentes cadeias VL, também independentemente de sua especificidade, como por exemplo, que pode ser seleccionado através da interacção da cadeia VH que corresponde a SEQ ID N° 4 com "coleções de repertórios moleculares".

No anticorpo da invenção, a cadeia VL pode ter uma sequência que corresponde a SEQ ID N° 2 que está ligada covalentemente a uma cadeia VH que corresponde a SEQ ID N° 4.

De acordo com um aspecto da invenção, no anticorpo scFv, pelo menos a cadeia VH tem a especificidade anti-C5

anteriormente indicada e corresponde a SEQ ID N° 4 da Lista de Sequências ou às variantes isotípicas ou mutações conservativas destas sequências. Portanto, de acordo com este aspecto, a invenção compreende todos os polipéptidos que compreendem uma região que tem pelo menos 95% de homologia, preferentemente 98% ou 99% de homologia com a sequência de aminoácidos da região VH, preferentemente VH3 que corresponde a SEQ ID N° 4. Uma forma de realização particularmente preferida deste scFv está representada pelo anticorpo que tem a sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID N° 6, que corresponde à sequência 4 e 2 ligada por um péptido de ligador com uma sequência que corresponde a SEQ ID N° 14. De acordo com uma forma de realização particularmente preferida o anticorpo scFv que corresponde à SEQ ID N° 6, tem uma constante de equilíbrio para o antigénio maior de 1×10^7 , preferentemente maior de 1×10^8 .

Numa forma de realização preferida, a sequência de nucleótidos do anticorpo scFv é utilizada para obter por engenharia genética cassetes de expressão para anticorpos recombinantes que compreendem a região constante de cadeias pesadas de imunoglobulina, preferentemente IgG, inclusive mais preferentemente de origem humana, de ratinho ou de rato. Inclusive mais preferentemente estas construções compreendem regiões CH2 e CH3 individualmente ou em associação. Os cassetes de expressão preparados de acordo com este procedimento são clonados em vectores de expressão adequados que são utilizados para a transfecção de células eucariotas, preferentemente de origem mamífera, como por exemplo HEK293, CHO, COS-1 BHK, células de mieloma ou outras células adequadas para expressão de estes produtos de proteína. De acordo com uma forma de realização particularmente preferida, o anticorpo scFv que corresponde a SEQ ID N° 5 é produzido de forma recombinante com sequências CH2 e CH3 de rato. Nesta forma, o anticorpo

recombinante dimeriza e um scFv TSA22-12 dimérico representa uma forma de realização particularmente preferida da invenção.

Em qualquer caso está incluído neste âmbito da presente divulgação a sequência de aminoácidos obtida por mutação das sequências contidas na Lista de Sequências adjunta, em tanto que estas mutações não alterem a especificidade do anticorpo anti-C5 descrita. A mutação pode ser "conservativa", quando baseia-se num aminoácido com características químicas ou estruturais similares com respeito a polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade ou baseia-se na natureza anfipática dos resíduos de aminoácidos envolvidos. Por exemplo, grupos de aminoácidos que compartilhem características similares de polaridade são compostos de aminoácidos não polares (hidrófobos) que incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina; aminoácidos não polares ou neutros que incluem: glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina; aminoácidos carregados positivamente (básicos) que incluem: arginina, lisina e histidina; e o grupo de aminoácidos carregados negativamente (ácidos) que compreende: ácido aspártico e ácido glutâmico. Também podem ser produzidas mutações aleatoriamente, por exemplo, utilizando ADN polimerases que se sabem que são "propensas a erros". Portanto, de acordo com um aspecto adicional, a presente invenção compreende anticorpos recombinantes como se reivindica gerados por mutagenese das sequências de nucleótidos SEQ ID N° 3 e 5 correspondentes às sequências que codificam a região VH e para o anticorpo na forma scFv. De acordo com este aspecto, a invenção inclui, portanto, um procedimento para gerar anticorpos com especificidade pelo componente C5 do complemento activado. Este procedimento essencialmente inclui a utilização de qualquer das sequências SEQ ID N° 4

e SEQ ID N° 6 ou preferentemente a mutagénese dirigida ou aleatória das sequências de nucleótidos que codificam SEQ ID N° 4 e N° 6. Portanto este procedimento preferentemente inclui mutagénese das sequências de nucleótidos SEQ ID N° 3 e SEQ ID N° 5.

Dentro do formato preferido do anticorpo, que consiste em regiões variáveis de cadeia leve ou pesada do anticorpo fusionadas numa cadeia de scFv simples por meio de um ligador proteico, a cadeia leve é mais preferentemente a cadeia lambda e em particular a cadeia V λ 3/V2-14 ou a cadeia kappa, preferentemente a Vk4/DPK24. A cadeia pesada é a cadeia VH3, em particular a VH3/V-48, como se define na base de dados na página web: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html> (índice Vbase). De acordo com este aspecto a invenção compreende todos os anticorpos como se reivindicam, derivados por mutagénese da sequência de nucleótidos que codifica a cadeia VH ou o scFv. Estes anticorpos são caracterizados pelo facto de que conservam especificidade para o componente C5 do sistema de complemento e de inibição da clivagem da cadeia alfa de C5, também denominada C5 activado, em fragmentos C5a e C5b.

Os peritos na especialidade sabem que a especificidade de ligação a antigénio de um anticorpo é determinada principalmente pelas regiões CDR (Região Determinante de Complementaridade) que são definidas como regiões hipervariáveis do anticorpo. Existem três regiões hipervariáveis para cada região variável na cadeia tanto pesada como leve. No entanto, não estão aceito unanimemente os limites exactos das regiões menos variáveis ou "flanqueantes" entre as quais estão compreendidas as CDR. De facto existem duas classificações diferentes. A primeira baseia-se em "variabilidade de sequência" (Kabat *et al.*), enquanto que a segunda baseia-se em "variabilidade estrutural" (Chothia *et al.*). No entanto, devido a que a especificidade de ligação a antigénio é devido

principalmente às regiões CDR, foi possível, por meio da utilização de técnicas recombinantes de ADN, obter por engenharia genética anticorpos quiméricos que exploram a especificidade de ligação de CDR murina montada sobre as regiões flanqueantes de anticorpos humanos. A especificidade dos ditos anticorpos resulta ser a mesma que para o anticorpo murino a presente invenção está composta de sequências de aminoácidos e nucleótidos das 3 regiões CDR da parte variável da cadeia leve e das 3 regiões CDR da parte variável das cadeias pesadas (SEQ ID N° 7, 8, 9 respectivamente). Portanto, estão incluídas no intervalo da forma de realização particular da presente invenção todos os anticorpos gerados por "enxerto" das regiões CDR ou pelo menos a terceira CDR, que corresponde à SEQ ID N° 9, em outra estrutura de apoio do anticorpo ou em estruturas de apoio de tipo anticorpo. Os exemplos das últimas são "minicorpos" em que a CDR da invenção são posicionados tridimensionalmente de maneira que mantenha a especificidade de ligação de C5.

Também é revelado um anticorpo humano recombinante caracterizado pelo facto de que compreende como regiões CDR pelo menos três das sequências de aminoácidos identificadas na lista de sequências, como: SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9 ou suas mutações conservativas.

Além disso, são reveladas proteínas quiméricas que compreendem pelo menos um dos polipéptidos correspondentes às SEQ ID N° 2, 4 ou 6 ou os que podem ser obtidos por meio de técnicas de engenharia genética que portam mutações conservativas ou não conservativas e pelo menos 95%, mais preferentemente 98% ou inclusive 99% homólogos às sequências originais. Portanto, a divulgação se estende a polipéptidos que compreendem pelo menos uma das sequências de aminoácidos específicas de anticorpo definidas como SEQ ID N° 2, 4, 6, 8, 10, 12, também quando estes são preparados numa forma que difere da forma canónica ou

natural dos anticorpos. Também são reveladas imunoglobulinas quiméricas que compreendem pelo menos uma das sequências de aminoácidos identificadas como SEQ ID NO: 2, 4 ou 6 ou domínios funcionais derivados de tais sequências em combinação com a sequência de aminoácidos de regiões constantes de cadeia pesada de Ig (imunoglobulina) ou subdomínios destas regiões (isto é, domínios CH₂ ou CH₃) derivados, por exemplo, de sequências de aminoácidos (aa) conhecidas na base de dados (isto é, gene de cadeia pesada de Ig A humana de 00220, gene de cadeia pesada de Ig G humana AF 237583, cadeia pesada de Ig gama L27437 de *Mus musculus*, região de cadeia pesada M28671 de *Rattus Norvegicus*).

Preferentemente o anticorpo é dimérico. Também são sequências seleccionadas entre SEQ ID N°: 2, 4 ou 6 quando portam mutações, substituições ou deleções de aa que não alteram a especificidade de ligação do anticorpo da invenção. As sequências de aminoácidos da Lista de Sequências também podem compreender péptidos adicionais situados na extremidade C ou N-terminal, como por exemplo a sequência "marcadora" ou "de sinalizador" que são úteis para a purificação ou reconhecimento imunológico do anticorpo recombinante em suas diversas formas ou quando portam deleções na extremidade C ou N-terminal, mas que não alteram sua especificidade de ligação.

Um tipo particularmente preferido de sequência "marcadora" é a cauda de polihistidina, codificada pelo vector de expressão usado na presente invenção, que é expresso na extremidade C-terminal da sequência SEQ ID N° 6 para facilitar a purificação de afinidade numa coluna de níquel. Outra etiqueta de sequência é o SV5 de SIV, que é adicionada para facilitar o reconhecimento imunológico.

Um aspecto adicional é representado por todas as sequências de nucleótidos resultantes de degeneração do código genético, caracterizadas pelo facto de que codificam

o anticorpo scFv com a sequência SEQ ID N° 6 ou a cadeia pesada VH que corresponde a SEQ ID N° 4 ou a cadeia leve que corresponde a SEQ ID N° 2 e as sequências de nucleótidos que codificam polipéptidos que têm pelo menos 95% de homologia, preferentemente 98% ou 99% de homologia com a SEQ ID N° 6, a SEQ ID N° 4, a SEQ ID N° 2, preferentemente com SEQ ID N° 4 ou que codificam seus variantes conservativos. Portanto, as sequências de nucleótidos identificadas com a SEQ ID N° 1, 3, 5 ou a Lista de Sequências ou sequências de nucleótidos que compreendem tais sequências, representam uma forma de realização particularmente preferida das sequências de nucleótidos.

Também estão incluídas na divulgação todas as sequências de nucleótidos obtidas por meio de “mutagênese parcimoniosa” (Shier, R., e col, 1996, Gene 169: 147) ou por meio de outros métodos de mutagênese dirigida ou aleatória ou sequências de nucleótidos da presente invenção, em particular SEQ ID N° 1, 3, 5 (Marks, J. D., et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:16007) realizados para melhorar algumas das propriedades dos anticorpos, como por exemplo a afinidade, enquanto é mantida a especificidade de ligação pelo lugar de clivagem de C5. Além disso, a presente invenção inclui todos os anticorpos scFv em que a sequência que codifica a região VH, que corresponde a SEQ ID N° 3, é mantida constante, enquanto que a sequência que codifica a região VL do anticorpo TS-A12/22, que corresponde a SEQ ID N° 1, é substituída por “redistribuição de cadeias”, por exemplo, utilizando coleções (“bibliotecas”) de regiões humanas VL.

As sequências de nucleótidos objecto da presente invenção são clonadas em vectores adequados para sua amplificação, mutagênese ou modificação adicional ou expressão. Portanto, os vectores que contêm pelo menos uma das sequências de nucleótidos SEQ ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11

como na lista de sequências representa um aspecto adicional da invenção. Estas são utilizadas preferentemente para preparação de anticorpos recombinantes ou de proteínas quiméricas num hospedeiro adequado e seguindo métodos conhecidos na técnica.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, os anticorpos recombinantes são clonados e são expressos preferentemente em hospedeiros procariotas: particularmente prefere-se *E. coli*, mas também podem ser utilizados outros hospedeiros procariotas, tais como *B. subtilis*, *P. pastoris*, *K. lactis*, ou células eucariotas de origem animal ou vegetal. Os vectores de expressão que contêm tais sequências de nucleótidos são optimizadas para expressão em cada um de estes hospedeiros, por inserção de regiões reguladoras, promotores, terminadores ou activadores de transcrição ou origens de replicação adequados. Um vector de expressão particularmente preferido de acordo com a presente invenção é representado por um vector de expressão periplásmica para *E. coli*, em particular o vector pDANS (Sblattero, D. e Bradbury A., 2000, Nat. Biotechnol. 18:75).

O anticorpo ou as proteínas quiméricas que têm a especificidade descrita na presente invenção inibem a conversão de C5 a seus produtos biologicamente activos. Em particular, por meio do bloqueio da formação de C5b bloqueiam a formação do complexo terminal C (TCC) que leva à formulação do MAC (Complexo de Ataque a Membrana) que é capaz de determinar lise celular massiva e lesão do tecido significativa. Além disso, por meio da inibição da formação de C5a também inibem a actividade quimiotáctica de C5a para Leucócitos Polimorfonucleares e monócitos, que após a estimulação produzem citocinas tais como IL-1, IL-6, IL-8 ou outros mediadores inflamatórios importantes tais como Serina-elastases, peroxidases, etc.

A actividade quimiotáctica de C5a e a actividade citolítica de MAC, para cuja formação participa C5b, são consideradas as principais causas de lesão do tecido induzida em várias doenças inflamatórias. Por exemplo, foram descobertos níveis elevados de fragmento C5a e de TCC no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide ou no fluido cerebrospinal de pacientes com várias doenças do sistema nervoso central.

Portanto, um aspecto adicional da invenção refere-se à utilização terapêutica de anticorpos anti-C5 recombinantes da invenção, que portam a capacidade de inibir a conversão do componente C5 a C5a e C5b, numa das formas descritas na invenção: scFv, VH e/ou VL solos ou em combinação com regiões constantes de Ig, preferentemente de origem humana, de ratinho ou de rato, proteínas quiméricas ou regiões variáveis simples e suas mutações conservativas, variantes isotípicas etc. Este aspecto também refere-se à utilização terapêutica de suas formas de realização preferidas compostas das sequências de aminoácidos SEQ ID N° 2, 4, 6 da Lista de Sequências.

De acordo com a invenção, os anticorpos bloqueiam a conversão de C5 pela C5 convertase. Esta enzima pode ser activada pela via clássica iniciada pelo componente de complemento C1q desencadeada por complexos antigénio-anticorpo ou de agregados de IgG ou IgM ou pela via de activação alternativa iniciada por substâncias naturais tais como lectinas, bactérias ou paredes celulares de levedura ou alguns venenos de serpentes ou factores nefríticos. Portanto, avaliou-se se os anticorpos ou proteínas da invenção bloqueiam selectivamente uma ou a outra das duas vias de activação do complemento. Com base em experiências *in vitro* realizadas por ensaios hemolíticos em eritrócitos de ovelha (SRBC: Glóbulos Vermelhos de Ovelha) ou em eritrócitos de coelho (RBC), os anticorpos e proteínas de acordo com a presente invenção inibem as vias

de activação do complemento tanto clássica como alternativa. Uma vantagem proporcionada pela utilização de anticorpos ou proteínas que têm especificidade pelo componente C5 de acordo com a presente invenção é que os componentes do complemento iniciais continuam estando disponíveis para outras funções de sistema de complemento tais como opsonização e eliminação de imuno-complexos. Este enfoque terapêutico resulta ser vantajoso sobre um bloqueio potencial no nível do componente C3 que precede a acção do componente C5. Um bloqueio no nível do componente C3 levaria a um bloqueio total da cascata do complemento e de suas funções em opsonização e eliminação de imunocomplexos.

Portanto, numa forma de realização particularmente preferida, os anticorpos ou as proteínas da invenção, numa das formas de realização descritas ou nas obviamente deriváveis delas, são utilizadas para preparações farmacêuticas para tratamento de doenças causadas ou acompanhadas por hiperactivação do sistema de complemento. A invenção estende a utilização de anticorpos e proteínas da invenção e suas sequências de nucleótidos codificantes, ao campo do diagnóstico, na área de diagnóstico de distúrbios caracterizados ou acompanhados por activação incontrolada do sistema de complemento, em particular do componente C5 ou de seus fragmentos biologicamente activos.

Mais preferentemente, os polipéptidos e anticorpos da invenção são utilizadas para o tratamento ou a prevenção de doenças causadas ou acompanhadas pela acção citotóxica e pró-inflamatória do complexo terminal C (Complexo Terminal C TCC), em que em particular tais doenças compreendem inflamação crónica e em particular artrite reumatóide, glomerulonefrite, esclerose múltipla, neuropatias periféricas desmielinizantes, aterosclerose ou alguns distúrbios auto-imunes.

Além disso, ensaios experimentais demonstraram que polipéptidos e anticorpos anti-C5 da invenção são

terapeuticamente úteis tanto em tratamento como em prevenção de patologias inflamatórias agudas induzidas ou acompanhadas por activação massiva do componente C5, que age através da actividade quimiotáctica do fragmento C5a, assim como através da actividade de TCC iniciada pelo fragmento C5b. Por exemplo, as patologias agudas estão representadas por septicemia bacteriana, lesão do tecido, por exemplo lesão do miocárdio, do nervoso central, lesões devidos a transplante ou causados por isquemia e reperfusão depois de isquemia.

Além disso, um aspecto adicional da invenção refere-se à utilização terapêutica de sequências de nucleótidos que codificam anticorpos ou proteínas da invenção ou os vectores que os contêm. Estes são utilizadas preferentemente em terapêutica génica somática de doenças induzidas ou acompanhadas por activação massiva do componente C5, por activação incontrollada do sistema de complemento, por produção excessiva de fragmentos C5a e C5b, por produção excessiva de componentes do complemento C5 a C9, como em artrite reumatóide ou em alguns distúrbios auto-imunes. Sendo submetida a variabilidade individual e estado de saúde geral, não é fácil quantificar um nível maior que o normal de activação do sistema de complemento e da conversão do componente C5 activado a seus fragmentos biologicamente activos. Portanto, os níveis anómalos são definidos pragmaticamente como os que são capazes de causar um estado patológico agudo ou crónico.

A produção *in vivo* e *in vitro* de anticorpos da invenção em animais transgénicos, obtidos por manipulação genética de mamíferos não humanos utilizando pelo menos uma das sequências de nucleótidos descritas na presente invenção por métodos conhecidos para os peritos no campo, também está compreendida dentro do alcance da presente invenção. Isto representa uma aplicação útil para o estudo de doenças genéticas caracterizadas por produção

insuficiente de C5a e C5b ou por hiperactivação de componentes do complemento de C5 a C9.

Os anticorpos e proteínas da invenção e suas sequências de nucleótidos codificantes podem ser preparados para utilização terapêutica em forma de compostos farmacêuticos em combinação com excipientes adequados e/ou diluentes preferentemente para administração parentérica.

Além disso, os anticorpos da invenção permitem a preparação de kits de diagnóstico, terapêuticos ou de investigação, quando tais kits compreendem pelo menos um dos anticorpos ou das cadeias variáveis descritas na invenção, correspondentes às sequências SEQ ID N° 2, 4, 6 ou seus variantes homólogos ou fragmentos gerados para diagnóstico ou prognóstico de doenças caracterizadas por hiperactivação do componente C5 ou suas sequências de ADN codificantes. As sequências de nucleótidos correspondentes às sequências SEQ ID N° 1, 3, 5 e suas sequências homólogas, são utilizadas preferentemente para preparar um kit para transfecção de células eucariotas.

A presente invenção também compreende a forma de realização de um kit de acordo com a reivindicação 25 para seleccionar compostos que interferem ou modulam a clivagem da cadeia alfa do componente de complemento C5 em seus fragmentos biologicamente activos. A forma de realização do dito kit envolve a utilização dos polipéptidos da invenção, preferentemente a cadeia VH (SEQ ID N° 4) ou a cadeia scFv (SEQ ID N° 6) e pelo menos um dos seguintes polipéptidos: componente de complemento C5 e sua cadeia alfa ou um péptido que compreende o lugar de clivagem para C5 convertase, preferentemente que corresponde à sequência SEQ ID N° 15. Os compostos podem ser identificados, por exemplo, por meio de um ensaio competitivo que detecte a inibição da ligação péptido-anticorpo utilizando pelo menos uma das sequências da invenção. Os anticorpos e polipéptidos da invenção, independentemente do facto de que

se originem de uma biblioteca de anticorpos humanos, são caracterizados pela capacidade de reconhecer o componente de complemento C5 no nível de um epítopo presente na cadeia alfa do componente C5 e que compreende a região de clivagem de C5 convertase. A especificidade de ligação do anticorpo da invenção para o epítopo que compreende o lugar de clivagem para C5 convertase se situa entre glicina 733 e arginina 734 em C5 humano, de acordo com a numeração da base de dados SwissProt (SEQ ID P01031). Este epítopo poderia estar localizado de maneira diferencial em C5 de espécies de mamífero não humanas tais como rato, ratinho, coelho; no entanto será considerado que tem a mesma especificidade, se tivesse o efeito de bloquear a conversão do C5 respectivo a C5a e C5b. Portanto, de acordo com um aspecto adicional, a invenção refere-se à utilização de anticorpos anti-C5 da invenção para estabelecer modelos experimentais animais de doenças induzidas ou acompanhadas por hiperactivação do sistema de complemento e em particular do componente C5.

Também é revelado o péptido de factor de complemento C5 que pertence a espécies de mamífero, e preferentemente seres humanos, que compreende o lugar de clivagem para C5 convertase. Este péptido é preferentemente o que compreende a região que corresponde a os aminoácidos 731-740 da proteína madura humana. Inclusive mais preferentemente o péptido tem a sequência KDMQLGR↓LHMKTLPPVSK, que corresponde à sequência de aminoácidos 727-744 da proteína humana. Os péptidos são utilizados para a preparação de medicamentos, por exemplo vacinas, ou como imunógeno para preparar anti-soros para a prevenção e o tratamento de condições patológicas que envolvem activação descontrolada do componente de complemento C5 tais como artrite reumatóide ou alguns distúrbios auto-imunes.

De acordo com este aspecto adicional, a invenção inclui também a utilização de um péptido que compreende a

região que corresponde à sequência de aminoácidos 131-740 da proteína humana madura ou de um péptido que comparte pelo menos 80% de homologia com a dita região, mais preferentemente pelo menos 90%, 95% ou 98% de homologia incluindo as regiões correspondentes do componente C5 de mamíferos não humanos. Este aspecto da invenção inclui a utilização de um péptido que tem a sequência KDMQLGR↓LHMKTLIPVSK (derivada da proteína humana) ou de um péptido que tem pelo menos 80%, mais preferentemente pelo menos 90%, 95% ou 98% de homologia com o dito péptido, junto com ou como alternativa a anticorpos recombinantes anti-C5, em particular os que compreendem a região variável da cadeia pesada VH, que corresponde a SEQ ID N° 4, ou o anticorpo scFV, que corresponde a SEQ ID N° 6, a usar para a selecção de anticorpos de acordo com a reivindicação 1.

SECÇÃO EXPERIMENTAL

Materiais.

Biblioteca de anticorpos. A biblioteca de anticorpos utilizada, que tem uma complexidade de 7×10^9 , derivou de linfócitos periféricos não imunes (naive) humanos. A construção desta biblioteca é descrita em Sheets, M. D., et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. OU S A 96:6157.

Bactérias. A amplificação de fagos foi na estirpe de *E. coli* DH5aF' (F'/endA1 hsdR17 (rK⁻mK⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal) relA1 D (lacZYA-argF) U169 deoR (F80dlacD(lacZ)M15)). Para a preparação do fragmento de scFv foi utilizado a estirpe de *E. coli* HB2151 (K12, ara (lac-pro), thi/F' proA⁺B⁺, lack1^qZM15).

Proteínas purificadas. Os componentes purificados C4 a C9 foram obtidos de Quidel (San Diego, CA) e o componente C5a recombinante humano foi obtido de Sigma Aldrich S.r.l. (Milão, Itália). As subunidades alfa e beta de C5 foram obtidas por incubação de 50 µg de C5 diluído em TRIS-HCl 0,55 M pH 8,1, que continha DTT (0,02 M) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA), seguido de tratamento com

iodoacetamida (0,12 M) durante 1 hora a TA. As cadeias alfa e beta foram purificadas por meio de filtração em gel em Superose 12 (Pharmacia Biotech, Milão, Itália) em cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) e a pureza foi avaliada por SDS-PAGE em condições não redutoras.

Soros. Foi obtido um soro que não possuía componente de complemento C5 (C5D) de um paciente com infecção meningocócica. Os níveis de C5 estavam abaixo da detecção e não tinha actividade hemolítica neste soro e foi restaurada por adição de C5 exógeno. Foi utilizado soro humano obtido de doadores de sangue como uma fonte de factor C5.

Preparação do intermediário EAC1-3b para ensaio hemolítico.

Foram sensibilizadores eritrócitos de ovelha (SBRC: glóbulos vermelhos de ovelha) com quantidades sub-aglutinantes de IgM de coelho (EA). O intermediário EAC1-3b para reacção hemolítica foi preparado por meio de incubação de eritrócitos sensibilizados para anticorpos (EA) com soro empobrecido para C5 diluído 1/10 (C5D) em tampão salino que continha glicose e Veronal (GVBS). Foi realizada uma incubação durante 70 minutos a 37 °C, seguido de adição de suramina (Bayer, FRG) para bloquear a reacção de degradação, como é descrito em Harrison, R. A. e P. J. Lachmann (Harrison, R. A. e P. J. Lachmann. 1986. Complement technology. In Handbook of Experimental Immunology. D. M. Weir, L. A. Herzemberg, C. Blackwell e A. Herzemberg Leonore, eds. Blackwell Scientific Publ, Londres).

Anti-soros. Dois anticorpos monoclonais anti-C5a (Oppermann e col, Complement Inflamm., 1991, 8: 13) e um anti-soro anti-C5 de cabra (Quidel, San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

Exemplo 1. Amplificação e selecção de biblioteca de fagos.

Foram obtidos fagos e foram amplificados como é descrito em Marks, J. D. e col, 1991, J. Mol. Biol.

222:581. A selecção foi realizada em "imunotubos" (Nunc, Mascia Brunelli, MI, IT) revestidos com proteína C5 purificada. O revestimento dos "imunotubos" foi obtido por incubação com uma solução de C5 (10 µg/ml em PBS) durante a noite a 4 °C. Os fagos foram diluídos em PBS que continha leite em pó magro a 2% (MPBS) e foram incubadas em imunotubos durante 60 minutos a temperatura ambiente. Depois da incubação, os imunotubos foram lavados 20 vezes com PBS que continha Tween 20 a 0,1% (PBST) e 20 vezes com PBS. As partículas de fago ligadas a imunotubos foram eluídas com 1 ml de cultura bacteriana de *E. coli* a uma densidade de DO_{600} 0,5 durante 30 minutos a 37 °C. Foram adicionados depois ampicilina (75 µg/ml), fago auxiliar e kanamicina (25 µg/ml) e a cultura foi crescida durante a noite.

Depois de um segundo ciclo de selecção em imunotubos revestidos com C5, as células de *E. coli* eluídas foram amplificadas para extrair o ADN do fagomídeo utilizando métodos conhecidos na técnica. O ADN extraído foi utilizado como um molde para amplificações por meio de PCR separadas das regiões VH e VL e montagem posterior e clonagem em vector pDAN5 (Sblattero, D. e Bradbury. A, 2000, Nat. Biotechnol. 18:75). O vector pDAN5 é um vector fagomídeo que contém regiões lox e His₆ e a região de reconhecimento para a proteína p27 SV5 do vírus SIV, caracterizado pelo facto de que as regiões VH e VL inseridas no vector são expressas na ordem VL-VH, com a cadeia leve na extremidade N-terminal. Depois da transformação com o fagomídeo, as células de *E. coli* foram incubadas com o fago auxiliar e as partículas de fago foram utilizadas para um terceiro ciclo de selecção. Depois da eluição, foram analisados os clones com respeito a sua capacidade para se ligar a C5 de acordo com o que é descrito no Exemplo 2.

Exemplo 2. Isolamento de partículas de fago com especificidade de ligação pelo antigénio C5.

As partículas de fago obtidas depois de três ciclos de “selecção” de C5 em imunotubos (como foi descrito no Exemplo 1), foram utilizadas para infectar células de *E. coli* crescidas em meio sólido. As colónias bacterianas simples foram transferidas para placas de 96 poços e os fagos resultantes foram testados adicionalmente por meio de ELISA com respeito a sua capacidade para se ligar a C5. O antigénio C5, a uma concentração de 10 µg/ml em tampão de bicarbonato 0,1 M pH 9,6, ligou-se às placas por incubação durante a noite a 4 °C. Depois da saturação das placas com MPBS (PBS que continha leite magro em pó 2%), foram diluídos 50 µl de suspensão de fago com um volume idêntico de MPBS; foi adicionado depois um anticorpo monoclonal anti-pIII (proteína M13) conjugado com HRP (Pharmacia Biotech). A ligação positiva foi revelada por meio da adição de H₂O₂ e 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin diclorato (Sigma-Aldrich) como substrato e absorbância a 450 nm por meio de leitura espectrofotométrica.

Os clones positivos pelo ensaio ELISA foram seleccionados adicionalmente com base na diferencia dos fragmentos codificantes de região V. As regiões V foram amplificadas utilizando iniciadores específicos como é descrito em Marks e col (trabalho citado), foram clivados com BstNI e foram separados por meio de electroforese em gel de agarose a 2%. Foram isolados doze clones que demonstraram ser diferentes entre si com base em seu padrão electroforético.

Exemplo 3. Preparação de anticorpos ScFv de cadeia simples solúveis.

Os clones de fago obtidos como foi descrito no Exemplo 2 foram utilizados para infectar a estirpe de *E. coli* HB2151 para obter expressão de fragmentos de scFv em forma solúvel. Foram induzidas as bactérias crescidas até D. O. 0,5 em meio 2XYT, que continha ampicilina, com isopropil-β-tiogalactopiranósido e foram cultivadas adicionalmente

durante 5 horas. A fracção periplásmica que continha anticorpos scFv foi preparada por incubação com reactivo B-PER (Pierce, Celbio, MI, IT) durante 20 minutos a TA, seguido de centrifugação durante 15 minutos a 27000 x g. O sobrenadante foi submetido a diálise contra PBS e foram purificados os anticorpos de cadeia simples que continham a cauda de poli-histidina na extremidade C terminal por meio de cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA de níquel (Qiagen, MI, IT).

A capacidade de ligação de anticorpos de cadeia simples purificados para o factor C5 foi verificada por meio de um ensaio ELISA de fase sólida. Este foi análogo ao que foi utilizado para partículas de fago. Em lugar do anticorpo dirigido a pIII de M13, o anticorpo usado para detecção foi um anticorpo monoclonal contra o marcador SV5 peptídico expresso na extremidade C terminal de anticorpos de cadeia simples.

O protocolo para o ensaio ELISA foi o seguinte: os poços de uma placa de microtitulação de 96 poços foram revestidos com antigénio (C5 purificado, 250 ng) por incubação durante a noite a 4 °C em tampão de bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 9,6 e depois foram lavados com PBS 0,1% Tween 20 (PBST). Foram bloqueados os lugares de ligação residual com PBS que continha BSA a 1% durante 1 hora a 37 °C. Foram incubados depois extractos bacterianos ou anticorpo scFv de cadeia simples purificado (1 µg/ml) e foram revelados com anticorpo anti-etiqueta SV5 (diluído 1/1000) seguido de anticorpo de cabra anti-IgG de rato (diluído 1/1000) durante 1 hora de incubação a 37 °C. A reacção enzimática foi desenvolvida com p-nitrofenilfosfato (Sigma Aldrich; 1 mg/ml) como o substrato em tampão de glicina 0,1 M pH 10,4 que continha MgCl₂ 1 mM e ZnCl₂ 1 mM e a absorbância foi lida a 405 nm pelo leitor de ELISA Titertek multiskan.

Descobriu-se que todos os anticorpos scFv purificados eram capazes de se ligar ao factor C5 pelo ensaio ELISA descrito.

Exemplo 4. Determinação da afinidade de ligação do anticorpo scFv TS-A12 pelo factor C5 por meio de Ressonância de Plasmon Superficial (SPR).

A afinidade de ligação do anticorpo Tsa-12, purificado por meio de FPLC em Superdex 75 (Pharmacia), para o factor C5 foi medida por meio de BIACORE 2000. A microplaca (CM5, Biacore) foi preparada por conjugação directa do antígeno C5 com aminas (20 µg/ml em acetato de sódio 10 mM pH 4,5). O nível final de imobilização resultou ser de aproximadamente 1000 UR (unidades de ressonância). A associação e dissociação das moléculas de anticorpo da biomicroplaca foram medidas utilizando um sistema de detecção óptica (Ressonância de Plasmon Superficial).

A análise foi levada a cabo a 25 °C, com um fluxo de 15 µl/min, utilizando 4 concentrações de scFv diferentes no intervalo compreendido entre 100 e 300 nM, em PBS, P20 0,005% (Biacore). As curvas de ligação foram interpoladas 1:1 de acordo com o modelo de Langmuir, utilizando o software dedicado denominado BIAevaluation (versão 3.5) com correcção para a transferência de massa. As medições realizadas na constante de dissociação em equilíbrio são indicadas na Quadro 1.

Quadro 1. Taxas de associação e dissociação de scFV TS-A12 em C5 purificado imobilizado em microplaca.

Clone	k_{on} ($10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$)	k_{off} (10^{-3} s^{-1})	K_D (10^{-9} M) ^a
TSA-12	1,3	0,026	200
^a A constante de equilíbrio foi calculada como $K_D = k_{on}/k_{off}$			

Como é mostrado na Quadro 1, a KD calculada para o anticorpo TS-A12 resulta ser de $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ (afinidade sub-micromolar), como se espera para anticorpos derivados de colecções (bibliotecas) de anticorpos não imunes.

Exemplo 5. Afinidade aumentada do anticorpo TS-A12 por meio de "redistribuição de cadeia".

Para aumentar a afinidade, o anticorpo TS-A12 foi submetido a substituição ("redistribuição") das cadeias leves VL. Para este propósito o ADN do fagomídeo foi cortado com BssHII e SaII para clivar a região VL. Esta região foi substituída com todo o repertório de cadeias VL de uma biblioteca pré-imune (Sblattero, D. e Bradbury A., 2000, NAT. Biotechnol. 18:75) que foi preparado com as mesmas enzimas. A biblioteca foi submetida a três ciclos de selecção no antigénio, como é descrito nos Exemplos 1 e 2, até que foi obtido uma série de anticorpos específicos para C5. Entre estes está TS-A12/22 que tem constante de dissociação, conforme é medido com BIACORE 2000 de acordo com o método descrito no exemplo anterior, de $1,8 \times 10^{-8} \text{ M}$, portanto com um incremento de afinidade molar de aproximadamente uma ordem de magnitude.

Exemplo 6. Caracterização da inibição dos anticorpos scFv antiC5 da conversão de C5 a C5a.

Os fragmentos scFv anti-C5 obtidos são caracterizados adicionalmente com respeito a sua capacidade para inibir a actividade hemolítica de C5 ou, em outras palavras, bloquear a conversão do componente C5 a C5a. Para este propósito, uma quantidade pequena de componente C5

purificado foi incubada, durante 30 minutos a TA, com anticorpos scFv anti-C5 purificados ou com um scFv não relacionado (anti-gliadina) ou com VBS (Solução Salina de Tampão Veronal) como controlo. A mistura foi adicionada depois a eritrócitos de ovelhas sensibilizados com quantidades sub-aglutinantes de IgM de coelho (EA) (veja-se Harrison, R. A. e P. J. Lachmann. 1986. Complement Technology. In Handbook of Experimental Immunology. D.M.Weir, L. A. Herzemberg, C. Blackwell e A. Herzemberg Leonora, eds Blackwell Scientific Publ, Londres) revestido com componentes de C1 a C3b (EAC1-3b) que permitem revelar a activação de C5 através da via clássica. A suspensão de eritrócitos foi ressuspensa em soro empobrecido para C5 (C5D) e foi incubada durante 30 minutos a 37 °C. Ao final deste procedimento, a lise celular foi medida como a percentagem do controlo de lise total em H₂O destilada (veja-se a Figura 1, painel B). A inibição de produção de C5a e TCC pelos scFv TS-A12 e TS-A12/22 foi medida por meio de ELISA utilizando o anticorpo monoclonal 17/5 como o anticorpo de captura e o anticorpo G25/2 como o anticorpo de detecção de acordo com o que foi descrito em Opperman *et al.*1991, Complement Inflamm. 8:13. A presença de TCC foi medida utilizando anticorpo aE11 como o anticorpo de captura e um anticorpo anti-C5 biotinilado (Sigma Aldrich) seguido de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina, como é descrito em Tedesco e col (1997, J Exp. Med 185:1619).

Os resultados do ensaio são apresentados na Figura 1, em que é mostrado que os anticorpos TS-A12 e TS-A12/22 inibem quase completamente a formação de C5a (Figura 1A) (via clássica) e de TCC (Figura 1B) enquanto que os outros scFv isolados são eficazes somente parcialmente ou até um alcance limitado. A presença de VBS ou de um scFv não relacionado na mistura de reacção não mostrou, como era esperado, nenhum efeito inibidor.

Exemplo 7. Determinação da sequência do anticorpo TS-A12/22.

O fragmento VH e VL de clones positivos foram comparados com sequências de anticorpo conhecidas publicadas na base de dados VBASE (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html>). Descobriu-se que a cadeia pesada VH do anticorpo TS-A12/22 derivava da cadeia VH3/V-48 e a cadeia leve de V λ 3/V2-14. A sequência de ADN que codifica o anticorpo scFV TS-A12/22 é indicada na lista de sequências como SEQ ID N° 5 e a sequência de aminoácidos derivada como SEQ ID N° 6.

Exemplo 8. Mapeamento do lugar de reconhecimento do anticorpo TS-A12/22 na molécula C5.

Em primeiro lugar foi caracterizado, por meio da técnica de transferência de Western, se o anticorpo TS-A12/22 reconhece a subunidade alfa ou beta do componente de complemento C5 preparado como é descrito em materiais. Brevemente as duas subunidades foram submetidas a electroforese em poços separados e foram transferidas a membranas de nitrocelulose. Foi utilizada uma solução que continha Tris 50 mM pH 7,6, NaCl 0,5 M e leite em pó magro a 4% para bloquear lugares não específicos durante 1 hora a 37 °C. As membranas foram reveladas por meio de incubação com uma diluição adequada do anticorpo TS-A12/22 durante 1 hora a 37 °C, seguido de incubação com um anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina ou com estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich). A reacção enzimática foi desenvolvida com tetrazolio azul e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (Sigma-Aldrich, 0,30 mg/ml) diluído em Tris-HCl 0,1 M pH 9,5 que continha NaCl 0,1 M e MgCl₂ 5 mM. Foram utilizadas Rainbow RPN 756 (Amersham Itália) como marcadores de peso molecular. Como é mostrado na Figura 2, o anticorpo TS-A12/22 da invenção reconhece a subunidade alfa do factor

C5, carregada na pista 1, mas não reconhece a subunidade beta, carregada na pista 2.

Já que o anticorpo TS-A12/22 purificado também inibiu a actividade hemolítica devido a inibição da conversão de C5 a C5a, como é demonstrado no Exemplo 9, foi verificada depois a hipótese de que o anticorpo poderia reconhecer como lugar de ligação o lugar de clivagem para C5 convertase.

Para verificar esta hipótese, foi sintetizado um péptido de 18 aminoácidos, com a sequência: KDMQLGR¹LHMKTLLPVSK (P5A-18 também denominado C5cs que compreende SEQ ID N° 15). Este péptido corresponde à região 727-744 da proteína madura e compreende o lugar de clivagem de C5 convertase (indicada pela seta) entre glicina 733 e arginina 734 de acordo com a numeração de SwissProt para C5 humana (SEQ ID P01031). O péptido foi utilizado num ensaio ELISA competitivo na proteína C5 em fase sólida. Antes de se ligar à fase sólida, o anticorpo TS-A12/22 foi pré-incubado com o péptido P5A-18, que corresponde a os aminoácidos 727-744 do componente C5 ou com um péptido não relacionado de sequência GEEIQIGHIPREDVDYHLYP (SEQ ID N° 16 da lista de sequências) que corresponde a um péptido derivado de fibronectina denominado CS5.

Na Figura 3 são mostrados os resultados que foram obtidos: o péptido P5A-18 inibiu a ligação do anticorpo TS-A12/22 com C5 e esta inibição foi dependente da dose, variando de 45% a 90% para concentrações de péptido de 200 ng e 800 ng/200 μ l, respectivamente. Este resultado confirma que o anticorpo TS-A12/22 reconhece somente esta região no factor activado C5. Os valores de concentração correspondem a uma K_i peptídica de 1 μ M, que não é diferente da K_D medida por SPR para a proteína completa, de acordo com o que foi descrito no Exemplo 4.

Como se esperava, tanto o péptido CS5 não relacionado como a proteína C5 completa resultaram ser ineficazes para

inibir a ligação do anticorpo TS-A12/22 com C5 activado, inclusive às maiores concentrações utilizadas, indicando deste modo que a inibição pelo péptido C5cs (P5a-18) foi específica para a cadeia alfa de C5.

Exemplo 9 caracterização funcional do anticorpo TS-A12/22. Inibição da actividade hemolítica e activação de TCC.

Tendo avaliado as características da inibição da via de activação clássica do factor C5 pelo anticorpo TS-A12/22, foi verificado depois se estas também o eram da inibição da via alternativa de activação de C5 e a que nível. O ensaio foi levado a cabo utilizando eritrócitos de coelho como as células alvo, de acordo com método bem conhecidos. Brevemente, foram misturadas quantidades crescentes de C5 com 600 ng do scFv da invenção ou com um scFv não relacionado ou com GBVS em que foram solubilizados anticorpos scFv e depois foram incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para estimar a via clássica de activação do complemento, cada mistura foi adicionada a uma suspensão 1% de eritrócitos de ovelha sensibilizados com anticorpo de coelho e revestidos com componente de complemento até C3b, denominado EAC1-3b. Para estimar a via alternativa de activação do complemento, cada mistura foi adicionada a uma suspensão 1% de eritrócitos de coelho.

Foi adicionado soro com C5 esgotado diluído 1/200 a cada suspensão de eritrócitos. Depois da incubação durante 30 minutos a 37 °C, a percentagem de lise de eritrócitos foi medida por comparação com um valor de 100% obtido por lise de eritrócitos com um volume igual de H₂O, destilada e com um branco que consistia em eritrócitos ressuspensos em GBVS. Foi realizada uma leitura espectrofotométrica a 412 nm e os resultados são indicados na Figura 4: inibição de lise de EAC1-3b através da via clássica (painel A); inibição de lise de eritrócitos de coelho através da via alternativa (painel B). O anticorpo TS-A12/22 inibe a lise

de eritrócitos de coelho inibindo a conversão de C5 de forma similar através da via clássica e a via alternativa.

Já que a sequência de aminoácidos que corresponde ao lugar de clivagem da convertase na cadeia alfa de C5 se conserva em várias espécies animais, foi avaliada adicionalmente, por ensaio hemolítico, a capacidade do anticorpo TS-A12/22 para inibir a conversão de C5 a C5a também em soro de coelho, ratinho e rato. O anticorpo TS-A12/22 foi capaz de inibir a actividade hemolítica presente no soro de todas as espécies animais testadas, embora com diferente eficácia. Estes resultados são indicados na Figura 5, que mostra que a eficácia de inibição de soro de rato foi praticamente similar à de soro humano, enquanto que a eficácia foi maior em soro de rato ou coelho. Deveria ser considerado que uma quantidade maior de soro de coelho era necessária para induzir uma percentagem de lise comparável ao induzido por C5 humano.

(A especificidade do anticorpo TS-A12/22 foi avaliada também em outros componentes da cascata do complemento, como por exemplo C3 e C4, que são estruturalmente similares a C5, mas se encontrou reactividade cruzada).

Exemplo 10. Utilização *in vivo* de anticorpo TS-A12/22.

Para testar o efeito do anticorpo TS-A12/22 *in vivo*, foi medido o fluxo de entrada de PMN na articulação de rato injectada com BSA, BSA e TS-A12/22 ou BSA e anticorpo não relacionado. Foi demonstrado deste modo que a quimiotaxia de PMN, que é seu número no líquido de lavagem da articulação, foi reduzido significativamente em presença de TS-A12/22 em comparação com ratos tratados com BSA ou com BSA e anticorpo não relacionado (Figura 6). Além disso, a deposição dos componentes do complemento C3 e C9 foi comprovada numa secção histológica da articulação da pata traseira de ratos tratados, por imunofluorescência com anti-soros específicos e anticorpos secundários conjugados com fluoresceína (Figura 7). Descobriu-se que a deposição

de C3 conservou-se sem mudanças como resultado da administração de BSA mais anticorpo TS-A12/22 ou de anticorpo não relacionado, mas a deposição de C9 se inibiu fortemente em presença de TS-A12/22. Foi confirmado deste modo que o anticorpo TS-A12/22 inibe a cascata de complemento numa etapa intermediária entre C3 e C9 e, portanto, ao nível da conversão de C5 a C5a + C5b.

Exemplo 11. Dimerização do anticorpo scFvTS-A12/22.

A sequência do anticorpo TS-A12/22 foi modificada pela adição de domínios CH3 ou CH2-CH3 à extremidade C terminal e de uma sequência líder eucariota à extremidade N terminal.

Estas modificações foram dirigidas a:

- induzir dimerização de scFv, formando um complexo estrutural, para aumentar a valência de um a dois e aumentar a estabilidade do anticorpo (definido a seguir como "minicorpo"). Com base nos diferentes tipos de clonagem, não são formadas ligações covalentes entre subunidades do dímero em construções que compreendem somente CH3, enquanto que as que compreendem domínios CH2-CH3 são formadas duas ligações dissulfureto entre cisteínas da região dobradiça CH2 dos dois monómeros;
- Tornar possível a produção de minicorpos em culturas celulares de mamífero com incrementos do rendimento e ausência de contaminantes bacterianos ao final dos procedimentos de extracção e purificação;
- criar as condições para uma análise *in vivo* da actividade biológica do minicorpo em modelos animais, minimizando a resposta imune do hospedeiro por adição de domínios CH3 e CH2-CH3 da mesma espécie que o animal tratado (ratinho ou rato).

As modificações anteriormente descritas foram realizadas em duas etapas. Em primeiro lugar o scFv foi clonado no vector de plasmídeo pUT (Li E, *et al.* 1997

Protein Eng. 10:731-6) modificado convenientemente para permitir a inserção da sequência líder e de um domínio CH3 humano. O domínio humano CH3 foi substituído depois com uma série de construções de domínios de outras espécies, como se indica posteriormente. Finalmente, um fragmento de vector pUT que compreende o minicorpo em diversas versões, foi clonado no vector comercial pcDNA3 (Invitrogen) e foi testado com respeito a expressão em células de cultura.

Para isto, o vector pUT que continha um scFv não relacionado foi modificado substituindo o lugar de reconhecimento para a enzima de restrição (RE) BspEI, localizado na extremidade da cadeia VH, com o lugar de BssH2. A substituição de BspEI foi realizada por meio de PCR reversa realizada com os iniciadores indicados na Quadro 2 (referências A e B).

A sequência CH3 de ratinho presente no vector pUT foi substituída depois com uma sequência humana análoga amplificada por utilização dos iniciadores de referência 1 e 2. O iniciador 2 insere, além disso, uma sequência marcadora SV5 (reconhecida por mAB SV5) e os lugares de clonagem SpeI, PvuI e EcoRI. Foi utilizado ADnc de linfócitos B humanos como molde e foi realizada inserção em pUT por restrição com as RE BssHII e PvuI e subsequente ligação de vector e fragmento.

Como se indica na Figura 8, os domínios Fc de anticorpos humanos, de ratinho e de rato foram inseridos no vector pUT que foram modificados como foi descrito no ponto anterior. As sequências originais dos domínios CH2 e CH3 foram obtidas de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>, utilizando os números de acesso:

Homo sapiens J00220 (locus: gene de cadeia pesada IgA1)

Homo sapiens AF237583 (locus: gene de cadeia pesada IgG1)

Mus musculus: L27437 (locus: cadeia pesada de imunoglobulina gama)

Rattus norvegicus M28671 (locus: RATIGG2B).

Os iniciadores indicados na Quadro 2 e o ADNc de linfócitos B das espécies correspondentes foram utilizadas para clonagem por PCR. A clonagem em pUT foi realizada por restrição com BssHII e Spel e ligação depois da retirada de sequência prévia (CH3 humana).

A sequência de scFv foi clonada numa série de vectores pUT que continham domínios Fc de diferentes espécies descritas no ponto anterior, por meio de PCR com uma mistura de oligonucleótidos universais para amplificação de scFv humanos conhecidos (veja-se Sblattero D. e Bradbury A. *Immunotechnology*, 1998, 3:271-278, e indicado na Quadro 3), seguido de digestão com enzimas de restrição ApaLI e BssHII (ER).

A clonagem no vector pcDNA das construções obtidas em pUT foi realizada por digestão com enzimas HindIII e EcoRI, recuperação selectiva do fragmento que corresponde e clonagem em pcDNA3 que foi cortado com as mesmas ER (veja-se a descrição na Figura 8).

Quadro 2. Iniciadores utilizados para amplificação das regiões Fc indicadas (Ra = rato; Mo = ratinho; Hu: humano).

	Nome	Orientação	Sequência
A SEQ ID N° 17	PUT-ApaLI	Sense	5'ATC CGA GTC CAC ACC TGT GGA GAG AAA GGC AAA G 3'
B SEQ ID N° 18	PUT-Bssh11	Antisense	5'TCC TCA GCG CGC GGC TCT GGT GGC AGA CCG AAG G 3'
1 SEQ ID N° 19	HuGCH3-s	Sense	5'CAG GCG GCG CGC GGG CAG CCC CAG GAA CCA CAG 3'
2 SEQ ID N° 20	HuGCH3-a	Antisense	5'A CGT CGA TCG CCT GCT GAA TTC TTA AGT ACT ATC CAG GCC CAG CAG TGG GTT TGG GAT TGG TTT GCC ACT AGT TTT ACC CGG GGA CAG GGA GAG
3 SEQ ID N° 21	HuGCH2-s	Sense	5' AG GCG GCG CGC GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA 3'
4 SEQ ID N° 22	HuA-CH2-s	Sense	5'CAG GCG GCG CGC GTT CCC TCA ACT CCA CCT ACC
5 SEQ ID N° 23	HuA-CH3a	Antisense	5'CC GCT ACT AGT TTT ACC CGC CAA GCG GTC GAT
6 SEQ ID N° 24	MoG-CH3-s	Sense	5' CAG GCG GCG CGC GGC AGA CCG AAG GCT CCA C
7 SEQ ID N° 25	MoG-CH3-a	Antisense	5'CC GCT ACT AGT TTT ACC AGG AGA GTG GGA GAG
8 SEQ ID N° 26	MoGCH2-s	Sense	5'CAG GCG GCG CGC GGT TGT AAG CCT TGC ATA TGT ACA
9 SEQ ID N° 27	RaGCH3-s	Sense	5'CAG GCG GCG CGC GGG CTA GTC AGA AAA CCA CAG
10 SEQ ID N° 28	RaGCH3-a	Antisense	5'CC GCT ACT AGT TTT ACC CGG AGG CCG GGA GAT G
11 SEQ ID N° 29	RaGCH2-s	sense	5' CAG GCG GCG CGC CAC AAA TGC CCT ACA TGC CCT

Quadro 3. Mistura de Oligonucleótidos universais para amplificação de scFv de origem humana

Nome	Orientação	Sequência
VL1 SEQ ID N° 30	Sense	caggt <u>gtc cac</u> tcg gac atc crg dtg acc cag tct
VL2 SEQ ID N° 31	Sense	caggt <u>gtg cac</u> tcg gat att gtg wtg acn cag wct
VL3 SEQ ID N° 32	Sense	caggt <u>gtg cac</u> tcg cag cct gtg ctg car yc
VL4 SEQ ID N° 33	Sense	caggt <u>gtg cac</u> tcg tcc tat gwg ctg acw cag cca
JH1 SEQ ID N° 34	Antisense	gaccc <u>gcg cgc</u> gga gac rgt gac cag ggt
JH2 SEQ ID N° 35	Antisense	gaccc <u>gcg cgc</u> aga gac ggt gac crt kgt

Exemplo 12. Produção e validação do minicorpo de rato TSA12/22-CH2-CH3.

O plasmídeo pcDNA que portava a construção para o anticorpo TSA12/22, na versão que continha os domínios CH2-CH3, foi utilizado para transfecção *in vitro* da linha celular HEK 293. Depois do tratamento com ADN e lipofectina, as células foram seleccionados em presença do antibiótico G418. Depois de dois semanas em cultura, foram testados clones celulares simples para produção de anticorpos por detecção da actividade no sobrenadante. Um clone foi seleccionado e expandido para produção massiva do minicorpo TSA12/22-CH2-CH3. Foi levada a cabo a purificação do minicorpo por meio de cromatografia.

O anticorpo TSA12/22 purificado na versão que continha os domínios CH2-CH3 de rato (minicorpo TSA12/22 CH2CH3) foi testado com respeito a sua capacidade para inibir a via de activação de complemento clássica num ensaio *in vitro*, de acordo com as modalidades já descritas nos exemplos anteriores. no diagrama da Figura 9 se indica a percentagem de inibição de lise de eritrócitos de coelho sensibilizados com IgM, mediada por complemento em presença de concentrações fixas de scFv TSA12/22 ou um scFv não relacionado, de solução salina tamponada com GVBS e do

minicorpo composto por scFv TSA22/12 e domínios CH2-CH3 de rato.

A construção Tsa12/22-CH2-CH3 mostrou actividade inibidora significativamente melhor que o scFv que corresponde, como se pode observar na Figura 9.

Também foram realizadas testes de actividade *in vivo* no espaço de articulações de rato. Foi induzida artrite no tempo $t = 0$ por injeção intraarticular de metil-BSA (albumina de soro bovino) depois de que o animal fosse imunizado previamente com metil-BSA. Foram realizados tratamentos terapêuticos com o minicorpo por injeção intraarticular a $t = 0$ e 6 dias depois da indução da artrite. A eficácia do tratamento foi medida como número de leucócitos polimorfonucleares presentes no lavagem intraarticular e como redução de inchaço da articulação, como pode ser observado na Figura 10 em que se indica o percurso de PMN (leucócitos polimorfonucleares) recrutados ao espaço de articulação de rato em resposta à inflamação induzida por BSA. A menor percentagem de células em presença de minicorpo TSA22/12 CH2CH3, em dois pontos de tempo considerados, indica uma redução do processo inflamatório. A Figura 11 apresenta o efeito inibidor do minicorpo TSA22/12 CH2CH3 no alcance do inchaço das articulações causado pela reacção inflamatória. As medições realizadas depois de 20 dias avaliaram um efeito terapêutico do minicorpo também a longo prazo, quando foi administrado junto com BSA ou 6 dias depois.

CONCLUSÕES

Descobriu-se que os anticorpos ScFv, isolados como foi descrito no Exemplo 1, eram capazes de se ligar ao factor C5, de acordo com foi avaliada por ensaio ELISA e como se esperava a partir do tipo de selecção ou "panning" de partículas de fago realizado em C5. No entanto nem todos os anticorpos ScFv foram capazes de inibir a conversão de C5 a C5a + C5b e, portanto, as funções biológicas que seguem a

sua activação. Devido a que se liga em proximidade ao lugar de clivagem de C5 convertase na cadeia alfa do componente C5 activado e evita a produção de C5a e C5b, o anticorpo TSA12/22 inibe a actividade quimiotáctica induzida pelo primeiro e a actividade hemolítica mediada por C5b através de formação de MAC. Esta inibição funciona a jusante da activação do componente C3, portanto é independente do tipo de via de activação do complemento utilizada (clássica ou alternativa).

Além disso, o anticorpo TSA12-22 dimerizado por meio de domínios CH2 e CH3 de rato (minicorpo) resultou ser particularmente activo no tratamento a longo prazo.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Università degli Studi di Trieste
Consiglio Nazionale Ricerche
<120> Anticorpo anti-C5 do complemento e sua utilização
<130> 2728PTWO
<150> MI2002A001527
<151> 11-07-2002
<160> 35
<170> PatentIn versão 3.1
<210> 1
<211> 342
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(342)
<223> Cadeia leve do anticorpo TS-A12/22
<400> 1

gac atc cgg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc	48
Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc	96
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser	
20 25 30	
tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag	144
Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
35 40 45	
cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc	192
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
50 55 60	
cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc	240
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
65 70 75 80	
atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa	288
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln	
85 90 95	
tat tat agt act cct cag ctc act ttc ggc gga agg acc aaa gtg gat	336
Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Val Asp	
100 105 110	
atc aaa	342
Ile Lys	
<210> 2	
<211> 114	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Val Asp
 100 105 110

Ile Lys

<210> 3

<211> 345

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(345)

<223> Cadeia pesada do anticorpo TS-A12/22

<400> 3

cag gta cag ctg cag cag tca gag gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt agc tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
ggc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt	144
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
tca tac att agt agt agt agt agt acc ata tac tac gca gac tct gtg	192
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg aga ggg cct ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc	336
Ala Arg Gly Pro Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr	
100 105 110	
gtc tcc tca	345
Val Ser Ser	
115	

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Pro Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

- <210> 5
- <211> 750
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(750)
- <223> scFV
- <400> 5

gac atc egg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly 1 5 10 15	48
gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser 20 25 30	96
tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln 35 40 45	144
cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val 50 55 60	192
cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr 65 70 75 80	240
atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln 85 90 95	288
tat tat agt act cct cag ctc act ttc ggc gga agg acc aaa gtg gat Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Val Asp 100 105 110	336
atc aaa tcc gga ggg tcg acc ata act tcg tat aat gta tac tat acg Ile Lys Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr 115 120 125	384
aag tta tcc tcg agc ggt acc cag gta cag ctg cag cag tca gag gga Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Gly 130 135 140	432
ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser 145 150 155 160	480
gga ttc acc ttc agt agc tat ggc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro 165 170 175	528
ggg aag ggg ctg gag tgg gtt tca tac att agt agt agt agt acc Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr 180 185 190	576
ata tac tac gca gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp 195 200 205	624
aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu 210 215 220	672

gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	gcg	aga	ggg	cct	ggt	atg	gac	gtc	tgg	720
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Pro	Gly	Met	Asp	Val	Trp	
225						230				235					240	

ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca							750
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
				245					250							

<210> 6

<211> 250

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Val Asp
 100 105 110

Ile Lys Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr
 115 120 125

Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Gly
 130 135 140

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 145 150 155 160

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 165 170 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr
 180 185 190

Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 195 200 205

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 210 215 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Gly Met Asp Val Trp
 225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 7

<211> 15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(15)

<223> Região CDR1 de VH

<400> 7

agc tat ggc atg aac
 Ser Tyr Gly Met Asn
 1 5

15

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 9

<211> 51

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(51)

<223> Região CDR2 de VH

<400> 9

tac att agt agt agt agt agt acc ata tac tac gca gac tct gtg aag 48
 Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

ggc 51
 Gly

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(18)

<223> Região CDR3 de VH

<400> 11

ggg cct ggt atg gac gtc 18
 Gly Pro Gly Met Asp Val
 1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gly Pro Gly Met Asp Val
 1 5

<210> 13

<211> 63

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Ligador

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(63)

<223> Ligador VL-VH

<400> 13

tcc gga ggg tcg acc ata act tcg tat aat gta tac tat acg aag tta 48
 Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu
 1 5 10 15

tcc tcg agc ggt acc 63
 Ser Ser Ser Gly Thr
 20

<210> 14

<211> 21

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Ligador

<400> 14

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

Ser Ser Ser Gly Thr
 20

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Péptido que compreende lugar de clivagem de C5
 convertase. Que corresponde a aa 727-744 de proteína
 humana matura (P01031).

<400> 15

Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val
 1 5 10 15

Ser Lys

<212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(33)
 <223> Sequência derivada de número de acesso de GenBank
 AF237583
 <400> 19
 caggcggcgc gcgggcagcc ccaggaacca cag 33
 <210> 20
 <211> 94
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(94)
 <223> Sequência derivada de número de acesso de GenBank
 AF237583
 <400> 20
acgtcgatcg cctgctgaat tcttaagtac tatccaggcc cagcagtggg tttgggattg 60
gtttgccact agttttaccc ggggacaggg agag 94
 <210> 21
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(41)
 <223> Sequência derivada de número de acesso de GenBank
 AF237583
 <400> 21
 aggcggcgcg cgacaaaact cacacatgcc cacogtgcc a 41
 <210> 22
 <211> 33
 <212> ADN

<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(33)
<223> Sequência derivada de número de acesso de GenBank
J00220
<400> 22
caggcggcgc gcgtccctc aactccacct acc 33

<210> 23
<211> 32
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> Sequência derivada de número de acesso de GenBank
J00220
<400> 23
ccgctactag tttaccgc caagcggctg at 32

<210> 24
<211> 31
<212> ADN
<213> Mus musculus
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> Sequência derivada de número de acesso de GenBank
L27437
<400> 24
caggcggcgc gcggcagacc gaaggctcca c 31

<210> 25
<211> 32
<212> ADN
<213> Mus musculus
<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> Sequência derivada de número de acesso de GenBank
J00220
<400> 25
ccgctactag tttaccagg agaggggag ag 32
<210> 26
<211> 36
<212> ADN
<213> Mus musculus
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(36)
<223> Sequência derivada de número de acesso de GenBank
L27437
<400> 26
caggcggcgc gcggtgtaa gcctgcata tgtaca 36
<210> 27
<211> 33
<212> ADN
<213> Rattus norvegicus
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(33)
<223> Sequência derivada de número de acesso de GenBank
M28671
<400> 27
caggcggcgc gcgggctagt cagaaaacca cag 33
<210> 28
<211> 33
<212> ADN
<213> Rattus norvegicus
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(33)

<223> Sequência derivada de número de acesso de GenBank
M28671

<400> 28

ccgctactag ttttaccgg aggcgggag atg 33

<210> 29

<211> 33

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(33)

<223> Sequência derivada de número de acesso de GenBank
M28671

<400> 29

caggcggcgc gccacaaatg ccctacatgc cct 33

<210> 30

<211> 35

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(35)

<223> Oligonucleótido universal para amplificação de
VL1.

<400> 30

caggtgtgca ctcggacatc crgdtgaccc agtct 35

<210> 31

<211> 35

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(35)

<223> Nucleótido em posição 29 é oligonucleótido
universal "n" para amplificação de VL2.

<400> 31
 caggtgtgca ctcggatatt gtgwtgacac agwct 35
 <210> 32
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(31)
 <223> Oligonucleótido universal para amplificação de VL3.
 <400> 32
 caggtgtgca ctcgcagcct gtgctgcary c 31
 <210> 33
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> Oligonucleótido universal para amplificação de VL4.
 <400> 33
 caggtgtgca ctcgtcctat gwgctgacwc agcca 35
 <210> 34
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 <223> Oligonucleótido universal para amplificação de JH1.
 <400> 34
 gacccgcgcg cggagacrgt gaccagggt 29

<210> 35
<211> 29
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(29)
<223> Oligonucleótido universal para amplificação de
JH2.
<400> 35
gaccgcgcgcg cagagacggt gaccrtkgt 29

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

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

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 9529697 A [0007]
- WO 0230985 A [0008]
- IT MI20021527 A [0094]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **Evans, M. J et al.** *Mol. Immunol.*, 1995, vol. 32, 1183 [0007]
- **Thomas, T. C. et al.** *Mol. Immunol.*, 1996, vol. 33, 1389 [0007]
- **Fitch, J. C. et al.** *Circulation*, 1999, vol. 100, 2499 [0007]
- **Rathbum, G. et al.** *Immunoglobulin genes*. Academic Press, 1989 [0017]
- *Combinatorial Chemistry and Technology: Principles, Methods, and application*. Marcel Dekker Inc, 1999 [0018]
- **Shier, R.** *Gene*, 1996, vol. 169, 147 [0031]
- **Marks, J. D. et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 16007 [0031]
- **Sblattero, D.; Bradbury A.** *Nat. Biotechnol.*, 2000, vol. 18, 75 [0033] [0055] [0065]
- **Sheets, M. D. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998, vol. 96, 6157 [0048]
- *Complement technology*. **Harrison, R.A.; P.J. Lachmann.** *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publ, 1986 [0052]

- **Oppermann et al.** *Complement Inflamm.*, 1991, vol. 8, 13 [0053]
- **Marks, J. D. et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0054]
- Complement technology. **Harrison, R. A.; P. J. Lachmann.** Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publ, 1986 [0066]
- **Opperman et al.** *Complement Inflamm.*, 1991, vol. 8, 13 [0066]
- **Tedesco et al.** *J Exp. Med.*, 1997, vol. 185, 1619 [0066]
- **Li E et al.** *Protein Eng.*, 1997, vol. 10, 731-6 [0081]
- **Sblattero D.; Bradbury A.** *Immunotechnology*, 1998, vol. 3, 271-278 [0086]

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo humano que tem especificidade para o componente C5 activado do sistema de complemento **caracterizado por** reconhecer um polipéptido que tem pelo menos 80% de homologia com o péptido que compreende a região que corresponde à sequência 731-740 do componente C5 de complemento humano, o dito péptido tendo a sequência KDMQLGR↓LHMKTLTPVSK (SEQ ID N° 15) e em que o dito anticorpo inibe a conversão da cadeia de alfa de C5 em C5a e C5b e em que o dito anticorpo é produzido de forma recombinante e em que o anticorpo compreende ambas as sequências de aminoácidos identificadas como SEQ ID N° 2 e SEQ ID N° 4 ou suas mutações conservativas ou em que o anticorpo tem pelo menos 95% de homologia com a sequência de aminoácidos que corresponde à sequência SEQ ID N° 6.
2. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 1 em que o dito componente C5 é de mamífero.
3. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 2 em que o dito mamífero é seleccionado do grupo que consiste em: ser humano, ratinho, rato, coelho.
4. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** estar em forma de cadeia simples (scFv) que compreende uma região variável da cadeia leve ligada covalentemente a uma região variável da cadeia pesada.
5. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** facto de que a cadeia leve é uma cadeia lambda e a região variável da cadeia pesada é a região VH3.

6. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 5 **caracterizado por** ter a sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID N° 6.

7. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 5 **caracterizado por** compreender a sequência SEQ ID N° 6 em combinação com uma sequência derivada de uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina.

8. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 7 em que a dita região constante de cadeia pesada de imunoglobulina é seleccionada do grupo que consiste em: cadeia pesada de IgA humana, cadeia pesada de IgG humana, cadeia gama pesada murina, cadeia pesada de *Rattus norvegicus*.

9. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 8 **caracterizado por** ser dimérico.

10. Proteína quimérica recombinante **caracterizada por** compreender a sequência que corresponde a SEQ ID N° 6 ou uma sequência de proteína que tem pelo menos 95% de homologia com a SEQ ID N° 6, em que a dita proteína quimérica recombinante reconhece um polipéptido que tem pelo menos 80% de homologia com o péptido que compreende a região que corresponde à sequência 731-740 do componente C5 de complemento humano, o dito péptido tendo a sequência KDMQLGR↓LHMKTLIPVSK (SEQ ID N° 15) e em que a dita proteína quimérica recombinante inibe a conversão da cadeia alfa de C5 em C5a e C5b.

11. Sequências de nucleótidos isoladas que codificam os anticorpos recombinantes de acordo com as reivindicações 1-9.

12. Sequência de nucleótidos de acordo com a reivindicação 11 **caracterizada por** compreender a sequência SEQ ID N° 5.

13. Vectores que compreendem sequências de nucleótidos de acordo com as reivindicações 11 e 12.

14. Vectores de acordo com a reivindicação 13 **caracterizados pelo** facto de serem vectores de expressão em bactérias, leveduras ou células eucariotas superiores.

15. Anticorpos recombinantes de acordo com as reivindicações 1-9 ou proteínas de acordo com a reivindicação 10 para utilização em diagnóstico ou terapêutica.

16. Sequências de nucleótidos de acordo com as reivindicações 11-12 ou vectores de acordo com as reivindicações 13 e 14 para utilização terapêutica ou em diagnóstico.

17. Utilização de anticorpos ou proteínas recombinantes de acordo com a reivindicação 15 ou sequências de nucleótidos de acordo com as reivindicações 11-12 para a preparação de um medicamento para a prevenção e tratamento de doenças inflamatórias crónicas ou agudas.

18. Utilização de acordo com a reivindicação 17 em que a doença crónica é seleccionada entre: artrite reumatóide, glomerulonefrite, esclerose múltipla, neuropatias periféricas desmielinizantes, aterosclerose.

19. Utilização de acordo com a reivindicação 17 em que a doença aguda é seleccionada de: insuficiência de órgãos múltiplos e enfarte de miocárdio.

20. Utilização de acordo com a reivindicação 17 para a preparação de um medicamento para lesão do miocárdio de reperfusão depois de isquemia.

21. Composições farmacêuticas que compreendem como princípio activo qualquer dos anticorpos recombinantes de acordo com as reivindicações 1-9 ou das proteínas de acordo com a reivindicação 10 ou das sequências de nucleótidos de acordo com as reivindicações 11-12 em combinação com excipientes e/ou diluentes adequados.

22. Processo para seleccionar anticorpos anti-C5 de acordo com qualquer das reivindicações 1-10 dotados com a capacidade de inibir a formação de C5a a partir de C5, **caracterizado por** compreender uma primeira etapa de selecção do antígeno C5 e uma segunda etapa de selecção por meio de inibição de ensaio hemolítico em glóbulos vermelhos de ovelha (SRBC).

23. Processo para a preparação dos anticorpos ou proteínas recombinantes de acordo com as reivindicações 1-10 **caracterizado por** serem utilizadas sequências de nucleótidos isoladas de acordo com as reivindicações 11-12.

24. Utilização de anticorpos recombinantes de acordo com as reivindicações 1-9 ou de sequências de nucleótidos de acordo com as reivindicações 11-12 para estabelecer modelos animais não humanos de doenças causadas por hiperactivação do sistema de complemento.

25. Kit que compreende pelo menos um dos anticorpos recombinantes de acordo com as reivindicações 1-9 ou pelo menos uma das sequências de nucleótidos de acordo com as reivindicações 11-12.

26. Processo para a selecção de inibidores da conversão do componente C5 de complemento activado nos seus fragmentos biologicamente activos, **caracterizado pela** utilização de anticorpos ou proteínas recombinantes de acordo com as reivindicações 1-10.

27. Utilização de um péptido que tem a sequência KDMQLGR↓LHMKTLIPVSK para a selecção de anticorpos de acordo com a reivindicação 1.

28. Animais transgénicos não humanos, **caracterizados pelo** facto de expressarem sequências de nucleótidos de acordo com as reivindicações 11-12.

29. Células isoladas **caracterizadas por** serem transformadas com as sequências de nucleótidos de acordo com as reivindicações 11-12 ou pelos vectores de acordo com as reivindicações 13-14.

30. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** facto de que a cadeia leve é uma cadeia kappa ou V λ 3/V2-14.

31. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** facto de que a cadeia leve é V κ 4/DPK24.

32. Anticorpo recombinante de acordo com qualquer das reivindicações 5, 30 e 31, **caracterizado pelo** facto de que a região variável da cadeia pesada é VH3/V-48.