

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/46 (2013.01) **A61K 39/00** (2013.01)
C12P 21/02 (2013.01) **G01N 33/50** (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01) **C07K 16/10** (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01) **C07K 16/30** (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)

(22) Data de pedido: 2003.07.15	(73) Titular(es): MERUS B.V.	
(30) Prioridade(s): 2002.07.18 EP 02077953 2002.07.18 US 397066 P 2003.05.27 WO	PADUALAAN 8 (POSTVAK 133) 3584 CH	NL
PCT/EP03/50201	(72) Inventor(es): ABRAHAM BOUT	NL
(43) Data de publicação do pedido: 2011.04.27	RONALD HENDRIK PETER BRUS	NL
(45) Data e BPI da concessão: 2013.10.16 015/2014	PATRICIUS HENDRIKUS VAN BERKEL	NL
	TON LOGTENBERG	NL
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS	PT
	RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	

(54) Epígrafe: **PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE MISTURAS DE ANTICORPOS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS PARA PRODUZIR MISTURAS DE ANTICORPOS A PARTIR DE UM CLONE DE UMA ÚNICA CÉLULA HOSPEDEIRA. NESES MÉTODOS UMA SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA UMA CADEIA LEVE E SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICAM CADEIAS PESADAS SÃO EXPRESSAS NUMA CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE. OS ANTICORPOS NAS MISTURAS DE ACORDO COM A INVENÇÃO COMPREENDEM ADEQUADAMENTE CADEIAS LEVES IDÊNTICAS EMPARELHADAS COM CADEIAS PESADAS DIFERENTES CAPAZES DE EMPARELHAR COM A CADEIA LEVE, FORMANDO DESSE MODO DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO FUNCIONAIS. TAMBÉM SÃO PROPORCIONADAS PELA INVENÇÃO MISTURAS DE ANTICORPOS. ESSAS MISTURAS PODEM SER UTILIZADAS EM VARIADOS CAMPOS.

RESUMO**"PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE MISTURAS DE ANTICORPOS"**

A invenção proporciona métodos para produzir misturas de anticorpos a partir de um clone de uma única célula hospedeira. Nesses métodos uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve e sequências de ácido nucleico que codificam cadeias pesadas são expressas numa célula hospedeira recombinante. Os anticorpos nas misturas de acordo com a invenção compreendem adequadamente cadeias leves idênticas emparelhadas com cadeias pesadas diferentes capazes de emparelhar com a cadeia leve, formando desse modo domínios de ligação ao antígeno funcionais. Também são proporcionadas pela invenção misturas de anticorpos. Essas misturas podem ser utilizadas em variados campos.

DESCRIÇÃO

"PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE MISTURAS DE ANTICORPOS"

Campo da invenção

A presente invenção refere-se ao campo da medicina, mais em particular ao campo da produção de anticorpos, mais em particular à produção de misturas de anticorpos:

Antecedentes da invenção

A função essencial do sistema imunitário é a defesa contra as infeções. O sistema imunitário humoral combate moléculas que reconhece como não próprias, tal como agentes patogénicos, utilizando imunoglobulinas. Estas imunoglobulinas, também designadas anticorpos, são criadas especificamente contra o agente infeccioso, que atua como um antigénio, após o primeiro contacto (Roitt, Essential Immunology, Blackwell Scientific Publications, fifth edition, 1984). Os anticorpos são moléculas multivalentes que compreendem cadeias pesadas (H) e cadeias leves (L) unidas umas às outras com ligações persulfureto intercadeia. São conhecidos vários isotipos de anticorpos, incluindo IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgD, IgE, e IgM. Uma IgG contém duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Cada

cadeia contém regiões constantes (C) e variáveis (V), que podem ser quebradas nos domínios designados C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , V_H , e C_L , V_L (Fig. 1). O anticorpo liga-se ao antigénio através dos domínios da região variável contidos na porção, e após a ligação pode interagir com moléculas e células do sistema imunitário através dos domínios constantes, principalmente através da porção Fc. Os linfócitos B produzem anticorpos em resposta à exposição a substâncias biológicas como bactérias, vírus e seus produtos tóxicos. Os anticorpos são geralmente específicos para o epitopo e ligam-se fortemente a substâncias que comportam esses epitopos. A técnica de hibridoma (Kohler e Milstein 1975) tira partido da capacidade das células B para produzirem anticorpos monoclonais contra antigénios específicos e para produzir subsequentemente esses anticorpos monoclonais através da fusão de células B a partir de murganhos expostos ao antigénio de interesse com células de plasma de murino imortalizadas. Esta tecnologia resultou na realização de que os anticorpos monoclonais produzidos pelos hibridomas podem ser utilizados em investigação, diagnóstico e terapias para tratar diferentes tipos de doenças como o cancro e distúrbios autoimunes relacionados. Devido aos anticorpos que são produzidos em hibridomas de murganho induzirem respostas imunitárias fortes em humanos, foi apreciado na técnica que os anticorpos necessários para o tratamento bem-sucedido de humanos necessitarem de ser menos, ou preferencialmente não imunogénicos. Para isso, foram primeiro construídos anticorpos de murino, através da substituição das regiões constantes de murino com regiões

constantes de humano (referidas como anticorpos quiméricos). Subsequentemente, os domínios entre as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) nos domínios variáveis, as denominadas regiões de grelha, foram substituídas pelas suas equivalentes humanas (referidas como anticorpos humanizados). O estágio final neste processo de humanização foi a produção de anticorpos totalmente humanos.

Na técnica, também foram descritos anticorpos biespecíficos, que possuem especificidades de ligação para dois antígenos diferentes. Estes são geralmente utilizados para se dirigirem a uma fração terapêutica ou de diagnóstico, *e.g.*, células T, uma molécula de desencadeamento citotóxico ou um quelante que liga um radionuclídeo, que é reconhecido por uma região variável do anticorpo, a uma célula que é reconhecida pela outra região variável do anticorpo, *e.g.*, uma célula tumoral (ver para anticorpos biespecíficos Segal *et al*, 2001).

Merchant *et al* (*Nature Biotechnology*, Vol. 16, No.7 (1998), 677-681) descrevem a produção de uma IgG biespecífica humana, em que foi utilizada uma cadeia leve simples e foram remodeladas cadeias pesadas para heterodimerização utilizando ligações persulfureto modificadas em combinação com a tecnologia "botão-em-buraco". Foi alcançado um rendimento de 95% de heterodímero.

Lenz e Weidle (*Gene*, Vol. 87, No.2 (1990), 213-

218) descrevem um método para produzir anticorpos heterobifuncionais, em que genes clonados que codificam um anticorpo de interesse são introduzidos numa linha de células de hibridoma que segregam outro anticorpo de interesse. Deste modo, são obtidas linhas de células estáveis que segregam heteroanticorpos biespecíficos.

Um método muito útil conhecido na técnica para obter anticorpos monoclonais totalmente humanos com propriedades de ligação desejáveis emprega bibliotecas de apresentação em fagos. Esta é uma abordagem *in vitro*, à base de DNA recombinante, que mimetiza características chave da resposta imunitária humoral (ver para métodos de apresentação em fagos *e.g.* CF Barbas III *et al*, Phage Display. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001). Para a construção de bibliotecas de apresentação em fagos, são expressas coleções de genes região variável da cadeia pesada e da cadeia leve dos anticorpos monoclonais humanos na superfície de partículas de bacteriófagos, normalmente em Fv de cadeia simples (scFv) ou em formato Fab. Os fagos que expressam grandes bibliotecas de fragmentos de anticorpo contêm tipicamente mais do que 10^9 especificidades de anticorpo e podem ser montados a partir de regiões de imunoglobulina V expressas nos linfócitos B de indivíduos imunizados ou não imunizados. Alternativamente, as bibliotecas de apresentação em fagos podem ser construídas a partir de regiões variáveis de imunoglobulina que foram parcialmente montadas ou rearranjadas *in vitro*

para introduzir uma diversidade de anticorpos adicional na biblioteca (bibliotecas semissintéticas) (De Kruif *et al*, 1995b). Por exemplo, as regiões variáveis montadas *in vitro* contêm porções de DNA produzido sinteticamente, aliatorizado ou parcialmente aliatorizado nas regiões das moléculas que são importantes para a especificidade do anticorpo. A informação genética que codifica os anticorpos identificados por apresentação em fagos, pode ser utilizada para clonar os anticorpos num formato desejado, *e.g.* IgG, IgA ou IgM, para produzir o anticorpo com métodos do DNA recombinante (Boel *et al*, 2000). Um método alternativo para proporcionar anticorpos totalmente humanos utiliza murganhos transgênicos que compreendem material genético que codifica um repertório de imunoglobulina humana (Fishwild *et al*, 1996; Mendez *et al*, 1997). Esses murganhos podem ser imunizados com um antígeno alvo, e a resposta imunitária resultante irá produzir anticorpos totalmente humanos. As sequências destes anticorpos podem ser utilizadas em métodos de produção recombinante.

A produção de anticorpos monoclonais de rotina é realizada através da utilização da expressão recombinante das sequências de ácido nucleico que codificam as cadeias H e L dos anticorpos nas células hospedeiras (ver *e.g.* EP0120694; EP0314161; EP0481790; patente US 4,816,567; WO 00/63403).

Até à data, muitas doenças diferentes estão a ser tratadas com anticorpos monoclonais humanizados ou

totalmente humanos. Os produtos com base em anticorpos monoclonais que estão atualmente aprovados para utilização em humanos incluem Herceptin™ (anti-Her2/Neu), Reopro™ (anti-recetor da Glicoproteína IIB/ IIIA), Mylotarg™ (anti-CD33), Rituxan™ (Rituximab, anti- CD20), Simulect™ (anti-CD25), Remicade™ (anti-TNF), Synagis™ (anti-RSV), Zenapax™ (IL2-recetor), CAMPATH™ (anti-CD52). Apesar destes sucessos, ainda há espaço para novos produtos de anticorpo e para melhoramento considerável dos produtos de anticorpo existentes. A utilização de anticorpos monoclonais no tratamento do cancro demonstrou que as denominadas "variantes tumorais de perda de antígeno" podem surgir, tornando o tratamento com o anticorpo monoclonal menos eficaz. O tratamento com o anticorpo monoclonal de grande sucesso Rituximab (anti-CD20) tem demonstrado, por exemplo, que podem ocorrer variantes de escape de perda de antígeno, conduzindo à reincidência do linfoma (Massengale *et al*, 2002). Na técnica, a potência dos anticorpos monoclonais foi aumentada através da sua fusão com compostos tóxicos, tais como radionuclídeos, toxinas, citocinas, e semelhantes. Todavia, cada uma destas abordagens tem as suas limitações, incluindo problemas tecnológicos e de produção e/ou elevada toxicidade.

Para além disso, parece que o ganho em especificidade dos anticorpos monoclonais comparada com anticorpos policlonais indefinidos tradicionais, sucede à custa da perda de eficácia. *In vivo*, as respostas de anticorpo são policlonais na natureza, *i.e.* é produzida uma

mistura de anticorpos porque várias células B respondem ao antigénio, resultando em várias especificidades que estão presentes na mistura de anticorpo policlonais. Os anticorpos policlonais também podem ser utilizados para aplicações terapêuticas, *e.g.* para vacinação passiva ou para imunoterapia ativa, e presentemente são normalmente derivados de soros misturados de animais imunizados ou de humanos que recuperaram desta doença. O soro misturado é purificado na fração proteica ou de globulina gama, assim denominada porque contém predominantemente moléculas de IgG. Os anticorpos policlonais que são presentemente utilizados para tratamento incluem anticorpos policlonais anti-rhesus, gamaglobulina para imunização passiva, policlonal antiveneno de cobra (CroFab), Thymoglobulin™ para rejeição de aloenxerto, anti-digoxina para neutralizar o fármaco para o coração digoxina, e policlonal anti-raiva. Em anticorpos terapêuticos presentemente no mercado, um exemplo da eficácia superior dos anticorpos policlonais comparada com os anticorpos monoclonais pode ser encontrada no tratamento de rejeição aguda do transplante com anticorpos anti-células T. Os anticorpos monoclonais no mercado (anti-CD25 basiliximab) são menos eficazes do que um anticorpo policlonal de coelho contra timócitos (Thymoglobulin™) (comunicados de imprensa datados de 12 de Março, 29 de Abril, e 26 de Agosto de 2002, em www.sangstat.com). A utilização de soros humanos misturados, contudo, comporta potencialmente o risco de infeções com vírus, tais como HIV ou hepatite, com toxinas tais como lipopolissacarídeo, com agentes infecciosos proteicos tais

como priões, e com agentes infecciosos desconhecidos. Para além disso, o fornecimento que está disponível é limitado, e insuficiente para tratamentos humanos generalizados. Os problemas associados às presentes aplicações de anticorpos policlonais derivados de soros animais em clínica incluem uma forte resposta imunitária do sistema imunitário humano contra esses anticorpos estranhos. Por isso, esses policlonais não são adequados para tratamento repetido, ou para o tratamento de indivíduos que foram injetados previamente com outras preparações de soro da mesma espécie animal.

A técnica descreve a ideia da criação de animais com um repertório de imunoglobulina humana, que pode ser utilizado subsequentemente para imunização com um antigénio para obter anticorpos policlonais contra este antigénio a partir de animais transgénicos (WO 01/19394). Contudo, ainda é necessário ultrapassar muitos obstáculos tecnológicos antes de um tal sistema ser uma realidade prática em animais de maiores dimensões do que murganhos, e demorará anos de desenvolvimento antes de esses sistemas poderem proporcionar os anticorpos policlonais de um modo seguro e consistente em quantidades suficientes. Para além disso, os anticorpos produzidos a partir dos soros misturados, quer sejam de origem humana ou animal, compreenderão sempre uma quantidade elevada de especificidades não relacionadas e indesejáveis, como apenas uma pequena percentagem dos anticorpos presentes num dado soro serão dirigidas contra o antigénio utilizado para imunização. É, por

exemplo, conhecido que em animais normais, *i.e.* não transgênicos, cerca de 1-10% da fração de imunoglobulina em circulação está dirigida contra o antígeno utilizado para hiper-imunização, e conseqüentemente a vasta maioria das imunoglobulinas em circulação não é específica.

Foi descrita uma abordagem para a expressão de bibliotecas de anticorpos policlonais (WO 95/20401; Patentes US 5, 789, 208 e 6, 335, 163). Uma biblioteca policlonal de fragmentos de anticorpo Fab é expressa utilizando um vetor de apresentação em fagos, e selecionada para reatividade para um antígeno. As combinações de genes da região variável da cadeia pesada e leve selecionadas são transferidas em massa, como pares ligados, a um vetor de expressão eucariota que proporciona genes de região constante, para obter uma sub-biblioteca de anticorpos policlonais intactos. Após transfeção desta sub-biblioteca em células de mieloma, os clones estáveis produzem anticorpos monoclonais que podem ser misturados para obter uma mistura de anticorpos policlonais. Embora em teoria fosse possível obter anticorpos policlonais diretamente a partir de um processo de produção recombinante simples utilizando este método através da cultura de uma população mista de células transfetadas, ocorreriam problemas potenciais em relação à estabilidade da população mista de células, e conseqüentemente a consistência da mistura de anticorpos policlonais produzida. O controle de uma população total de células diferentes num processo de larga escala farmacêuticamente aceitável (*i.e.* industrial), é uma

tarefa assustadora. Pareceria que as características tais como taxas de crescimento das células e taxas de produção dos anticorpos deve permanecer estável para todos os clones individuais da população não clonal de modo a manter a proporção dos anticorpos na mistura de anticorpos policlonais mais ou menos constante. Assim, embora a necessidade de misturas de anticorpos possa ter sido reconhecida na técnica, não existem soluções aceitáveis para produzir misturas de anticorpos economicamente de um modo farmacêuticamente aceitável. É o objetivo da presente invenção para proporcionar novos meios para produzir uma mistura de anticorpos em hospedeiros recombinantes.

Breve descrição das figuras

Fig. 1 Representação esquemática de um anticorpo. As cadeias pesada e leve são emparelhadas através de ligações persulfureto intercadeia (linhas ponteadas). A cadeia pesada pode ser do isotipo α , γ , μ , δ ou ϵ . A cadeia leve é λ ou κ . É apresentado um anticorpo de isotipo IgG₁.

Fig. 2 Representação esquemática de um anticorpo monoclonal biespecífico. Um anticorpo biespecífico contém dois domínios funcionais diferentes F(Ab), indicados pelos diferentes padrões das regiões V_H-V_L.

Fig. 3 Alinhamento de sequências de V_L e V_H de

K53, UBS-54 e 02-237. A sequência de DNA de V_L comum de UBS54 e K53 é SEQ. ID. NO. 1, enquanto a sequência de aminoácidos é apresentada como SEQ. ID. NO. 2. As sequências de DNA de V_L de 02-237, e V_H de UBS54, K53 e 02-237 são SEQ. ID. NOs. 3, 5, 7 e 9, respetivamente, enquanto as sequências de aminoácidos são apresentadas nas SEQ. ID. NOs. 4, 6, 8 e 10, respetivamente.

Fig. 4 Visão global dos plasmídeos pUBS3000Neo e pCD46 3000 (Neo).

Fig. 5 A. IEF de pUBS3000Neo, pCD46_3000(Neo) expressos de forma transiente e uma combinação de ambos. B. A parte superior apresenta uma representação esquemática das moléculas esperadas quando a cadeia leve simples e a cadeia pesada simples são expressas numa célula, conduzindo aos anticorpos monoclonais UBS-54 ou K53. A parte inferior sob a seta apresenta uma representação esquemática das combinações produzidas quando ambas as cadeias pesadas e a cadeia leve comum são co-expressas numa célula hospedeira, com quantidades teóricas quando ambas as cadeias pesadas são expressas a níveis iguais e emparelham uma com a outra com eficiência igual. A cadeia leve comum está indicada com as barras com listas verticais.

Fig. 6. Representação esquemática de uma forma de realização possível do método de acordo com a invenção (ver *e.g.* Exemplos 9). (1) Introdução de sequências de ácido nucleico que codificam uma cadeia leve e três cadeias pesadas diferentes capazes de emparelhar com a cadeia leve comum para produzir anticorpos funcionais nas células hospedeiras; (2) seleção de clones estáveis; (3) os clones podem ser rastreados para *e.g.* níveis de expressão, ligação; (4) expandir clones; (5) produção de misturas de anticorpos funcionais. Alguns ou todos os passos 2-5 podem ser realizados simultaneamente ou numa ordem diferente.

Fig. 7. Sequência de V_H e V_L de fagos dirigidos contra CD22 (clone B28), CD72 (clone II-2) e HLA-DR (classe II; clone I-2). As sequências de DNA da V_L dos clones B28, II-2 e I-2 são SEQ. ID. NOs. 11, 13 e 15, respetivamente, embora as sequências de aminoácidos sejam SEQ. ID. NOs. 12, 14 e 16, respetivamente. A sequência de DNA da cadeia leve comum destes clones é SEQ. ID. NO. 17, embora a sequência de aminoácidos seja SEQ. ID. NO. 18.

Fig. 8. Mapa de pUBS54-IgA (pCRU-L01 que codificam IgA1 humana contra EPCAM).

Fig. 9. IgA dimérico biespecífico com uma cadeia leve simples (indicada por uma barra de listas horizontais). O método da invenção irá produzir uma mistura de formas em que as cadeias pesadas diferentes podem ser emparelhadas, e apenas a forma mais simples é apresentada nesta representação esquemática. Uma cadeia J é apresentada para unir os dois monómeros.

Fig. 10. IgM pentamérica multiespecífica com uma cadeia leve simples (indicada por barras listadas horizontalmente). O método da invenção irá produzir uma mistura de muitas formas diferentes em que cadeias pesadas diferentes podem ser emparelhadas, e apenas a forma mais simples quando 5 cadeias pesadas diferentes são expressas com uma única cadeia leve, e todas as 5 cadeias pesadas diferentes são incorporadas no pentâmero e emparelhadas com a mesma cadeia pesada, é apresentada nesta representação esquemática. Os pentâmeros com menos especificidades podem também ser formados por incorporação de menos do que 5 cadeias pesadas diferentes. Especialmente quando a cadeia J não é expressa, também podem ser obtidos hexâmeros.

Fig. 11. Expressão de uma mistura de isotipos de IgG humanos consistindo de uma cadeia leve comum, mas com especificidades de ligação diferentes numa célula simples para evitar a formação de

anticorpos biespecíficos. As especificidades de ligação diferentes são indicadas pelas cores diferentes das sequências de V_H . A cadeia leve comum é indicada com as barras de listas verticais. O isotipo IgG₁ é indicado com o Fc cinzento, o isotipo IgG3 é indicado com a parte Fc preta.

Fig. 12. Sequências de DNA e de proteína de domínios variáveis de cadeias pesada e leve de K53, UBS54 e 02-237 IgG.

Fig. 13 Alinhamento das sequências variáveis das cadeias pesadas de K53, 02-237 e UBS54. As regiões CDR1, CDR2 e CDR3 estão indicadas a negrito.

Fig. 14 Análise BIACORE de K53 e 02- 237. A CD46 humana purificada por afinidade a partir de células LS174T foi acoplada (640 RU) a chips CM5 (BIACORE BR-1000-14). Ligação de 1000 (A), 500 (B), 250 (C), 125 (D), 63 (E), 31 (F), 16 (G), 8 (H) ou 0 (I) nM 02-237 ou k53 purificada a partir de linhas celulares derivadas de PER.C6TM estáveis para a CD46 foi monitorizada utilizando um sistema BIACORE 3000 a 37 °C. Utilizando esta configuração experimental, foi observada uma Kd de $9,1 \times 10^{-7}$ e $2,2 \times 10^{-8}$ para K53 e 02-237, respetivamente.

Fig. 15 Ligação de K53 e 02-237 a células LS174T. Diluições em série de 02-237 purificada (■), K53 (*) e o controlo negativo GBSIII (◇) conjugado com biotina foram incubados com células LS147T pré-incubadas com soro humano normal para bloquear a interação do recetor Fcγ. A ligação (MFI, ordenada) foi determinada por FACS após incubação com ficoeritrina conjugada com estreptavidina.

Fig. 16. Análise de SDS-PAGE de frações IgG purificadas. Foram analisadas 3 mg de IgG purificada num gel Nupage não reduzido (A) e reduzido (B) a 4-20% (Novex) de acordo com as recomendações do fabricante. As proteínas foram visualizadas através de coloração com azul coloidal (Novex cat. No LC6025) de acordo com as recomendações do fabricante. A identidade do clone é indicada no topo do SDS-PAGE. Cada gel contém um controlo, que é 02-237 ou K53 purificado. NR, Não-reduzido; R, reduzido.

Fig. 17. Análise por IEF de frações IgG purificadas. Foram analisadas 10 mg de IgG purificada num gel Isogel 3-10 (BMA) de acordo com as recomendações do fabricante. As proteínas foram visualizadas por coloração com azul coloidal (Novex, cat. No LC6025) de acordo com as recomendações do fabricante. A identidade do

clone é indicada no topo da IEF. Cada gel contém um controlo, consistindo numa mistura de 1:1:1 de 02-237, K53 e UBS54.

Fig. 18. A análise por IEF das misturas policlonais 241, 280, 282, 361 e 402 em comparação com K53, 02-237 e UBS54 simples. Foram analisados 10 mg de IgG purificada num gel Isogel 3-10 (BMA) de acordo com as recomendações do fabricante. AS proteínas foram visualizadas por coloração com azul coloidal (Novex, cat. No LC6025) de acordo com as recomendações do fabricante. A identidade de IgG está indicada no topo da IEF.

Fig. 19. Cromatogramas de massa dos péptidos CDR3 de K53, 02-237, UBS54 e os dois péptidos únicos de cadeia leve L1-K53/UBS54 e L1-237 na fração IgG Polyl-280. No lado direito de cada cromatograma de massa, é apresentado o padrão isotópico do péptido. O ião duplamente carregado a m/z 1058,98 (Pm 2115,96 Da) resulta do péptido H11-K53. O ião duplamente carregado a m/z 1029,96 (Pm 2057,92 Da) resulta do péptido H11-02-237. O ião triplamente carregado a m/z 770,03 (Pm 2307,09 Da) resulta do péptido H9-UBS54. O ião duplamente carregado a m/z 1291,08 (Pm 2580,16 Da) resulta do péptido L1-K53/UBS54. O ião duplamente carregado a m/z 1278,11 (Pm 2554,22 Da) resulta do péptido L1-02-237. A IgG puri-

ficada foi dissolvida num RapiGestTM (Waters) a 0,1% em NH_4HCO_3 a 50 mM. As ligações persulfureto foram reduzidas utilizando DTT a 1 M (1, 4-ditio-DL-treitol), seguido por incubação a 65° C durante 30 minutos. Depois, para alquilação de todos os grupos sulfidrílo, foi adicionado iodoacetamida a 1 M, seguido por incubação à temperatura ambiente durante 45 minutos às escuras. A alquilação foi parada pela adição de DTT a 1 M. O tampão foi trocado para NH_4HCO_3 a 25 mM, pH 7,5. Finalmente, os anticorpos foram digeridos durante a noite a 37 °C através da adição de uma solução de tripsina preparada de fresco em NH_4HCO_3 a 25 mM. A mistura de péptidos foi analisada por LC-MS. O sistema LC consistiu numa coluna Vydac de fase reversa C18, que foi eluída através da aplicação de um gradiente de solvente A (5/95/1 acetonitrilo, água, ácido acético glacial v/v/v) e solvente B (90/10/1 acetonitrilo, água, ácido acético glacial v/v/v). Uma LC foi acoplada em linha com um espectrómetro de massa Q-TOF2 (Micromass), equipado com uma fonte de electrosprays operado a 3 kV. Os espectros de massa foram registados num modo de ião positivo desde m/z 50 até 1500 numa voltagem em cone de 35 V. A resolução instrumental de >10, 000 permitiu uma determinação sem ambiguidade da carga, e por isso a massa da maioria dos iões era até pelo menos +7. Deste modo, todos os péptidos foram iden-

tificados de acordo com o seu peso molecular. A sequência de aminoácidos do péptido foi confirmada por experiências de MS/MS. Os espectros de MS/MS foram registados num modo de ião positivo a partir de m/z 50-2000 com energia de colisão entre 20 e 35 eVolts.

Fig. 20. Análise de BIACORE do policlonal 280. CD46 humana purificada por afinidade a partir de células LS174T foi acoplada (640 RU) a chipes CM5 (BIACORE BR- 1000-14). A ligação de 1000 (A), 500 (B), 250 (C), 125 (D), 63 (E), 31 (F), 16 (G), 8 (H) ou 0 (I) nM Polyl-280 a CD46 foi monitorizada utilizando um sistema BIACORE 3000 a 37 °C.

Fig. 21. Análise de IEF de sub- clones dos clones poly 1-241, poly 1-280 e poly 1-402 produzindo uma mistura de anticorpos.

A. Clones poly 1-241 e poly 1-280. A pista 1 contém um marcador de pI (Amersham, Cat. No. 17-0471- 01). A pista 2 contém IgG isolada do clone parental poly 1-241 (como na Fig. 18). As pistas 3, 4 e 5, respetivamente, contém IgG isolada de 3 sub- clones independentes derivados de poly 1-241 por diluição limitante. A pista 6 contém IgG isolada do clone parental poly 1-280 (como na Fig. 18). As pistas 7, 8 e 9, respec-

tivamente, contêm IgG isolada de três sub-clones independentes derivados de poly 1-280 por diluição limitante.

B. Clone poly 1-402. As pistas 1 e 7 contêm um marcador de pI. A pista 2 contém IgG isolada do clone parental poli 1-402 (como na Fig. 18). As pistas 3, 4 e 5, respectivamente, contêm IgG isolada a partir de 3 sub-clones independentes derivados de poly 1-402 por diluição limitante. A pista 6 contém uma mistura de controlo (uma mistura 1:1:1 de 02-237, K53 e UBS54).

Fig. 22. Análise de FACS de misturas de anticorpos produzidas a partir de sub-clones de poly 1-241 (A), poly 1-280 (B) e poly 1-402 (C). A ligação das misturas de anticorpos às células transfetadas com cDNA de CD46, EpCAM, ou um controlo negativo (CD38), foi determinada com análise de FACS, e a intensidade fluorescente média (MFI) é apresentada para os vários clones parentais e três sub-clones independentes de cada. Os anticorpos de controlo GBS-III (controlo negativo), anti-CD72 (02-004; controlo negativo) e os anticorpos simples UBS54, 02-237 e K53 também estão incluídos.

Sumário da invenção

Num aspeto a presente invenção proporciona um método para identificar pelo menos um clone de célula hospedeira que produz uma mistura de anticorpos, em que a referida mistura de anticorpos possui um efeito desejado de acordo com um ensaio funcional, compreendendo o método os passos de:

- (i) proporcionar uma célula hospedeira com uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve e sequências de ácido nucleico que codificam duas cadeias pesadas diferentes, em que as referidas cadeias pesada e leve são capazes de emparelhar uma com a outra;
- (ii) cultivar pelo menos um clone da referida célula hospedeira em condições conducentes à expressão das referidas sequências de ácido nucleico;
- (iii) rastreio do referido, pelo menos um clone da célula hospedeira, para a produção de uma mistura de anticorpos que possuem o efeito desejado através de um ensaio funcional; e
- (iv) identificar pelo menos um clone que produz uma mistura de anticorpos que possuem o efeito desejado.

Um outro aspeto da invenção é a eliminação da produção de emparelhamento potencialmente não funcional das

cadeias leve-pesada utilizando combinações pré-selecionadas de cadeias pesadas e leves. Foi reconhecido que as bibliotecas de apresentação em fagos construídas a partir de uma cadeia leve simples e muitas cadeias pesadas diferentes podem codificar fragmentos de anticorpo com propriedades de ligação muito distintas. Esta característica pode ser utilizada para encontrar anticorpos diferentes que possuem a mesma cadeia leve mas diferentes cadeias pesadas, contra o mesmo alvo ou alvos diferentes, em que um alvo pode ser um antígeno completo ou um seu epitopo. Esses alvos diferentes podem estar, por exemplo, na mesma superfície (*e.g.* célula ou tecido). Esses fragmentos de anticorpo obtidos por apresentação de fago pode ser clonado nos vetores para o formato desejado, *e.g.* IgG, IgA ou IgM, e as sequências de ácido nucleico que codificam estes formatos podem ser utilizados para transfetar células hospedeiras. Numa abordagem, as cadeias H e L podem ser codificadas por diferentes construções que, após transfeção para uma célula na qual elas são expressas, dão origem a moléculas de Ig intactas. Quando são transfetadas diferentes construções de cadeia H para uma célula com uma construção de cadeia L simples, as cadeias H- e L- serão montadas para formar todas as combinações possíveis. Todavia, em contraste com as nas quais são expressas cadeias leves diferentes tais como para a produção de anticorpos biespecíficos, este método irá resultar apenas em regiões de ligação funcionais. Seria particularmente útil quando o hospedeiro, *e.g.* uma linha celular simples, é capaz de expressar níveis aceitáveis de anticorpos recom-

binantes, sem a necessidade de primeiro amplificar na referida célula as sequências de ácido nucleico que codificam os anticorpos. A vantagem é que é esperado que as linhas celulares com apenas um número de cópias limitado dos referidos ácidos nucleicos sejam geneticamente mais estáveis, porque haverá menos recombinação entre as sequências que codificam as cadeias pesadas, do que nas linhas celulares nas quais está presente uma multitude destas cópias. Uma linha celular adequada para utilização nos métodos de acordo com a invenção é a linha celular humana PER.C6™. Utilizando este método pode ser produzida uma mistura de anticorpos com especificidades definidas a partir de um clone de célula única de um modo seguro, controlado, e consistente.

A invenção proporciona um método de produção de uma mistura de anticorpos, compreendendo o passo de:

- (i) cultivar um clone de célula hospedeira identificado por um método de acordo com a invenção em condições que conduzem à expressão dos ácidos nucleicos que codificam a cadeia leve e as duas cadeias pesadas diferentes.

Num aspeto preferido, a célula hospedeira recombinante compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve comum que é capaz de emparelhar com as referidas pelo menos três cadeias pesadas diferentes, de modo a que os anticorpos produzidos

compreendam uma cadeia leve comum. Obviamente, os especialistas na técnica reconhecerão que "comum" também se refere a equivalentes funcionais da cadeia leve da qual a sequência de aminoácidos não é idêntica. Existem muitas variantes da referida cadeia leve em que estão presentes mutações (deleções, substituições, adições) que não influenciam materialmente a formação de regiões de ligação funcionais.

A invenção proporciona ainda uma mistura de anticorpos compreendendo uma cadeia leve comum e duas cadeias pesadas diferentes com uma região variável diferente, em que as duas cadeias pesadas diferentes são capazes de emparelhar com a referida cadeia leve comum, e em que as referidas cadeias pesadas diferem ainda nas suas regiões constantes suficientemente de modo a que a quantidade de anticorpos biespecíficos é diminuída em comparação com a percentagem teórica de anticorpos biespecíficos. Numa forma de realização, as cadeias leves dessas misturas possuem uma sequência comum. A mistura de anticorpos pode ser produzida pelo método de acordo com a invenção. Preferencialmente, a mistura de anticorpos é mais eficaz do que os anticorpos individuais que compreende, mais preferencialmente, a mistura atua sinergisticamente num ensaio funcional.

Os clones independentes obtidos a partir da transfeção das sequências de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e mais do que uma cadeia pesada podem expressar

os diferentes anticorpos na mistura a diferentes níveis. É outro aspeto da invenção selecionar um clone utilizando um ensaio funcional, para a mistura de anticorpos mais potente. A invenção proporciona deste modo um método para identificar pelo menos um clone de célula hospedeira que produz uma mistura de anticorpos, em que a referida mistura de anticorpos possui um efeito desejado de acordo com um ensaio funcional, compreendendo o método os passos de: (i) proporcionar uma célula hospedeira com uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve e sequências de ácido nucleico que codificam duas cadeias pesadas diferentes, em que as referidas cadeias pesadas e leves são capazes de emparelhar uma com a outra; (ii) cultivar pelo menos um clone da referida célula hospedeira em condições que conduzem à expressão das referidas sequências de ácido nucleico; (iii) rastrear o referido pelo menos um clone da célula hospedeira para produção de uma mistura de anticorpos possuindo o efeito desejado através de um ensaio funcional; e (iv) identificar pelo menos um clone que produz uma mistura de anticorpos possuindo o efeito desejado. Este método de acordo com a invenção pode ser realizado utilizando processos de elevado rendimento, se desejado. Os clones identificados pelo método podem ser utilizados para produzir misturas de anticorpos de acordo com a invenção.

A invenção proporciona ainda um animal transgénico não humano animal ou uma planta transgénica compreendendo uma sequência de ácido nucleico recombinante

que codificam uma cadeia leve comum e uma sequência de ácido nucleico recombinante ou sequências que codificam pelo menos duas cadeias pesadas diferentes que são capazes de emparelhar com a referida cadeia leve comum, em que as referidas sequências de ácido nucleico recombinantes que codificam as referidas cadeias pesadas e leves estão sob o controle de um promotor específico para o tecido.

A invenção proporciona ainda composições farmacêuticas compreendendo uma mistura de anticorpos produzidos de forma recombinante de acordo com a invenção e um veículo adequado.

A invenção proporciona ainda misturas de anticorpos de acordo com a invenção para utilização no tratamento ou diagnóstico e para a preparação de um medicamento para utilização no tratamento ou diagnóstico de uma doença ou distúrbio num indivíduo humano ou animal.

A invenção proporciona ainda um método de acordo com a invenção para produzir uma mistura de anticorpos compreendendo diferentes isotipos de um clone de uma única célula hospedeira.

A invenção proporciona ainda um método de acordo com a invenção para identificar uma mistura de anticorpos possuindo um efeito desejado num ensaio funcional.

Descrição detalhada da invenção

O termo "anticorpo", como aqui utilizado significa um polipéptido contendo um ou mais domínios que ligam um epitopo num antigénio, em que esses domínios são derivados de ou possuem identidade de sequência com a região variável de um anticorpo. A estrutura de um anticorpo está representada esquematicamente na Fig.1. Exemplos de anticorpos de acordo com a invenção incluem anticorpos de comprimento total, fragmentos de anticorpo, anticorpos biespecíficos, imunoconjugados, e semelhantes. Um anticorpo de acordo com a invenção pode ser o isotipo IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgM, e semelhantes, ou um derivado destes. Fragmentos de anticorpo incluem os fragmentos Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, e semelhantes. Anticorpos de acordo com a invenção podem ser de qualquer origem, incluindo murino, de mais do que uma origem, *i.e.* anticorpos quiméricos, humanizados, ou totalmente humanos. Os imunoconjugados compreendem domínios de ligação ao antigénio e uma parte não anticorpo tal como uma toxina, um marcador radioativo, uma enzima, e semelhantes. Um "domínio de ligação ao antigénio" compreende preferencialmente regiões variáveis de uma cadeia pesada e uma cadeia leve, e é responsável por ligação específica a um antigénio de interesse. Os anticorpos recombinantes são preparados através da expressão de ambas uma cadeia pesada e uma leve numa célula hospedeira. De um modo semelhante, através da expressão de duas cadeias com as suas respectivas cadeias leves (ou uma cadeia leve comum), em que cada

cadeia pesada/cadeia leve possui a sua própria especificidade, podem ser preparados os denominados anticorpos "biespecíficos". Os "Anticorpos biespecíficos" compreendem combinações de cadeias pesada-leve não idênticas (Fig. 2), e ambas as regiões de ligação ao antigénio de um anticorpo biespecífico podem reconhecer antigénios diferentes ou epitopos diferentes num antigénio.

Uma "cadeia leve comum" de acordo com a invenção refere-se a cadeias leves que podem ser idênticas ou possuem diferenças nas sequências de aminoácidos. As referidas cadeias leves podem compreender mutações que não alteram a especificidade do anticorpo quando combinada com a mesma cadeia pesada, sem se afastar do âmbito da presente invenção. É por exemplo possível, dentro do âmbito da definição das cadeias leves comuns como aqui utilizado, preparar ou encontrar cadeias leves que não são idênticas mas ainda são funcionalmente equivalentes, *e.g.* através da introdução e teste de alterações de aminoácidos conservativos, alteração de aminoácidos em regiões que não contribuem, ou contribuem apenas parcialmente para a especificidade de ligação quando emparelhada com a cadeia pesada, e semelhantes. É um aspeto da presente invenção utilizar como cadeia leve comum uma cadeia leve idêntica para combinar com cadeias pesadas diferentes para formar anticorpos com domínios de ligação ao antigénio funcionais. A utilização de uma cadeia leve comum evita a formação de heterodímeros em que o emparelhamento das cadeias leves e pesadas resulta em domínios de ligação ao antigénio que não

são funcionais, por outras palavras que não são capazes de se ligar ao antigénio ou antigénios alvo. A utilização de uma cadeia leve comum e duas cadeias pesadas foi proposta por (Merchant *et al*, 1998; WO 98/50431) para um objetivo diferente, viz. para *aumentar* a formação de anticorpos biespecíficos funcionais à custa da complexidade da mistura de anticorpos. Estas publicações ensinam um método para produzir preferencialmente um anticorpo biespecífico definido e desejado, *minimizando* desse modo a complexidade da mistura produzida. Assim, Merchant ensina especificamente a prevenir a produção de anticorpos monoespecíficos, porque estes são produtos colaterais indesejáveis no processo para a produção de anticorpos biespecíficos descrito nestas publicações. Claramente, não há ensinamentos na técnica anterior para preparar uma mistura de anticorpos complexa de uma célula hospedeira recombinante evitando a formação de domínios de ligação não funcionais ou os seus benefícios, muito menos como. No método de acordo com a presente invenção, são expressas duas cadeias pesadas diferentes que são capazes de emparelhar com a cadeia leve comum.

"Cadeias pesadas diferentes" de acordo com a invenção podem diferir na região variável e possuem a mesma região constante. Noutras formas de realização, em que é claro a partir do contexto, elas possuem a mesma região variável e diferem na região constante, *e.g.* podem ser de um isotipo diferente. A utilização de uma mistura de anticorpos possuindo diferentes regiões constantes, tais

como a porção Fc, pode ser vantajosa se diferentes braços do sistema imunitário forem mobilizados no tratamento do corpo humano ou animal. Ainda noutras formas de realização, também será claro dentro do contexto, tanto as regiões variáveis como a constante podem diferir.

Uma "mistura de anticorpos" de acordo com a invenção compreende pelo menos dois anticorpos não idênticos, mas pode compreender 3 anticorpos diferentes, e pode assemelhar-se a um policlonal ou pelo menos uma mistura de anticorpo oligoclonal em relação à complexidade e ao número de moléculas de ligação ao antigénio funcional. As misturas produzidas de acordo com a presente invenção normalmente irão compreender anticorpos biespecíficos. Se desejado, a formação de anticorpos monoespecíficos na mistura pode ser favorecida em relação à formação de anticorpos biespecíficos. Quando são expressas n cadeias pesadas e uma cadeia leve comum de acordo com a invenção numa célula hospedeira a níveis iguais, a percentagem teórica de anticorpos biespecíficos produzidos pelo método de acordo com a invenção é $(1 - 1/n) * 100\%$. O número total de anticorpos diferentes na mistura produzida pelo método de acordo com a invenção é teoricamente $n + \{(n^2 - n)/2\}$, dos quais $(n^2 - n)/2$ são anticorpos biespecíficos. A distorção da proporção dos níveis de expressão das cadeias pesadas diferentes pode conduzir a valores desviantes dos valores teóricos. A quantidade de anticorpos biespecíficos também pode ser diminuída, em comparação com os valores teóricos, se não todas as cadeias pesadas emparelham com igual

eficiência. É por exemplo possível modificar as cadeias pesadas, *e.g.* através da introdução de superfícies de interação específica e complementar entre cadeias pesadas selecionadas, para promover o emparelhamento de homodímeros em relação ao emparelhamento de heterodímeros, contrariamente ao que foi proposto por Merchant, *supra*. As cadeias pesadas também podem ser selecionadas de modo a minimizar a formação de heterodímeros na mistura. Uma forma especial desta forma de realização envolve cadeias pesadas de dois ou mais isotipos diferentes (*e.g.* IgG₁, IgG3, IgA). Quando são expressas cadeias pesadas de diferentes isotipos na mesma célula hospedeira de acordo com a presente invenção e uma cadeia leve que pode emparelhar com essas cadeias pesadas, a quantidade de anticorpos biespecíficos será reduzida, possivelmente para níveis muito baixos ou mesmo indetetáveis. Assim, quando os anticorpos biespecíficos são menos desejáveis, é possível produzir uma mistura de anticorpos de acordo com a invenção, em que uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve comum e sequências de ácido nucleico que codificam duas cadeias pesadas diferentes com uma região variável diferente capaz de emparelhar com a referida cadeia leve comum são expressas num hospedeiro recombinante, e em que as referidas cadeias pesadas diferem ainda nas suas regiões constantes suficientemente para reduzir ou prevenir o emparelhamento entre as cadeias pesadas diferentes. As misturas de anticorpos de acordo com a invenção podem ser produzidas a partir de um clone que foi derivado de uma única célula hospedeira, *i.e.* a partir de uma população de

células que contêm as mesmas sequências de ácido nucleico recombinante.

Será entendido que as cadeias pesadas diferentes de acordo com a invenção podem ser codificadas em moléculas de ácido nucleico separadas, mas também podem estar presentes numa molécula de ácido nucleico compreendendo diferentes regiões que codificam as referidas pelo menos três cadeias pesadas. As moléculas de ácido nucleico normalmente codificam precursores das cadeias leve e/ou pesadas, que quando expressas são segregadas a partir das células hospedeiras, tornando-se assim processadas para produzir a forma madura. Estes e outros aspetos da expressão de anticorpos numa célula hospedeira são bem conhecidos daqueles com experiência normal na técnica.

Uma "célula hospedeira recombinante", como aqui utilizado é uma célula compreendendo um ou more dos denominados transgenes, i.e. sequências de ácido nucleico recombinante não presentes naturalmente na referida célula. Estes transgenes são expressos na referida célula hospedeira para produzir anticorpos recombinantes codificada por estas sequências de ácido nucleico, quando estas células são cultivadas em condições condutoras para expressão das referidas sequências de ácido nucleico. A célula hospedeira de acordo com a invenção pode estar presente na forma de uma cultura a partir de um clone que é derivado de uma única célula hospedeira em que os transgenes foram introduzidos. Para obter a expressão de sequências de ácido

nucleico que codificam os anticorpos, é bem conhecido dos especialistas da técnica que as sequências capazes de conduzir esta expressão podem estar funcionalmente ligadas às sequências de ácido nucleico que codificam os anticorpos. Funcionalmente ligado pretende descrever que as sequências de ácido nucleico que codificam os fragmentos de anticorpo ou seus precursores estão ligadas às sequências capazes de conduzir a expressão de modo a que estas sequências podem conduzir a expressão dos anticorpos ou seus precursores. Os vetores de expressão úteis estão disponíveis na técnica, *e.g.* a série de vetores pcDNA da Invitrogen. Quando a sequência que codifica o polipéptido de interesse é adequadamente inserida com referência a sequências que governam a transcrição e tradução do polipéptido codificado, a cassette de expressão resultante é útil para produzir o polipéptido de interesse, referido como expressão. As sequências que conduzem a expressão podem incluir promotores, estimuladores e semelhantes, e suas combinações. Estas devem ser capazes de funcionar na célula hospedeira, conduzindo deste modo a expressão das sequências de ácido nucleico que estão funcionalmente ligadas a estas. Os promotores podem ser constitutivos ou regulados, e podem ser obtidos de várias fontes, incluindo vírus, procarióticas, ou fontes eucarióticas, ou artificialmente concebidas. A expressão de ácidos nucleicos de interesse pode ser a partir de promotor natural ou um seu derivado ou a partir de um promotor totalmente heterólogo. Alguns promotores bem conhecidos e muito utilizados para expressão em células eucarióticas compreendem promotores derivados de

vírus, tais como adenovírus, *e.g.* o promotor E1A, promotores derivados de citomegalovírus (CMV), tais como o promotor precoce imediato (IE) de CMV, promotores derivados de Vírus Símio 40 (SV40), e semelhantes. Os promotores adequados podem também ser derivados de células eucarióticas, tais como promotores de metalotioneína (MT), promotor do fator do alongamento 1 α (EF-1 α), promotor da actina, um promotor da imunoglobulina, promotores de choque térmico, e semelhantes. Qualquer promotor ou estimulador/promotor capaz de conduzir a expressão da sequência de interesse na célula hospedeira é adequado na invenção. Em uma forma de realização a sequência capaz de conduzir a expressão compreende uma região de a um Promotor de CMV, preferencialmente a região compreendendo os nucleótidos-735 a +95 do estimulador/promotor do gene precoce imediato de CMV. O especialista na técnica compreenderá que a expressão das sequências utilizadas na invenção pode adequadamente ser combinada com elementos que podem estabilizar ou estimular a expressão, tais como insuladores, regiões de ligação a matriz, elementos STAR (WO 03/004704), e semelhantes. Isto pode estimular a estabilidade e/ou níveis de expressão. A produção de proteína em células hospedeiras recombinantes foi extensivamente descrito, *e.g.* em Current Protocols in Protein Science, 1995, Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, ISBN 0- 471-11184- 8; Bendig, 1988. A cultura de uma célula é efetuada para permitir-lhe metabolizar, e/ou crescer e/ou dividir e/ou produzir proteínas recombinantes de interesse de interesse. Isto pode ser conseguido por métodos bem conhe-

cidos das pessoas especialistas na técnica, e inclui mas não se limita a proporcionar nutrientes para a célula. Os métodos compreendem o crescimento aderente a superfícies, crescimento em suspensão, ou suas combinações. Várias condições de cultura podem ser otimizadas por métodos bem conhecidos na técnica para otimizar os rendimentos de produção de proteína. A cultura pode ser efetuada, por exemplo, em placas, frascos rolantes ou em biorreactores, utilizando sistemas descontínuos, descontínuos com alimentação, contínuos, fibra oca, e semelhantes. De modo a conseguir a produção em larga escala (contínua) de proteínas recombinantes de interesse através da cultura de células, é preferido na técnica ter células capazes de crescimento em suspensão, e é preferido ter células capazes de serem cultivadas na ausência de soro derivado de animal ou humano ou componentes do soro animal ou humano. Esta purificação é mais fácil e a segurança é melhorada devido à ausência de proteínas animais ou humanas derivadas do meio de cultura, embora o sistema seja também muito fiável, com meio sintético são melhores na reprodutibilidade,. "Células hospedeiras", de acordo com a invenção podem ser qualquer célula hospedeira capaz de expressar moléculas de DNA recombinante, incluindo bactérias tais como *Escherichia* (e.g. *E. coli*), *Enterobacter*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, leveduras tais como *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris*, *Candida*, ou *Yarrowia*, fungos filamentosos tais como *Neurospora*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger*, células de inseto tais como células de *Spodoptera frugiperda* SF-9 ou SF-21, células de mamífero

tais como de células de ovário de hamster Chinês (CHO), células BHK, células de murganho incluindo células SP2/0 e células de mieloma NS-0, células de primata tais como células COS e Vero, Células MDCK, células BRL 3A, hibridomas, células de tumor, células primárias imortalizadas, células humanas tais como células W138, HepG2, HeLa, HEK293, HT1080 ou embrionárias da retina tais como PER.C6™, e semelhantes. Frequentemente, o sistema de expressão de escolha envolve um vetor de expressão de célula de mamífero e hospedeiro de modo que os anticorpos são apropriadamente glicosilada. Uma linha de células humanas, preferencialmente PER.C6™, pode vantajosamente ser utilizada para obter anticorpos com um padrão de glicosilação completamente humano. As condições para o crescimento ou multiplicação das células (ver *e.g.* Tissue Culture Academic Press, Kruse e Paterson, editores (1973)) e as condições para a expressão do produto recombinante podem diferir de alguma forma, e a otimização do processo é normalmente realizada para aumentar os rendimentos do produto e/ou crescimento das células no que respeita a cada uma, de acordo com os métodos geralmente conhecidos da pessoa especialista na técnica. Em geral, os princípios, protocolos, e técnicas práticas para maximizar a produtividade das culturas de células de mamífero pode ser encontrada in *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach* (M. Butler, ed., IRL Press, 1991). A expressão de anticorpos em células hospedeiras recombinantes foi extensivamente descrita na técnica (ver *e.g.* EP0120694; EP0314161; EP0481790; EP0523949; patente US 4816567; WO 00/63403). As moléculas de ácido nucleico que codificam as

cadeias leves e pesadas podem estar presentes como cópias extracromossómicas e/ou estavelmente integradas no cromossoma da célula hospedeira. No que respeita a estabilidade de produção, é preferido o último.

Os anticorpos são expressos nas células de acordo com a invenção, e podem ser recuperados de células ou preferencialmente a partir do meio de cultura de células, por métodos geralmente conhecidos das pessoas especialistas na técnica. Estes métodos podem incluir precipitação, centrifugação, filtração, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de afinidade, cromatografia de troca catiónica e/ou aniónica, cromatografia de interação hidrofóbica, e semelhantes. Para uma mistura de anticorpos compreendendo moléculas IgG, proteína A ou proteína G a cromatografia de afinidade podem ser de forma adequada utilizadas (ver *e.g.* patentes US 4 801 687 e 5 151 504).

Numa forma de realização, pelo menos dois anticorpos da mistura produzida de acordo com a invenção compreendem uma dímero de cadeia pesada-leve possuindo diferentes especificidades e/ou afinidades. A especificidade determina qual o seu antigénio ou epitopo está ligado pelo anticorpo. A afinidade é uma medida para a força de ligação a um antigénio ou epitopo particular. A ligação específica é definida como a ligação com uma afinidade (K_a) de pelo menos 5×10^4 litro/mole, mais preferencialmente 5×10^5 , mais preferencialmente mais do que 5×10^6 , ainda mais preferencialmente 5×10^7 , ou mais. Tipicamente, os anti-

corpos monoclonais podem ter afinidades que vão até 10^{10} litros por mole, ou ainda maiores. A mistura de anticorpos produzida de acordo com a presente invenção pode conter pelo menos dois anticorpos que se ligam a diferentes epitopos na mesma molécula de antígeno e/ou pode conter pelo menos dois anticorpos que se ligam a diferentes moléculas de antígeno presentes em uma mistura compreendendo o antígeno. Esta mistura compreendendo o antígeno pode ser uma mistura de antígenos parcialmente ou totalmente purificados tais como toxinas, componentes de membrana e proteínas, as proteínas do envelope viral, ou pode ser uma célula saudável, uma célula doente, uma mistura de células, um tecido ou mistura de tecidos, um tumor, um órgão, um indivíduo completo humano ou animal, um fungo ou levedura, uma bactéria ou cultura bacteriana, um vírus ou stock de vírus, combinações destas, e semelhantes. Ao contrário dos anticorpos monoclonais que são capazes de ligar um apenas um único antígeno ou epitopo, a mistura de anticorpos de acordo com a presente invenção pode deste modo ter muitas das vantagens de uma mistura de anticorpo policlonal ou oligoclonal.

Numa forma de realização preferida, a célula hospedeira de acordo com o método da invenção é capaz de um elevado nível de expressão da imunoglobulina humana, *i.e.* pelo menos 1 pg/célula/dia, preferencialmente pelo menos 10 pg/célula/dia e ainda mais preferencialmente pelo menos 20 pg/célula/dia ou mais sem a necessidade de amplificação das moléculas de ácido nucleico que codificam as cadeias

pesadas e leves na referida célula hospedeira. Preferencialmente, as células hospedeiras de acordo com a invenção contêm no seu genoma entre 1 e 10 cópias de cada ácido nucleico recombinante a ser expresso. Na técnica, a amplificação do número de cópias das sequências de ácido nucleico que codificam a proteína de interesse em *e.g.* células CHO podem ser utilizadas para aumentar os níveis de expressão da proteína recombinante pelas células (ver *e.g.* Bendig, 1988; Cockett *et al.*, 1990; patente US 4 399 216). Isto é normalmente um método amplamente utilizado. No entanto, um significativo esforço demorado é necessário antes de um clone com um desejado elevado número de cópias e níveis de expressão elevados foram estabelecidos, e além disso os clones que comportam um número de cópias muito elevado (até às centenas) da cassette de expressão são frequentemente instáveis (*e.g.* Kim *et al.*, 1998). É, deste modo, uma forma de realização preferida da presente invenção para utilizar células hospedeiras que não necessitam destas estratégias de amplificação para um elevado nível expressão dos anticorpos de interesse. Isto permite a produção rápida de clones estáveis de células hospedeiras que expressam a mistura de anticorpos de acordo com a invenção de uma forma consistente. Proporciona-se evidência de que as células hospedeiras de acordo com a invenção podem ser obtidas, subclonadas e depois propagadas durante pelo menos cerca de 30 divisões de células (duplicação da população) enquanto expressa a mistura de anticorpos de acordo com a invenção de uma maneira estável, na ausência de pressão de seleção. Deste modo, em certos

aspectos os métodos da invenção incluem a cultura das células durante pelo menos 20, preferencialmente 25, mais preferencialmente 30 duplicações da população, e em outros aspectos as células hospedeiras de acordo com a invenção sofreram pelo menos 20, preferencialmente 25, mais preferencialmente 30 duplicações da população e são ainda capazes de expressar uma mistura de anticorpos de acordo com a invenção.

Preferencialmente, as células hospedeiras de acordo com o método da invenção são derivadas de células da retina humana que foram imortalizadas ou transformadas com sequências adenovirais E1. Uma célula hospedeira particularmente preferida de acordo com os métodos da presente invenção é PER.C6™ conforme depositada sob o n° ECACC 96022940, ou um seu derivado. Os clones derivados de PER.C6 podem ser produzidos rapidamente, contêm normalmente um número limitado de cópias (cerca 1-10) do transgene, e são capazes de expressão de elevado nível de anticorpos recombinantes (Jones *et al*, 2003). Deste modo, espera-se que estes clones mantenham um número de cópias estável muitas gerações, que é uma vantagem na produção de biofármacos. As células PER.C6™ foram extensivamente caracterizadas e documentadas, demonstrando um bom processo de escalonamento, suspensão, crescimento e independência do fator de crescimento. Além disso, as PER.C6™ podem ser incorporadas numa suspensão de uma maneira altamente reprodutível, tornando-as particularmente adequado para produção em larga-escala. A este respeito, a linha celular

PER.C6™ foi caracterizada para crescimento em biorreactor, em que pode crescer a densidades muito elevadas. A utilização de PER.C6™ para a produção recombinante de anticorpos foi descrita em detalhe na publicação WO 00/63403 e em (Jones *et al.*, 2003).

É outro aspeto da invenção para proporcionar uma mistura de anticorpos compreendendo uma cadeia leve comum e duas cadeias pesadas diferentes com uma região variável diferente, em que as duas cadeias pesadas diferentes são capazes de emparelhar com a referida cadeia leve comum, e em que as referidas cadeias pesadas diferem ainda nas suas regiões constantes de modo suficientemente de modo que a quantidade de anticorpos biespecíficos é diminuída em comparação com a percentagem teórica de anticorpos biespecíficos.

É outro aspeto da presente invenção a utilização de uma mistura de anticorpos que é obtenível através de um método de acordo com a invenção. Espera-se que estas misturas de anticorpos sejam mais eficazes do que os componentes isolados que compreende, em analogia com os anticorpos policlonais que são normalmente mais eficazes do que os anticorpos monoclonais para o mesmo alvo. Estas misturas podem ser preparadas contra uma variedade de antigénios ou epitopos alvo.

É outro aspeto da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica compreendendo uma mistura

recombinantemente produzida de anticorpos de acordo com a invenção, em que duas diferentes sequências de cadeia pesada estão representadas na mistura de anticorpos recombinantes. Os anticorpos monoclonais são rotineiramente produzidos por métodos recombinantes. A presente invenção revela misturas de anticorpos úteis para o diagnóstico ou tratamento em vários campos. As composições de acordo com a invenção compreendem misturas de duas cadeias pesadas diferentes emparelhadas com cadeias leves na forma de anticorpos. Preferencialmente, as cadeias leves dos anticorpos nas referidas misturas possuem uma cadeia leve comum. As misturas podem compreender anticorpos biespecíficos. As misturas podem ser produzidas a partir de um clone que foi derivado de uma única célula hospedeira, i.e. a partir de uma população de células contendo as mesmas sequências de ácido nucleico recombinantes. As misturas podem ser obtidas por métodos de acordo com a invenção, ou ser produzidas por células hospedeiras de acordo com a invenção. A mistura for ótima para certos propósitos pode ser determinada, empiricamente, através de métodos conhecidos pela pessoa especialista na técnica, ou através de métodos proporcionados pela presente invenção. Estas composições de acordo com a invenção podem ter várias das vantagens de uma mistura de anticorpos policlonais, sem as desvantagens normalmente inerentemente associadas com misturas de anticorpos policlonais, devido à forma como são produzidas. É além disso esperado que a mistura de anticorpos seja mais eficaz do que os anticorpos monoclonais separados. Deste modo, e deste modo,

a capacidade de produção necessária, pode ser menor para as misturas de anticorpos de acordo com a invenção do que para anticorpos monoclonais.

Foi descrito, por exemplo, que embora nenhum anticorpo monoclonal único para a neurotoxina de botulinum (BoNT/A) neutralizasse significativamente a toxina, uma combinação destes três anticorpos monoclonais (anticorpo oligoclonal) neutralizou em 50% 450 000 doses letais de BoNT/A, uma potência 90 vezes maior do que a da globulina hiperimunitária humana (Nowakowski *et al*, 2002). Este resultado demonstra que as misturas de anticorpos oligoclonais compreendendo apenas 2 a 3 diferentes especificidades podem ter uma potência muito elevada.

Além disso, as hipóteses de uma mistura da invenção perder a sua atividade devido a perda do alvo ou epitopo é reduzida, em comparação com o anticorpo monoclonal única. Em particular, as formas de realização 2, ou 3, dos anticorpos presentes numa mistura de acordo com a invenção possuem diferentes especificidades. As referidas diferentes especificidades podem ser dirigidas para diferentes epitopos no mesmo antígeno e/ou podem ser dirigidas para diferentes antígenos presentes numa mistura compreendendo o antígeno. Uma composição de acordo com a invenção a seguir pode também compreender 2, ou 3 anticorpos possuindo diferentes afinidades para o mesmo epitopo. Anticorpos com diferentes afinidades para o mesmo epitopo podem, por exemplo, ser produzidas por métodos de

maturação de afinidade, conhecidos da pessoa especialista na técnica. Numa forma de realização particularmente preferida, a composição de acordo com a invenção tem um efeito que é maior do que o efeito de cada anticorpo monoespecífico individual presente na referida composição. O referido efeito pode ser medido num ensaio funcional. Um "ensaio funcional" de acordo com a presente invenção é um ensaio que pode ser utilizado para determinar um ou mais parâmetros desejados do anticorpo ou a mistura de anticorpos sujeita às condições ensaio. Ensaio funcionais adequados podem ser ensaios de ligação, ensaios de apoptose, ensaios citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), ensaios de citotoxicidade dependente do complemento(CDC), ensaios de inibição do crescimento ou proliferação celular (efeito citostático), ensaios de morte celular (efeito citotóxico), ensaios de sinalização de células, ensaios para medir a inibição da ligação de patogénicos à célula alvo, ensaios para medir a secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou outras moléculas segregadas, ensaios para bacteriostase, atividade bacteriana, neutralização de vírus, ensaios para medir a atração de componentes do sistema imunitário para o sítio em que os anticorpos estão ligados, incluindo métodos de hibridação *in situ*, métodos de marcação, e semelhantes. Claramente, também ensaios *in vivo* tais como modelos animais, incluindo modelos de tumor em murganho, modelos de doença autoimune, modelos de roedores ou primatas infetados com vírus ou infetados com bactérias, e semelhantes, podem ser utilizados para este propósito. A eficácia de uma

mistura de anticorpos de acordo com a invenção pode ser comparada com anticorpos individuais nestes modelos por métodos geralmente conhecidos da pessoa especialista na técnica.

É outro aspeto da presente invenção proporcionar um método para identificar pelo menos um clone de célula hospedeira que produz uma mistura de anticorpos, em que a referida mistura de anticorpos tem um efeito desejado de acordo com um ensaio funcional, compreendendo o método os passos de: (i) proporcionar uma célula hospedeira compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos um cadeia leve e uma sequência de ácido nucleico ou sequências que codificam duas cadeias pesadas diferentes, em que as referidas cadeias pesadas e leves são capazes de emparelhar uma com a outra; (ii) cultura de pelo menos um clone da referida célula hospedeira em condições condutoras à expressão das referidas sequências de ácido nucleico; (iii) pesquisa do referido pelo menos um clone da célula hospedeira para produção de uma mistura de anticorpos possuindo o efeito desejado através de um ensaio funcional; e (iv) identificação de pelo menos um clone que produz uma mistura de anticorpos possuindo o efeito desejado. Preferencialmente, a referida célula hospedeira compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve comum que é capaz de emparelhar com as referidas duas cadeias pesadas diferentes, de modo a que os anticorpos produzidos compreendem cadeias leves comuns, como descrito acima. Em formas de realização específicas a

referida cultura no passo (ii) e a referida pesquisa no passo (iii) do método é realizada com pelo menos dois clones. O método pode opcionalmente incluir um ensaio para medir os níveis de expressão dos anticorpos que são produzidos, cujo ensaio pode ocorrer durante ou após o passo (ii) de acordo com o método, ou mais tarde no procedimento. Estes ensaios são bem conhecidos da pessoa especialista na técnica, e incluem ensaios de concentração de proteína, ensaios específicos de imunoglobulina tais como ELISA, RIA, DELFIA, e semelhantes. Os ensaios funcionais para o método de acordo com a invenção podem ser ensaios para apoptose, ADCC, CDC, morte celular, inibição da proliferação, neutralização do vírus, opsonização bacteriana, sinalização mediada por recetor, sinalização celular, atividade bacteriana, e semelhantes. Os ensaios de pesquisa úteis para anticorpos anticâncer têm, por exemplo, sido descritos na patente US 6180357. Estes ensaios podem também ser utilizados para identificar um clone de acordo com o método da presente invenção. É por exemplo possível a utilização de ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISAs) para o teste de ligação do anticorpo ligação ao seu alvo. Utilizando estes ensaios, é possível pesquisar misturas de anticorpos que mais avidamente se liguem ao antígeno alvo (ou mistura de antígenos alvo contra a qual a mistura de anticorpos vai ser testada). Outra possibilidade que pode ser explorada é pesquisar diretamente citotoxicidade ou efeitos citostáticos. É possível que depois destas diferentes pesquisas, outros ou os mesmos clones que produziram misturas de anticorpos

serão selecionados com a ELISA acima mencionada. A pesquisa de morte celular ou cessação de crescimento de células cancerosas pode ser de forma adequada utilizada de acordo com a invenção. A morte celular pode ser medida em vários pontos finais, incluindo a ausência de metabolismo ou a desnaturação de enzimas. Em uma forma de realização possível da presente invenção, o ensaio é conduzido focando-se na atividade citotóxica para as células cancerosas como um ponto final. Para este ensaio, um kit de ensaio vivo/morto, por exemplo o LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Assay Kit (L-3224) de Molecular Probes, pode, de forma adequada, ser utilizado. Outros métodos de avaliação da viabilidade celular, tal como exclusão de azul tripano, libertação de ^{51}Cr , Calcein-AM, Alamar Blue™, atividade de LDH, e métodos semelhantes podem também ser utilizados. Os ensaios podem também incluir a pesquisa da mistura de anticorpos para especificidade para o desejado tecido compreendendo antigénio. Os anticorpos de acordo com a invenção podem ter uma limitada distribuição no tecido. É possível incluir o teste de misturas de anticorpos contra uma variedade de células, tipos de células, ou tecidos, para pesquisar misturas de anticorpos que preferencialmente se ligam a células, tipos de célula ou tecidos de interesse. Independentemente de um ensaio funcional como descrito acima, a presente invenção também descreve formas de determinar a identidade dos anticorpos expressos por um clone, utilizando métodos tais como focagem isoeléctrica (IEF), espectrometria de massa (MS), e semelhantes. É deste modo um aspeto da invenção para

proporcionar a utilização de MS e/ou IEF na seleção de um clone que expressa uma mistura de anticorpos de acordo com a invenção. Quando os anticorpos monoclonais são produzidos por células hospedeiras recombinantes, é normalmente realizada um passo de pesquisa para avaliar os níveis de expressão dos clones individuais que foram produzidos. A adição de mais cadeias pesadas para produzir misturas adiciona um nível de complexidade à produção de anticorpos. Quando as células hospedeiras são transfetadas com moléculas de ácido nucleico que codificam as cadeias leves e pesadas que formarão a mistura de anticorpos desejada, os clones independentes podem aparecer contendo a mesma informação genética, mas no entanto diferenciar em níveis de expressão, produzindo deste modo diferentes proporções dos anticorpos codificados, dando origem a diferentes misturas de anticorpos do mesmo repertório genético. O método de acordo com a invenção é útil para identificar um clone que produz uma mistura ótima para um determinado propósito.

A cultura e/ou pesquisa de acordo com os passos (ii) e (iii) respetivamente, podem ser de forma adequada efetuadas utilizando processos de elevado rendimento, opcionalmente numa forma automatizada. Os clones podem *e.g.* ser cultivados em placas de 96 poços ou outras multipoço, *e.g.* num formato de matriz, e pesquisados quanto a produção de uma mistura desejada. A robótica pode ser, de forma adequada, empregue para este propósito. Os métodos para implementar a cultura de elevado processamento e os ensaios

estão geralmente disponíveis e conhecidos da pessoa especialista na técnica. Será claro que também para este método de acordo com a invenção, é benéfica a utilização de células hospedeiras capazes de um elevado nível de expressão de proteínas, sem a necessidade de amplificação do ácido nucleico que codifica as referidas proteínas na referida célula. Numa forma de realização, a referida célula hospedeira é derivada de uma célula humana embrionária de retinoblastos, que foi imortalizada ou transformada por sequências adenovirais E1. Numa forma de realização preferida, a referida célula é derivada de PER.C6™. Esta linha celular já mostrou ser capaz de manipulações de levado processamento, incluindo a cultura (WO 99/64582).

Em formas de realização específicas da presente invenção, a referida mistura de anticorpos de acordo com o método de identificação de pelo menos um célula hospedeira de acordo com a invenção, compreende pelo menos 2, ou 3 anticorpos possuindo diferentes especificidades e/ou afinidades.

Uma potencial vantagem do método será que permitirá explorar muitas combinações possíveis simultaneamente, incluindo as combinações inerentemente a presença de anticorpos biespecíficos na mistura produzida. Deste modo, podem ser testadas mais combinações do que apenas por mistura dos anticorpos monoclonais conhecidos purificados, ambos em várias combinações e em proporções de presença de anticorpos diferentes nestas combinações.

O clone que foi identificado pelo método de acordo com a invenção, pode ser utilizado para produzir uma mistura de anticorpos desejada. É deste modo outro aspeto da presente invenção para proporcionar um método de produção de uma mistura de anticorpos, compreendendo o método o passo de: cultura de um clone de célula hospedeira identificada pelo método de identificação, pelo menos um clone de célula hospedeira que produz uma mistura de anticorpos de acordo com a invenção, estando a referida cultura em condições que conduzem à expressão das moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve e as duas cadeias pesadas diferentes. Os anticorpos produzidos podem ser recuperados de células hospedeiras e/ou a partir da cultura de célula hospedeira, *e.g.* do meio de cultura. A mistura de anticorpos pode ser recuperada de acordo com uma variedade de técnicas conhecidas da pessoa especialista na técnica. A mistura de anticorpos que é obténível pelo método de acordo com a invenção, descrito acima pode ser utilizada para vários propósitos, tais como no tratamento ou diagnóstico de doença, e pode substituir, ou ser utilizada adicionalmente a, anticorpos monoclonais ou policlonais.

Os métodos de acordo com a presente invenção podem de forma adequada utilizar moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos, moléculas de ácido nucleico que foram obtidas por qualquer método adequado, incluindo *in vivo*, *e.g.* métodos de imunização ou *in vitro*,

e.g. métodos de exposição de anticorpos (A. Plückthun *et al*, *In vitro* selection and evolution of proteins. In: Adv. Prot. Chem., F.M. Richards *et al*, Eds, Academic Press, San Diego, 2001, vol 55: 367-403), tais como exposição em fagos, exposição de ribossoma ou exposição de mRNA (C. Schaffitzel *et al*, *In vitro* selection and evolution of protein-ligand interactions by ribosome display. In: Protein-Protein Interactions. A Molecular Cloning Manual, E. Golemis, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, pp 535-567), e exposição em levedura (e.g. WO 99/36569). Os métodos de identificação de anticorpos para um certo alvo, alvo esse que pode ser um antígeno conhecido ou um antígeno desconhecido presente numa mistura antigénica, por exposição em fagos, são conhecidos da pessoa especialista na técnica. Em geral, uma biblioteca de fagos que expressa um domínio de ligação ao antígeno ou um seu derivado na sua superfície, sendo o referido domínio de ligação ao antígeno codificado pelo material genético presente nos referidos fagos, é incubada com o antígeno ou mistura de antígenos de interesse, após a qual é obtida a ligação de uma subpopulação dos fagos que apresentam sítios de ligação ao antígeno que se ligam ao antígeno desejado enquanto os fagos não ligados são eliminados. Estes passos de seleção podem ser repetidos uma vez, duas, ou mais vezes para obter uma população de fagos que são mais ou menos específicas para o antígeno de interesse. Os métodos de apresentação em fagos para obter anticorpos, suas partes ou derivados foram extensivamente descritas em e.g. (CF Barbas III *et al*, Phage Display. A laboratory manual. Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001). A biblioteca utilizada para esta pesquisa pode ser produzida utilizando a informação genética de uma ou mais cadeias leves, combinadas com a informação genética que codifica uma pluralidade de cadeias pesadas. A biblioteca descrita por De Kruif *et al.* (1995b) compreende 7 cadeias leves. Deste modo, num painel de ligação de fagos a um alvo, que pode *e.g.* ser obtido por métodos descritos em De Kruif *et al* (*supra*); a patente US 6 265150; não mais do que 7 diferentes cadeias leves estarão representadas, e se o painel é suficientemente grande, podem ser encontrados vários fagos com a mesma cadeia leve acoplada a cadeias pesadas não relacionadas. Estes fagos podem ser utilizados para obter as moléculas de ácido nucleico úteis nos métodos de acordo com a presente invenção.

É outro aspeto da presente invenção para proporcionar um método de pesquisa para uma mistura de anticorpos que é capaz de ligação a um alvo, compreendendo o método os passos de:

i) colocar uma biblioteca de exposição de anticorpos compreendendo anticorpos em contacto com material compreendendo um alvo;

ii) pelo menos um passo de seleção de anticorpos de ligação ao referido alvo;

iii) identificação pelo menos dois anticorpos

ligação ao referido alvo, em que os referidos pelo menos dois anticorpos compreende uma cadeia leve comum;

iv) introdução de uma sequência de ácido nucleico que codifica a cadeia leve comum e uma sequência de ácido nucleico ou sequências de ácido nucleico que codificam duas cadeias pesadas dos referidos pelo menos dois anticorpos numa célula hospedeira;

v) cultura de um clone da referida célula hospedeira em condições que conduzem à expressão das referidas sequências de ácido nucleico;

vi) pesquisa do referido clone da referida célula hospedeira para a produção de uma mistura de anticorpos possuindo um efeito desejado por um ensaio funcional; e

(vii) identificação de pelo menos um clone que produz uma mistura de anticorpos possuindo o efeito desejado. A biblioteca de exposição de anticorpos pode ser uma biblioteca de exposição em fagos, uma biblioteca de exposição de ribossoma, uma biblioteca de exposição de mRNA, ou uma biblioteca de exposição à levedura. Passo i) e ii) pode opcionalmente ser repetido uma ou mais vezes. As sequências de ácido nucleico que codificam os anticorpos obtidos por métodos de exposição em fagos, exposição em ribossoma ou exposição em leveduras podem ser convertidas para codificar qualquer formato de anticorpo desejado tais como IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgM, IgD, IgE, antes de

as introduzir numa célula hospedeira, utilizando métodos de clonagem molecular convencionais e meios conhecidos da pessoa especialistas da técnica (*e.g.* descrito em Boel *et al*, 2000). Deve estar claro para a pessoa especialista que as bibliotecas em que apenas uma cadeia leve está representada são especialmente úteis à luz da presente invenção, uma vez que todos os anticorpos que podem ser obtidos a partir de uma tal biblioteca, terá uma cadeia leve comum que é funcional na ligação ao antigénio alvo com cada uma das cadeias pesadas. Por outras palavras, de acordo com os métodos da invenção a formação de não funcional dímeros e cadeia leve-cadeia pesada é evitada. As bibliotecas de exposição de anticorpos em fagos possuindo extensos repertórios de cadeia H e sequências únicas ou muito poucas de cadeias L foram reveladas na técnica (Nissim *et al*, 1994; Vaughan *et al*, 1996). Em geral, a especificidade de um anticorpo parece ser determinada em grande extensão pela sua cadeia pesada. É ainda possível pesquisar e identificar cadeias leves que não contribuem significativamente para a ligação do anticorpo, cadeias leves que também podem ser, de forma adequada, utilizadas de acordo com a invenção. Pode também ser possível seguir as revelações da presente invenção, mas utilizando uma cadeia pesada e várias cadeias leves. No entanto, a utilização de uma cadeia leve comum e cadeias pesadas diferentes parece preferível, e as observações que se seguem apoiam a ideia que a especificidade de um anticorpo parece ser dominada pela sua sequência de cadeia pesada. No processo de edição do recetor, um mecanismo de células B para monitorizar se o seu recetor de imunoglobulina

codifica um autoanticorpo potencialmente prejudicial, as células B que expressam um autoanticorpo substituem a cadeia pesada expressa com outra cadeia pesada enquanto retém a cadeia leve expressa. Deste modo, é produzida uma nova especificidade de anticorpo que não codifica um autoanticorpo. Isto mostra que a cadeia leve simples pode dimerizar com sucesso com múltiplas cadeias pesadas para formar diferentes especificidades de anticorpo (Nemazee, 2000; Casellas *et al*, 2001). Séries de linhas celulares transfetadas utilizando um único gene de cadeia pesada com diferentes genes de cadeia leve foram reportadas, mantendo os anticorpos produzidos em larga escala a sua especificidade, apesar da cadeia leve (Radic *et al*, 1991). Os diferentes anticorpos foram obtidos a partir de uma biblioteca que foi construída utilizando uma cadeia leve simples (Nissim *et al*, 1994). Obtiveram-se vários anticorpos da biblioteca descrita por De Kruif *et al* (1995), que foi construída utilizando 7 cadeias leves, que tinham a mesma cadeia leve mas diferentes especificidades (ver *e.g.* exemplo 1: anticorpos de ligação a EpCAM e a CD46, descritos na WO 01/48485 e WO 02/18948, respetivamente). Para além da pesquisa de uma biblioteca de fagos contra um alvo, será também possível começar com um anticorpo que já provou os seus méritos, e utilizar a cadeia leve deste anticorpo na preparação de uma biblioteca de cadeias pesadas combinada apenas com esta cadeia leve particular, de acordo com métodos conhecidos da pessoa especialista na técnica, tais como exposição em fagos. Utilizando esta estratégia, um anticorpo monoclonal pode ser utilizado para obter uma mistura de anticorpos de

acordo com a invenção, funcionalmente semelhante a um anticorpo policlonal ou oligoclonal para o mesmo alvo. Alternativamente, pode ser utilizado um método reminiscente do método descrito por Jespers *et al* (1994) para obter um anticorpo humano com base num anticorpo funcional de roedor. A cadeia pesada de um anticorpo conhecido de origem não humana é primeiro clonada e emparelhada como uma cadeia molde com um repertório de cadeias leves humanas para utilização na exposição em fagos, após as quais os fagos são selecionados para ligação ao antígeno ou mistura de antígenos. A cadeia leve selecionada é por sua vez emparelhada com um repertório de cadeias pesadas humanas expostas num fago, e os fagos são selecionados de novo para encontrar várias cadeias pesadas que quando emparelhadas com a cadeia leve são capazes de se ligar ao antígeno ou mistura de antígenos de interesse. Isto permite criar uma mistura de anticorpos humanos contra um alvo para o qual, até agora, apenas um anticorpo monoclonal não humano é descrito. É possível que uma mistura de acordo com a presente invenção tenha já efeitos funcionais benéficos quando os anticorpos individuais não possuem afinidades elevadas para o alvo, enquanto elevadas afinidades são frequentemente necessárias para que os anticorpos monoclonais sejam eficazes. Isto pode ter a vantagem de que a maturação da afinidade pode ser necessária menos vezes nos métodos e misturas de acordo com a presente invenção do que quando uma abordagem com anticorpos monoclonais é pretendida.

As sequências que codificam a cadeia pesada e

leve podem ser introduzidas simultaneamente ou consecutivamente na célula hospedeira. É também um aspeto da invenção preparar uma célula hospedeira compreendendo um ácido nucleico recombinante que codifica uma cadeia leve de um anticorpo. Esta célula pode, por exemplo, ser obtida por transfeção do referido ácido nucleico, e opcionalmente pode ser identificado um clone que possui uma elevada expressão da cadeia leve. Um clone estabelecido pode então ser utilizado para adicionar informação genética que codifica 2, cadeias pesadas da invenção por introdução das moléculas de ácido nucleico que as codificam em células do clone que já contém a cadeia leve. As moléculas de ácido nucleico que codificam as cadeias pesadas podem ser introduzidas na referida célula hospedeira concomitantemente. É obviamente também possível introduzi-los consecutivamente, *e.g.* utilizando diferentes marcadores de seleção, que pode ser vantajoso se nem todas as cadeias pesadas puderem ser introduzidas simultaneamente porque as células não incorporam cópias suficientes das moléculas de ácido nucleico recombinante. Os métodos para introduzir moléculas de ácido nucleico recombinante em células hospedeiras são bem conhecido da pessoa especialista na técnica, e incluem transfeção, electroporação, precipitação com fosfato de cálcio, infeção por vírus, e semelhantes. A pessoa especialista tem várias possibilidades para introduzir mais vetores com sequências de ácido nucleico de interesse na mesma célula hospedeira, ver *e.g.* Sambrook, Fritsch e Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a edição, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*,

Ausubel FM, *et al*, eds, 1987; a série *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.). A seleção de marcadores adequados dominantes para a introdução de ácidos nucleicos nas células hospedeiras eucarióticas de acordo com a invenção podem ser o G418 ou neomicina (geneticina), higromicina ou ácido micofenólico, puromicina, e semelhantes, para os quais estão disponíveis em vetores expressão os genes que codificam as resistências. Outras possibilidades incluem, por exemplo, a utilização de vetores contendo os genes DHFR ou sintetase de glutamato para selecionar, na presença de metotrexato numa célula DHFR- ou a ausência de glutamina num auxotrófico para a glutamina, respetivamente. A utilização de vetores de expressão com diferentes marcadores de seleção permite as subseqüentes transfeções com seqüências de cadeia pesada de interesse na célula hospedeira, que contém já de forma estável outras cadeias pesadas introduzidas previamente por utilização de outros marcadores de seleção. É também possível utilizar marcadores de seleção que podem ser utilizados mais do que uma vez, *e.g.* quando contém mutações, intrões, ou promotores enfraquecidos que os tornam dependentes da concentração (*e.g.* EP0724639; WO01/32901; patente US 5 733 779). Alternativamente, um marcador de seleção podem ser reutilizado pela sua deleção da célula hospedeira após utilização, *e.g.* por recombinação específica no sítio. Um marcador selecionável localizado entre as seqüências reconhecidas por uma recombinase específica para um sítio, *e.g.* sítios *lox* ou sítios FRT, são utilizados para a produção do primeiro transfetante estável (ver recombinação

específica para o sítio Cre-lox em Wilson e Kola, 2001). Subsequentemente, o marcador selecionável é excisado do DNA da célula hospedeira pela coincidência do sítio específico da recombinase, e.g. Cre ou Flp. Uma subsequente transfeção pode, de forma adequada, utilizar o mesmo marcador de seleção. Podem ser preparados diferentes clones da célula hospedeira compreendendo cada um a informação genética que codifica uma diferente cadeia leve. Se os anticorpos são identificados através de um método de exposição de anticorpo, é deste modo possível preparar várias células hospedeiras, compreendendo cada uma cadeia leve presente na biblioteca de exposição de anticorpos. Após identificação dos anticorpos que se ligam a um alvo utilizando exposição de anticorpo, as moléculas de ácido nucleico que codificam as cadeias pesadas podem ser introduzidas na célula hospedeira contendo a cadeia leve comum que é capaz de emparelhar com as cadeias pesadas. Ainda em outro aspeto de acordo com a invenção, é proporcionado um método para produzir uma célula hospedeira recombinante para a produção de uma mistura de anticorpos, compreendendo o método o passo de: introdução de sequências de ácido nucleico que codificam 2 cadeias pesadas diferentes numa célula hospedeira recombinante compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve comum capaz de emparelhar com as duas cadeias pesadas, resultando apenas em regiões de ligação funcionais.

No caso parecerá que a célula hospedeira recombinante de acordo com a invenção não expressa cadeia

leve suficiente para dimerizar com todas as duas cadeias pesadas expressas, extra cópias das moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve podem ser transfetadas na célula.

Para além da integração aleatória após transfeção, os métodos para integrar os transgenes em posições pré-determinadas do genoma resultando em níveis de expressão favoráveis, podem também ser utilizados de acordo com a invenção. Estes métodos podem, por exemplo, empregar integração específica para o sítio por recombinação homóloga (ver e.g. WO 98/41645), ou utilizar recombinases específicas para o sítio (Gorman e Bullock, 2000).

É ainda outro aspeto da presente invenção proporcionar um animal transgénico não humano ou uma planta transgénica compreendendo a uma sequência recombinante de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve comum e uma sequência ou sequências de ácido nucleico recombinante que codificam pelo menos duas cadeias pesadas diferentes que são capazes de emparelhar com a referida cadeia leve comum, em que as referidas sequências de ácido nucleico recombinantes que codificam as referidas cadeias leves e pesadas estão sob o controlo de um promotor específico para o tecido. Os promotores em plantas podem também ser não específicas para o tecido, e os elementos gerais da expressão do gene, tais como o promotor CaMV 35S e adição do sítio poliA pela sintase de nopalina podem também ser utilizados. A referida cadeia leve é uma cadeia leve comum

de acordo com a invenção. Em formas de realização específicas, o animal ou planta transgênico de acordo com a invenção compreende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais sequências de cadeias pesadas. Para além da cultura de células como um sistema de produção para proteínas recombinantes de interesse, a técnica também revela a utilização de animais transgênicos, plantas transgênicas, e por exemplo, galinhas transgênicas para produzir proteínas nos ovos, e semelhantes para produzir proteínas recombinantes de interesse (Pollock *et al*, 1999; Larrick e Thomas, 2001; WO 91/08216). Estes normalmente compreendem o gene recombinante ou genes que codificam uma ou mais proteínas de interesse associação operacional com um promotor específico para o tecido. Tem, por exemplo, sido mostrado que os anticorpos recombinantes podem ser produzidos em níveis elevados no leite de animais transgênicos, que contém ose ácidos nucleicos que codificam uma cadeia pesada e uma leve atrás de um promotor específico para uma glândula mamária (*e.g.* Pollock *et al*, 1999; WO 95/17085). Particularmente úteis neste respeito são as vacas, ovelhas, cabras, porcos, coelhos, murganhos, e semelhantes, que podem produzir leite para obter anticorpos. Os promotores úteis são os promotores da caseína, tais como o promotor de β -caseína, um promotor de α S1-caseína, o promotor de proteína acídica do soro (WAP), um promotor da β -lactoglobulina, um promotor da α -lactalbumina, e semelhantes. A produção de proteínas biofarmacêuticas no leite dos mamíferos transgênicos foi extensivamente descrita (*e.g.* Pollock *et al*, 1999). Para

além dos promotores específicos da glândula mamária, também outros promotores específico para os tecidos podem ser utilizados, dirigindo a expressão para o sangue, urina, saliva, e semelhantes. A produção de animais transgênicos compreendendo moléculas de ácido nucleico recombinante foi extensivamente documentada, e pode incluir a microinjeção de oócitos (ver *e.g.* Wilmut e Clark, 1991), transferência nuclear após transfeção (*e.g.* Schnieke *et al*, 1997), infecção por vírus recombinante (*e.g.* patente US 6291740), e semelhantes. A transferência nuclear e os métodos de clonagem para células de mamífero são conhecidos da pessoa especialista na técnica, e são *e.g.* descritos na (Campbell *et al*, 1996; Wilmut *et al*, 1997; Dinnyes *et al*, 2002; WO 95/17500; WO 98/39416). É agora possível clonar a maioria destes animais, para produzir linhas de animais que são geneticamente idênticos, que torna possível para uma pessoa especialista da técnica criar esta linha uma vez que o animal individual que produz a mistura de anticorpos desejada foi identificado. Alternativamente, podem ser utilizados métodos clássicos de cruzamento para produzirem uma descendência transgênica. As estratégias para a produção de animais transgênicos para a produção de proteínas recombinantes de interesse no leite são descritas em Brink *et al*, 2000.

As plantas células de plantas transgênicas que produzem anticorpos foram também descritas (Hiatt *et al*, 1989; Peeters *et al*, 2001), e as plantas úteis para este propósito incluem milho grão, milho, tabaco, soja, alfalfa,

arroz, e semelhantes. Os promotores constitutivos que podem, por exemplo, ser utilizados em células de plantas são os promotores de CaMV 35S e 19S, promotores *nos* e *ocs* de *Agrobacterium*. Outros promotores úteis são promotores indutores de luz tais como *rbcS*. Os promotores específicos do tecido podem por exemplo ser específicos para a semente, tais como os promotores da zeína, napina, beta-faseolina, ubiquitina, ou específicas para tubérculos, específicas para a folha (*e.g.* útil em tabaco), específicos para a raiz, e semelhantes. É também possível transformar o organelo plastídio por recombinação homóloga, para expressar proteínas em plantas. Os métodos e meios para expressão de proteínas em plantas recombinantes ou suas partes, ou cultura de células de planta recombinante, são conhecidos das pessoas especialistas da técnica e foram por exemplo descritos em (Giddings *et al*, 2000; WO 01/64929; WO 97/42313; US patents 5888789, 6080560; Ver para diretivas práticas: Methods In Molecular Biology vol. 49 "Plant Gene Transfer and Expression Protocols", Jones H, 1995). Outros sistemas transgênicos para produção de proteínas recombinantes de interesse foi também descrito, incluindo a utilização de aves transgênicas para produzir proteínas recombinantes de interesse em ovos (*e.g.* WO 97/47739), e a utilização de peixe transgênico (*e.g.* WO 98/15627), e podem ser utilizados em combinação com as revelações da presente invenção para obter misturas de anticorpos. É também possível utilizar um sistema de transcrição /tradução *in vitro* ou sistema de tradução *in vitro* para a expressão de misturas de anticorpos de acordo com a presente invenção.

Será óbvio para a pessoa especialista que as revelações da presente invenção permitirão a produção de misturas de anticorpos em sistemas em que o ácido nucleico recombinante que codifica as cadeias leves e as cadeias pesadas pode ser introduzido e expresso. Preferencialmente estes sistemas são capazes de produzir anticorpos codificados pelas referidas sequências de ácido nucleico, sem a utilização de amplificação das referidas sequências de ácido nucleico nos referidos sistemas. Em outro aspecto da invenção, é utilizada uma célula de um animal transgênico não humano ou uma planta transgênica de acordo com a invenção. Estas células podem ser utilizadas para produzir os animais ou plantas de acordo com a invenção, utilizando técnicas conhecidas da pessoa especialista na técnica, tais como transferência nuclear ou outros conhecidos métodos de clonagem de organismos completos a partir de células únicas. As células de acordo com a invenção podem também ser obtidas pela introdução de sequências da leve e pelo menos duas cadeias pesadas em células isoladas de animais ou plantas não humano, células estas que são capazes de se tornar parte de um animal ou planta transgênica. Particularmente úteis para estes propósitos são células estaminais embrionárias. Estas podem contribuir para a linha germinal, e deste modo a informação genética introduzida nestas células pode ser passada para futuras gerações. Adicionalmente, as culturas de células de plantas de algodão, milho, tomate, soja, batata, petúnia, e tabaco podem ser utilizadas como hospedeiras, quando transformadas com as moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia

leve e as cadeias pesadas, e.g. por utilização da bactéria transformante de plantas *Agrobacterium tumefaciens* ou por bombardeamento de partículas, ou por infecção com vírus recombinantes de plantas.

É outro aspeto da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica compreendendo uma mistura de anticorpos recombinantemente produzidos e um veículo adequado, em que duas cadeias pesadas diferentes e uma cadeia leve comum estão representadas na referida mistura de anticorpos recombinantemente produzidos, e em que duas cadeias pesadas diferentes são capazes de emparelhar com a referida uma cadeia leve comum. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis como aqui utilizado são exemplificados, mas não limitados a, adjuvantes, veículos sólidos, água, tampões, ou outros veículos utilizado na técnica para manter os componentes terapêuticos, ou suas combinações. A referida mistura pode compreender anticorpos biespecíficos. A referida mistura pode ser produzida a partir de um clone que foi derivado de uma única célula hospedeira, i.e. a partir de uma população de células contendo as mesmas moléculas de ácido nucleico recombinante. O termo "recombinantemente produzida" como aqui utilizado refere-se à produção por células hospedeiras que produzem anticorpos codificados através de ácidos nucleicos recombinantes introduzidos nestas células hospedeiras ou seus ancestrais. Não incluem deste modo o método clássico de produção de anticorpos policlonais, em que um indivíduo é imunizado com um antigénio ou mistura compreendendo o antigénio, após o

que os anticorpos produzidos por este indivíduo são recuperados a partir do indivíduo, *e.g.* a partir do sangue.

É outro aspeto da presente invenção proporcionar uma mistura de anticorpos de acordo com a invenção ou obtenível através de um método de acordo com a invenção para utilização no tratamento ou diagnóstico de uma doença ou distúrbio num indivíduo humano ou animal. Em outro aspeto, a invenção proporciona a utilização de uma mistura de anticorpos em que duas cadeias pesadas diferentes e uma cadeia leve comum estão presentes, para a preparação de um medicamento para utilização no tratamento ou diagnóstico de uma doença ou distúrbio num indivíduo humano ou animal. As misturas podem compreender anticorpos biespecíficos, e podem ser recombinantemente produzidas a partir de um clone que foi derivado de uma única célula hospedeira, *i.e.* a partir de uma população de células contendo as mesmas moléculas de ácido nucleico recombinante. Os alvos podem ser utilizados para pesquisar uma biblioteca de exposição de anticorpos, como descrito supra, para obter 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais anticorpos compreendendo uma cadeia leve comum que se liga ao alvo, e produz uma mistura destes de acordo com as revelações da presente invenção. Virtualmente, qualquer área da medicina em que os anticorpos monoclonais podem ser utilizados é adequada para a utilização das misturas de acordo com a invenção. Isto pode *e.g.* incluir o tratamento de doenças autoimunes e cancro, incluindo tumores sólidos do cérebro, cabeça e pescoço, mama, próstata, cólon, pulmão, e semelhantes,

assim como tumores hematológicos tais como tumores de células B. Os distúrbios neoplásicos que podem ser tratados com as misturas de acordo com a presente invenção incluem leucemias, linfomas, sarcomas, carcinomas, tumores de células neurais, carcinomas de células escamosas, tumores de células germinais, metástases, tumores não diferenciados, seminomas, melanomas, mielomas, neuroblastomas, tumores de células mistas, neoplasias causadas por agentes infecciosos, e outras malignidades. Os alvos para as misturas de anticorpos podem incluir, mas são limitadas a, o recetor HER-2/Neu, outros recetores de fator de crescimento tais como recetor VEGFR1 e VEGFR2, marcadores de células B tais como CD19, CD20, CD22, CD37, CD72, etc, marcadores de células T tais como CD3, CD25, etc, outros marcadores de superfície de células de leucócitos tais como CD33 ou HLA- DR, etc, citocinas tais como TNF, interleucinas, recetores para estas citocinas tais como os membros da família do recetor TNF, e semelhantes. É antecipado que a utilização destas misturas de anticorpos no tratamento de tecidos cancerosos ou outros complexos multi-antigénio compreendendo células tais como microrganismos ou vírus darão origem a uma menor ocorrência de variantes de escape com menos epitopos do que a utilização de anticorpos monoclonais únicos. Vários tratamentos utilizam presentemente misturas de anticorpos policlonais, que são derivadas de humanos ou animais imunizados. Estes tratamentos podem ser substituídos por utilização das misturas de acordo com a presente invenção. A utilização destas misturas pode também incluir a utilização em

rejeições de enxertos-versus-hospedeiros, conhecidos na técnica do transplante, e.g. por utilização de anticorpos anti-timócitos. É antecipado que as misturas de anticorpos são superiores aos anticorpos monoclonais no tratamento de antígenos complexos ou antígeno compreendendo misturas tais como bactérias ou vírus. Deste modo, a utilização de acordo com a invenção pode também incluir a utilização contra as estirpes de bactérias e fungos, e.g. no tratamento de doenças infecciosas devido a bactérias patogénicas tais como o resistente a multifármacos *S. aureus* e semelhantes, fungos tais como *Candida albicans* e espécies de *Aspergillus*, leveduras e semelhantes. As misturas de acordo com a invenção podem também ser utilizadas para profilaxia pós-exposição contra vírus, tais como os membros do género Lissavírus e.g. vírus da raiva, ou para utilização terapêutica ou profilática contra vírus tais como Vírus Varicela-Zoster, Adenovírus, Vírus do Sincício Respiratório, Vírus da Imunodeficiência Humana, Metapneumovírus Humano, vírus Influenza, Vírus West Nile, o vírus que causa a Síndrome Respiratório Agudo Grave (SARS), e semelhantes. As misturas de acordo com as invenções podem também ser utilizadas para proteger contra agentes, bactérias e vírus, e contra substâncias tóxicas que são ameaças potenciais de guerra biológico. Deste modo, a utilização de acordo com a invenção pode também incluir a utilização contra estirpes de bactérias tais como *Bacillus anthracis*, toxina de *Clostridium botulinum*, toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, *Yersinia Pestis*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, espécies de *Brucella*,

enterotoxina B de *Staphylococcus*, ou contra vírus tais como Variola major, alfavírus que causa síndromes de meningoencefalite (EEEV, VEEV, e WEEV), vírus conhecidos por causar febres hemorrágicas tais como vírus Ebola, Marburg e Junin ou contra vírus tais como vírus Nipah, Hantavírus, vírus da encefalite da carraça e vírus da febre amarela ou contra toxinas e.g. toxina Ricina de *Ricinus communis* e semelhantes. A utilização das misturas de acordo com a invenção pode também incluir utilização contra parasitas unicelulares ou multicelulares. As misturas de anticorpos recombinantes de acordo com a invenção podem tornar-se uma alternativa segura aos anticorpos policlonais obtidos a partir de misturas de soros humanos para imunização passiva, ou a partir de soros de animais hiperimunizados. As misturas podem ser mais eficazes do que os anticorpos monoclonais recombinantes em várias aplicações terapêuticas, incluindo cancro, alergia, doenças virais, inflamação crónica, e semelhantes. Foi descrito que a homodimerização de anticorpos monoclonais marcadamente reativos com tumor aumenta a sua capacidade de induzir interrupção do crescimento ou apoptose das células de tumor (Ghetie et al, 1997). Possivelmente, quando os anticorpos contra recetores ou outros antigénios de superfície nas células alvo, tais como células de tumor ou microrganismos infecciosos, são produzidos de acordo com a presente invenção, os anticorpos biespecíficos presentes em misturas de acordo com a invenção podem também ligar-se de forma cruzada a diferentes recetores ou outros antigénios na superfície de células alvo, e deste modo estas misturas

podem ser muito adequadas para matar estas células. Alternativamente, quando os anticorpos biespecíficos são menos desejáveis, a presente invenção também proporciona métodos para produzir recombinantemente misturas de anticorpos compreendendo principalmente anticorpos monoespecíficos. Foi descrito que a eficácia de tratamento com Rituximab™ (anticorpo monoclonal anti-CD20) foi aumentada quando os anticorpos anti-CD59 foram adicionados (Herjunaap et al, 2000). Deste modo, espera-se que a inclusão de anticorpos contra CD59 numa mistura de acordo com a invenção compreendendo anticorpos anti-tumor na forma de recetor de células B que reconhecem anticorpos aumentam a sensibilidade das células de tumor para ataque do complemento. Foi também demonstrado que um cocktail de combinação tripla de imunotoxinas anti-CD19, anti-CD22, e anti-CD38-saporina é muito mais eficaz do que os componentes individuais no tratamento de linfoma de células B humanas num modelo de murganho imunodeficiente (Flavell et al, 1997). Muitas outras combinações podem também ser realizáveis e podem ser concebidas pela pessoa especialista na técnica. Em geral, a utilização de misturas de anticorpos que são capazes de reconhecer epitopos múltiplos de células B diminuirão provavelmente a ocorrência das variantes de escape. Outro alvo possível é um recetor de cinase de tirosina transmembranar, codificada pelo proto-oncogene Her-2/Neu (ErbB2) (ver e.g. patentes US 5 772 997 e 5 783 186 para anticorpos anti-Her2). Her-2 é sobre-expressa em 30% de cancros da mama altamente malignos, e anticorpos bem-sucedidos contra este alvo, marcados sob o

nome de Herceptin™ (Trastuzumab), foram desenvolvidos. Foi mostrado que o alcance de epitopos múltiplos Her-2 com uma mistura de anticorpos monoclonais resulta em atividade anti-crescimento melhorada de uma linha celular de cancro da mama humano *in vitro* e *in vivo* (Spiridon *et al*, 2002). Her- 2 pode deste modo ser um bom alvo para misturas de anticorpos de acordo com a presente invenção. Os anticorpos úteis para este propósito podem ser obtidos por métodos descritos na presente invenção, incluindo métodos de exposição de anticorpos.

Os anticorpos são capazes de estimular a função efetora através da ligação ao recetor de imunoglobulinas nas células efetoras imunitárias. A IgG humana, e em particular IgG₁ e IgG₃, fixa o complemento para induzir CDC e interagir com recetores Fcγ para induzir citotoxicidade mediada por células dependentes do anticorpo (ADCC), fagocitose, endocitose, indução de crise respiratória e libertação de mediadores inflamatórios e citocinas. A IgA humana interage com FcγR, também para resultar em eficiente ativação de ADCC e fagocitose de células alvo. Deste modo, devido à distribuição diferencial de FcγR e FcαR em células periféricas do sangue (Huls *et al.*, 1999), utilizando uma mistura de anticorpos dirigida contra o alvo e consistindo em IgG e IgA podia potencialmente maximizar o recrutamento e ativação de diferentes células efetoras imunitárias. Tal mistura de IgG e IgA pode ser obtida pela produção do anticorpo monoclonal IgG e IgA num processo de produção separado utilizando duas linhas de célula com produção

distinta, mas pode também ser obtida a partir de uma única linha celular que produz o anticorpo monoclonal IgG e IgA. Isto terá a vantagem que apenas um único processo de produção tem de ser desenvolvido. Deste modo, quando as cadeias pesadas diferentes são mencionadas, também as cadeias pesadas que diferem nas suas regiões constantes são incluídos na invenção. O princípio da utilização de uma cadeia leve comum pode também ser utilizada para a produção de uma mistura de isotipos a partir de uma célula hospedeira. É deste modo ainda outro aspeto da presente invenção a utilização de um método para produção de uma mistura de anticorpos compreendendo diferentes isotipos a partir de uma célula hospedeira, compreendendo o método o passo de: cultivar uma célula hospedeira compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve e sequências de ácido nucleico que codificam duas cadeias pesadas de diferentes isotipos que são capazes de emparelhar com a referida cadeia leve, em condições que conduzem à expressão das referidas sequências de ácido nucleico. De acordo com este aspeto da invenção, as cadeias pesadas diferentes podem ter regiões variáveis idênticas, e diferem apenas nas suas regiões constantes (*i.e.* têm diferentes isotipos e possuem a mesma especificidade). Numa forma de realização particular, os referidos isotipos compreendem pelo menos um IgG e um IgA e/ou IgM, preferencialmente IgG₁ ou IgG₃ e IgA. Outras combinações de IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ podem também ser utilizadas. Nestas formas de realização, os anticorpos biespecíficos não serão produzidos devido às regiões variáveis são os mesmos.

Em outras formas de realização de acordo com este aspecto da invenção, não apenas as regiões constantes das cadeias pesadas podem diferir, mas também as regiões variáveis, produzindo deste modo diferentes especificidades, emparelhadas com a mesma cadeia leve. Quando os anticorpos biespecíficos não são desejados para um determinado propósito, *e.g.* porque as misturas de anticorpos são menos eficazes devido à presença dos anticorpos biespecíficos, é possível utilizar duas cadeias pesadas combinadas com a cadeia leve comum de acordo com a invenção em que as referidas cadeias pesadas diferem de forma suficiente nas suas regiões constantes para reduzir ou prevenir o emparelhamento entre as cadeias pesadas diferentes, *e.g.* utilizando as cadeias pesadas de diferentes isotipos, *e.g.* uma IgG₁ e uma IgG₃ (ver Fig. 11 para uma representação esquemática). É antecipado que as cadeias pesadas de diferentes isotipos irão emparelhar muito de um modo muito menos eficiente, se o conseguirem, em comparação com as mesmas cadeias pesadas. Alternativamente, é também possível manipular as cadeias pesadas diferentes na sua região constante de modo a que homodimerização seja favorecida sobre a heterodimerização, *e.g.* introduzindo interações de autocomplementaridade (ver *e.g.* WO 98/50431 para possibilidades, tais como estratégias de "protuberância-na cavidade" (ver WO 96/27011)). É deste modo outro aspecto da presente invenção proporcionar um método para a produção de uma mistura de anticorpos num hospedeiro recombinante, incluindo o método o passo de: expressar numa célula

hospedeira recombinante uma sequência de ácido nucleico que codificam uma cadeia leve comum e sequências de ácido nucleico que codificam duas cadeias pesadas diferentes que diferem na região variável e que são capazes de emparelhar com a referida cadeia leve comum, e em que as referidas cadeias pesadas diferem ainda nas suas regiões constantes de modo suficiente para reduzir ou prevenir o emparelhamento entre as cadeias pesadas diferentes. Numa forma de realização, as referidas cadeias pesadas são de diferentes isotipos. As misturas de anticorpos obteníveis por este método são também incorporadas na presente invenção. Estas misturas compreenderão principalmente anticorpos monoespecíficos.

As revelações da presente invenção podem também ser utilizadas para obter novos anticorpos multiespecíficos ou misturas destes. A dimerização das moléculas IgA pode ser melhorada pela co-expressão da cadeia J (Yoo *et al*, 1999). Os referidos anticorpos diméricos IgA têm duas especificidades (ver Fig. 9 para uma representação esquemática de uma forma possível produzida e presente na mistura). Até cinco especificidades podem ser compreendidas num pentâmero IgM na presença de cadeia J, e até seis num hexâmero IgM na ausência da cadeia J (Yoo *et al*, 1999). Deste modo, em formas de realização específicas, 3, 4, 5, ou 6 cadeias pesadas de IgM são co-expressas com a cadeia leve comum de acordo com este aspeto da invenção. Ver Fig. 10 durante uma representação esquemática de uma das possíveis formas que podem ser produzidas e estar presentes

na mistura de acordo com este aspeto da invenção, quando cinco cadeias pesadas diferentes são expressas com a cadeia leve comum. Os dímeros de IgA, os pentâmeros ou hexâmeros de IgM possuindo pelo menos duas diferentes especificidades podem ser produzidas a partir de um clone de uma única célula hospedeira de acordo com a invenção. Estas moléculas, portadoras de regiões de ligação ao antigénio com diferentes especificidades, podem ligar diferentes epitopos no mesmo antigénio, diferentes antigénios em uma célula, ou diferentes antigénios em diferentes células, fazendo reacção cruzada entre os antigénios ou células.

Exemplos

Os exemplos que se seguem são proporcionados para ilustrar a invenção, e não devem ser entendidos de qualquer forma para limitar o âmbito da invenção. A prática desta invenção empregará, a menos que indicado de outro modo, técnicas convencionais de imunologia, biologia molecular, microbiologia, biologia celular, e DNA recombinante, que estão na especialidade da técnica. Ver *e.g.* Sambrook, Fritsch e Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edição, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, *et al*, eds, 1987; as séries *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR2: A Practical Approach*, MacPherson MJ, Hams BD, Taylor GR, eds, 1995; *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow e Lane, eds, 1988.

Exemplo 1 Produção de uma mistura de anticorpos

monoclonais com uma cadeia leve comum e duas diferentes regiões variáveis de cadeia pesada numa única célula

O Clone UBS-54 e o Clone K53 foram previamente isolados por seleções na linha celular colorrectal SW40 (Huls *et al.*, 1999) e numa mistura heterogénea de células mononucleares de um doente com mielomas múltiplos (WO 02/18948), respetivamente, com uma biblioteca semissintética (de Kruif *et al.*, 1995b). Estudos adicionais revelaram que o clone UBS-54 e K53 se ligaram à molécula de adesão homotípica EP-CAM (Huls *et al.*, 1999) e o co-factor de proteína de membrana CD46 (WO 02/18948), respetivamente. A sequenciação de DNA dos clones revelou que estes foram únicos nos CDRs da cadeia pesada, mas que estes continham uma sequência de cadeia leve idêntica (Fig. 3). As VH e VL dos clones UBS-54 e K53 foram inseridos num vetor de expressão contendo a sequência líder HAVT20 e todas as sequências codificantes para os domínios constantes de uma IgG₁ humana com uma cadeia leve Kapa através de um método essencialmente como descrito (Boel *et al.*, 2000), que resultou nos plasmídeos pUBS3000Neo e pCD46_3000(Neo) (Fig. 4). Estes plasmídeos foram transientemente expressos isoladamente ou em combinação em células PER.C6™. Resumidamente, cada frasco de 80 cm² foi transfectado por incubação durante 4 horas com 140 mL de lipofectamina + 10 mg de DNA (pUBS3000Neo, pCD46_3000(Neo) ou 10 µg de ambos) no meio DMEM isento de soro a 37 °C. Após 4 horas, este foi substituído por DMEM + 10% de FBS, e as células foram cultivadas durante a noite a 37 °C. As células foram

então lavadas com PBS e o meio foi substituído por meio Excell 525 (JRH Bioscience). As células foram deixadas crescer a 37 °C durante 6 dias, após o que o sobrenadante da cultura de células foi recolhido. A análise ELISA específica para a IgG humana (descritos na WO 00/63403) indicou que a IgG estava presente em aproximadamente 10 µg/mL para todos os frascos contendo plasmídeos de expressão. A IgG₁ não estava presente num frasco de controlo que não foi transfetado com plasmídeo de expressão. A IgG humana de cada sobrenadante foi subsequentemente purificado utilizando cromatografia de afinidade em Proteína A (Hightrap Protein A HP, cat.nº 1-040203) de acordo com procedimentos convencionais, seguindo as recomendações do fabricante (Amersham Biosciences). Após eluição, as amostras foram concentradas num concentrador Microcon YM30 (Amicon) e tampão trocado para 10 mM de fosfato de sódio, pH 6,7. Doze mg de IgG purificada foi subsequentemente analisada em géis de focagem Isoeléctrica (géis IEF Pré-encastados Serva, intervalo de pH de 3-10, cat. nº 42866). As amostras foram aplicadas no lado do pH baixo e após focagem foram coradas com azul coloidal (Fig. 5). A Faixa 1 mostra K53 transientemente expressa, a Faixa 2 mostra UBS-54 transientemente expressos e a Faixa 3 mostra a amostra IgG das células em que ambos os anticorpos foram co-transfetados. Claramente, K53 e UBS-54 têm cada um, um perfil único de pI e a forma da amostra da cotransfecção apresentou outras isoformas únicas, com a principal isoforma possuindo um pI entre os de K53 e UBS-54. Isto é também antecipado com base no seu pI teórico

quando calculado com a ferramenta ProtParam proporcionada na página inicial Expasy (<http://www.expasy.ch>; Appel *et al.*, 1994). Os K53 e UBS-54 possuem um pI teórico de 8,24 e 7,65, respectivamente, enquanto uma isoforma representando um heterodímero de uma cadeia pesada de UBS-54 e uma cadeia pesada de K53 possui um pI teórico de 8,01. A montagem deste heterodímero pode apenas ocorrer quando uma única célula traduz a cadeia pesada de K53 e a cadeia pesada de UBS-54 e monta estes numa molécula IgG de comprimento total em conjunto com a cadeia leve comum. Deste modo, esta experiência mostra que é possível expressar duas moléculas únicas de IgG humana numa única célula e que um heterodímero consistindo nestas duas únicas especificidades de ligação é também eficientemente formados.

Exemplo 2 Produção de uma mistura de anticorpos contra marcadores de células B humanas num clone derivado da linha celular PER.C6™.

Um método para a produção de uma mistura de anticorpos de acordo com a invenção, utilizando a expressão numa célula hospedeira recombinante de uma cadeia leve simples e três cadeias pesadas diferentes capazes de emparelhar com a cadeia leve simples para formar anticorpos funcionais, é aqui exemplificado e é esquematicamente apresentado na Fig. 6. Os fagos que codificam anticorpos capazes de ligação a proteínas presentes em células B humanas, *i.e.* CD22, CD72 e Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe II (ainda referido como

um HLA-DR) foram previamente isoladas a partir de uma biblioteca de fagos semissintética (de Kruif *et al.*, 1995; van der Vuurst de Vries & Logtenberg, 1999). A sequenciação de DNA das sequências VH e VL dos fagos do clone B28 (anti-CD22), clone I-2 (anti-HLA-DR) e clone II-2 (anti-CD72) revelou que todas continham uma sequência VH única, mas a sequência de cadeia leve comum (V λ 3) com uma região CDR idêntica (Fig. 7). As sequências VH e VL dos clones B28, I-1 e II-2 são clonadas atrás da sequência líder HAVT20 de um plasmídeo de expressão compreendendo uma cadeia pesada. Um exemplo de um destes plasmídeos é pCRU-K01 (contém sequências de cadeia pesada kapa, que podem ser facilmente trocadas por sequências de cadeia pesada de lambda se desejada, por uma pessoa especialista na técnica), como depositado na ECACC sob o número 03041601. A clonagem produz plasmídeos que codificam uma IgG₁ humana de comprimento total com especificidades de ligação para CD22, CD72 e HLA-DR. Estes plasmídeos serão ainda referidos como pCRU-CD22, pCRUCD72 e pCRU-HLA-DR, respetivamente. As linhas celulares estáveis derivadas de PER.C6™ são produzidas, de acordo com métodos conhecidos das pessoas especialistas da técnica (ver *e.g.* WO 00/63403), as linhas celulares que expressam anticorpos codificados pela informação genética em pCRU-CD22, pCRUCD72 ou pCRU-HLA-DR e a linha celular que expressa os anticorpos codificados por todos os três plasmídeos. Deste modo, as células PER.C6™ são semeadas em DMEM mais 10% de FBS em placas de cultura de tecido (10 cm de diâmetro) ou os frascos T80 com aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por placa e mantidos

durante a noite sob as suas normais condições de cultura (concentração de 10% de CO₂ e 37 °C). No dia seguinte, as transfeções são efetuadas em placas separadas a 37 °C utilizando Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acordo com protocolos convencionais proporcionados pelo fabricante, com 1-2 µg de pCRU-CD22, 1-2 µg de pCRU-CD72, 1-2 µg de pCRU-HLA-DR ou 1 µg de uma mistura de pCRU-CD22, pCRU-CD72 e pCRU-HLA-DR. Como um controlo para a eficiência de transfeção, algumas placas são transfetadas com um vetor de controlo LacZ, enquanto algumas placas não serão transfetadas e servem como controlos negativos. Após 4 a 5 horas, as células são lavadas duas vezes com DMEM e realimentadas com meio fresco sem seleção. No dia seguinte, o meio é substituído com meio fresco contendo 500 µg/mL de G418. As células são refrescadas a cada 2 ou 3 dias com meio contendo as mesmas concentrações de G418. Cerca de 20-22 dias após sementeira, um grande número de colónias são visíveis e de cada transfeção pelo menos 300 são picadas e cultivadas através de placas de 96 poços e/ou 24 poços via 6 poços para frascos T25. Neste estágio, as células são congeladas (pelo menos 1, mas normalmente 4 frascos por colónia sub-cultivada) e os níveis de produção de anticorpo IgG humano recombinante são determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para IgG₁ humana (descritos na WO 00/63403). Também, neste estágio, o G418 é removido do meio de cultura e nunca mais reaplicado. Para um número representativo de colónias grandes volumes serão cultivados para purificar a fração de IgG₁ humana recombinante a partir do sobrenadante condicionado utilizando cromato-

grafia de afinidade em Proteína A de acordo com os procedimentos convencionais. A IgG₁ humana purificada a partir de vários clones é analisada em SDS-PAGE, focagem Isoelétrica (IEF) e a ligação aos alvos CD22, CD72 e HLADR utilizando célula transfetantes que expressam estes antigénios humanos na sua superfície celular (transfetantes que expressam CD72 e HLA-DR foram descritos por van der Vuurst-de Vries e Logtenberg, 1999; um transfetante CD22 foi preparado de acordo com procedimentos convencionais semelhantes em PER.C6™). As colónias obtidas a partir da co-transfecção com pCRU-CD22, pCRU-CD72 e pCRU-HLA-DR são pesquisados por PCR em DNA genómico para a presença ou ausência de cada uma das três construções. A identidade dos produtos de PCR é ainda confirmada por sequenciação de DNA. A seguir, é demonstrado que uma linha celular clonal contribui para a produção de cada uma das três especificidades de ligação, *i.e.* prova que uma única célula é capaz de produzir uma mistura de mais do que duas IgGs humanas funcionais. Deste modo, um número limitado de colónias, que foram positivas para a produção de cada uma das três especificidades de ligação (por PCR ao nível de DNA também nos ensaios de ligação especificados contra CD22, CD72 e HLA-DR), são sujeitas a uma separação de célula única utilizando um separador de células ativado por fluorescência (FACS) (Becton & Dickinson FACS VANTAGE SE). Alternativamente, as colónias são semeadas a 0,3 células/poço para garantir o sobrecrecimento clonal. As populações clonais de células, daqui em diante designadas como subclones, são refrescadas uma vez por semana com meio

fresco. Os subclones são cultivados e transferidos das placas de 96 poços através de 24-e 6-poços para frascos T25. Neste estágio, os subclones são congelados (pelo menos 1, mas normalmente 4 frascos por subclone) e os níveis de produção do anticorpo IgG₁ recombinante humano são determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para a IgG₁ humana. Para um número representativo de subclones, são cultivados maiores volumes para purificar a fração de IgG₁ recombinante humana a partir do sobrenadante condicionado utilizando cromatografia de afinidade em Proteína A de acordo com os procedimentos convencionais. A IgG₁ humana purificada a partir dos vários subclones é subsequentemente analisada como descrito acima para IgG₁ humana obtida a partir dos clones parentais, *i.e.* por SDS-PAGE, focagem isoeletrica (IEF) e ligação aos alvos CD22, CD72 e HLA-DR. Os subclones serão também pesquisados por PCR em DNA genómico para a presença ou ausência de cada uma das três construções pCRU-CD22, pCRU-CD72 e pCRU-HLA-DR. A identidade dos produtos de PCR é depois confirmada por sequenciação de DNA. Outros métodos tais como transferência de Southern e/ou FISH podem também ser utilizados para determinar se cada uma das três construções estão presentes na linha clonal de células. Os subclones que provaram ser transgênicos para cada uma das três construções são colocadas em cultura durante um extenso período para determinar se a presença dos transgenes é estável e se a expressão da mistura de anticorpo permanece a mesma, não apenas em termos dos níveis de expressão, mas também na proporção entre as várias isoformas do anticorpo que são

segregadas a partir da célula. Deste modo, a cultura de subclones é mantida para pelo menos 25 vezes de duplicação da população como uma cultura aderente ou como uma cultura em suspensão. A cada 4-6 duplicações da população, um teste de produção específica é efetuado utilizando a ELISA específica para a IgG humana e maiores volumes são cultivados para obter o sedimento de células e o sobrenadante. O sedimento de células é utilizado para avaliar a presença das três construções no DNA genómico, via PCR, transferência de Southern e/ou FISH. O sobrenadante é utilizado para purificar a fração de IgG₁ recombinante humana como descrito *supra*. Uma IgG₁ humana purificada obtida nas várias duplicações da população é analisada como descrito, *i.e.* por SDS-PAGE, focagem isoelétrica (IEF) e ligação aos alvos CD22, CD72 e HLA-DR utilizando células transfetantes que expressam estes antigénios.

Exemplo 3 Pesquisa de clones que expressam múltiplas IgGs humanas para a mistura funcional mais potente de IgGs humanas

A funcionalidade da mistura de anticorpo é analisada em ensaios à base de células para determinar se a mistura de IgG₁ humana inibe a proliferação e/ou induz apoptose de linhas de células B, tais como por exemplo as Ramos. Outras linhas celulares podem também ser utilizadas. Adicionalmente as misturas de anticorpos são analisadas quanto ao seu potencial para induzir toxicidade celular

dependente de anticorpo e citotoxicidade dependente do complemento de, por exemplo, células Ramos. Em cada uma das experiências que se seguem a funcionalidade da mistura de anticorpos que reconhecem os alvos CD22, CD72 e HLA-DR é analisada e pode ser comparada com cada um dos anticorpos IgG₁ individuais e para uma combinação equimolar das três especificidades individuais de IgG₁.

Para avaliar a capacidade das misturas de anticorpos inibirem a proliferação das células Ramos, estas células são incubadas em placas de 96 poços (0,1 -1,0 x 10⁵/mL) com várias concentrações (5-20 µg/mL) das misturas de anticorpos contra CD22, CD72 e HLA-DR durante 24 horas. A proliferação das células é medida por incorporação de ³H-timidina durante mais 16 horas de cultura. A inibição de crescimento é determinada colocando em gráfico a percentagem de incorporação de ³H-timidina em comparação com as células não tratadas (tomadas como 100% de valor de referência).

Para analisar a indução de apoptose de células Ramos, estas células são estimuladas em placas de 48 poços (0,2-1,0 x 10⁶/mL) com várias concentrações (5-20 mg/mL) das misturas de anticorpos contra os alvos CD22, CD72 e HLA-DR durante 24 ou 48 horas. Após o período de incubação a exposição a fosfatidil serina em células apoptóticas é analisada (Koopman G *et al*, 1994). Deste modo, as células são recolhidas, lavadas duas vezes com PBS e são incubadas à Temperatura Ambiente durante 10 min com 100 ml de anexina

marcada FITC V (Caltag) diluída 1: 25 em tampão de ligação de anexina V (Caltag). Antes da análise das amostras por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA) é adicionado iodeto de propídio (PI) (Sigma) para uma concentração final de 5 µg/mL para distinguir células necróticas (anexina V-/PI⁺) das células apoptóticas (anexina V⁺/PI⁻, células apoptóticas precoces; anexina V⁺/PI⁺, células apoptóticas tardias). Num ensaio alternativo, a apoptose é induzida por ligação reticulada das misturas de anticorpos contra CD22, CD72 e HLA-DR na superfície das células Ramos com 25 µg/mL de F(ab)₂ de anticorpos policlonais anti-humanos de cabra (específicos para Fc) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) durante o período de incubação. Noutro ensaio alternativo, a apoptose é induzida incubando as células Ramos com várias concentrações (5-20 µg/mL) das misturas de anticorpos contra CD22, CD72 e HLA-DR enquanto são co-incubadas com os agentes de quimiossensibilização de doxorubicina (Calbiochem) ou dexametasona (UMCU, Utrecht, Países Baixos).

A Citotoxicidade Celular Dependente do Anticorpo das misturas de anticorpos é analisada utilizando células mononucleares de sangue periférico como células efetoras num ensaio de libertação de ⁵¹Cr convencional (Huls *et al*, 1999). A este propósito, 1-3 x 10⁶ células Ramos são marcadas com 100 µCi (Amersham, Buckinghamshire, UK) durante 1 hora a 37 °C. Após três lavagens com meio, as células Ramos alvo são plaqueadas em placas de 96 poços de

fundo em U a 5×10^3 células/poço. As células mononucleares de sangue periférico que são obtidas de doadores saudáveis por gradientes de densidade em Ficoll-Hypaque são então adicionadas a cada poço em proporções efetor:alvo variando desde 80:1 até 10:1 em triplicado. As células são incubadas a 37 °C na presença de várias concentrações das misturas de anticorpos (5-20 µg/mL) num volume final de 200 µl. Após 4 horas de incubação parte do sobrenadante é recolhida e a libertação de ^{51}Cr é medida. A percentagem de lise específica é calculada utilizando a seguinte fórmula: % de lise específica = $([\text{cpm experimental} - \text{cpm espontânea}] / [\text{cpm máxima} - \text{cpm espontânea}] \times 100\%)$. A libertação máxima de ^{51}Cr é determinada adicionando triton X-100 para uma concentração final de 1% às células alvo e a libertação espontânea é determinada após incubação das células alvo apenas com o meio. A citotoxicidade dependente do complemento é determinada num ensaio semelhante. Em vez das células efetoras, agora é adicionado 50 µl de soro humano às células alvo. Subsequentemente, o ensaio é efetuada do mesmo modo. Alternativamente, é determinada a ADCC e CDC das misturas de anticorpos utilizando um ensaio de libertação de Európio (Patel e Boyd, 1995) ou utilizando um ensaio de libertação de LDH (Shields *et al*, 2001).

Exemplo 4 Utilização de apresentação em fago para isolar fagos múltiplos com uma sequência de V_L idêntica contra um alvo predefinido (Her-2), e produção numa célula hospedeira recombinante de uma mistura de anticorpos capazes de ligação a este alvo.

Os fagos que apresentam fragmentos de scFv capazes de ligação a múltiplos epitopos presentes na mesma proteína, por exemplo o recetor do fator de crescimento da epiderme Her-2, pode ser isolado a partir de uma biblioteca de fagos semissintéticos (de Kruif *et al.*, 1995a, b). É possível identificar vários desses fagos e selecionar aqueles que compreendem a mesma sequência da cadeia leve, para posterior utilização de acordo com a invenção. A biblioteca semissintética é formada misturando 7 sub-bibliotecas que contêm cada uma diferentes cadeias leves (de Kruif *et al.*, 1995a, b). É deste modo particularmente prático utilizar uma tal sub-biblioteca, contendo apenas uma cadeia leve e muitas cadeias pesadas, para pesquisa de modo a que sejam obtidos múltiplos anticorpos com uma sequência V_L idêntica, e ainda utilizados para expressarem as misturas de anticorpos de acordo com a invenção. Para a seleção dos fagos contra Her-2 são produzidas várias proteínas de fusão compreendendo diferentes partes do domínio extracelular de Her-2 que são fundidas com os domínios CH2 e CH3 de IgG₁ humana. Para este propósito foi construído um vetor de expressão pCDNA3.1zeo (InVitrogen) que contém na sua região de clonagem múltipla um sítio de restrição XhoI na região da dobra em grelha antes dos domínios CH2 e CH3 da IgG₁ humana. Utilizando um clone de cDNA Her-2 como um molde são produzidos fragmentos de PCR utilizando técnicas de biologia molecular convencionais conhecidas de um especialista na técnica. Estes fragmentos consistem num sítio único de restrição em 5', um códon de

iniciação seguido por uma sequência líder eucariótica que é ligada em grelha ao domínio extracelular total (EC) de Her-2 ou a uma parte do domínio EC de Her-2 que é seguida em grelha por um sítio de restrição XhoI. Estes fragmentos de PCR são subsequentemente clonados em grelha com a região de IgG₁ CH2-CH3 no vetor de expressão pCDNA3.1zeo. Em adição à proteína de fusão contendo o domínio EC total de Her-2, são produzidas várias proteínas de fusão mais pequenas contendo fragmentos não sobreponíveis do domínio de Her-2 EC. Estas construções que codificam as proteínas de fusão Her-2-Ig são utilizadas para a transfeção transiente de células 293T utilizando o reagente lipofectamina (Gibco). Cinco dias após transfeção os sobrenadantes das células 293T são recolhidos e as proteínas de fusão Her-2-Ig são purificadas utilizando cromatografia de afinidade de proteína A de acordo com procedimentos convencionais. As proteínas de fusão Her-2-Ig contendo fragmentos não sobreponíveis do domínio Her-2 EC são revestidas durante 2 horas a 37 ° na superfície de tubos de plástico Maxisorp™ (Nunc) a uma concentração saturante (0,5-5 µg/mL). Os tubos são bloqueados durante 1 h em 2% de leite em pó magro dissolvido em PBS (MPBS). Simultaneamente, são adicionados 500 µl (aproximadamente 10¹³ cfu) de uma biblioteca de exposição em fagos semissintética (uma sub-biblioteca de acordo com a terminologia utilizada acima) em que apenas uma cadeia leve Vkappa1 é representada, preparada como descrito por De Kruif et al (1995a, b) e referências aí contidas, a dois volumes de MPBS a 4%. Adicionalmente, é adicionado soro humano para uma concentração final de 15% e

o bloqueamento é deixado prosseguir durante 30-60 min. Os tubos revestidos com Her-2-Ig são esvaziados e a biblioteca de fagos bloqueados é adicionada. O tubo é selado e sujeito a rotação lenta durante 1 h, seguido por 2 h de incubação sem rotação. Os tubos são esvaziados e lavados 10 vezes em PBS contendo 0,1% de Tween-20, seguido por lavagem 5 vezes em PBS. É adicionado 1 ml de glicina-HCL, 0,05 M, pH 2,2, e o tubo é sujeito a rotação lenta durante 10 min. Os fagos eluídos são adicionados a 500 µl de Tris-HCl a 1M, pH 7,4. A esta mistura, é adicionado 3,5 ml de cultura de bactérias XL-1 blue em crescimento exponencial. os tubos são incubados durante 30 min a 37 °C sem agitação. Subsequentemente, as bactérias são plaqueadas em placas de agar 2TY contendo ampicilina, tetraciclina e glucose. Após incubação durante a noite das placas a 37 °C, as colônias são raspadas das placas e utilizadas para preparar uma biblioteca de fagos enriquecida, essencialmente como descrito por De Kruif *et al.* (1995a). Em resumo, as bactérias raspadas são utilizadas para inocular meio 2TY contendo ampicilina, tetraciclina e glucose e são cultivadas a 37 °C até uma DO_{600nm} de ~0,3. São adicionados fagos auxiliares e deixados a infetar as bactérias após o que o meio é mudado para 2TY contendo ampicilina, tetraciclina e canamicina. A incubação é prosseguida durante a noite a 30 °C. No dia seguinte, as bactérias são removidas do meio 2TY por centrifugação após o que os fagos são precipitados utilizando polietilenoglicol 6000/NaCl. Finalmente, os fagos são dissolvidos num volume pequeno de PBS-1% BSA, esterilizados por filtração e utilizados para

uma ronda de seleção seguinte. O processo de seleção/re-infeção é efetuado duas vezes. Após a segunda ronda de seleção, são utilizadas colónias de *E. coli* individuais para preparar anticorpos monoclonais em fago. Essencialmente, as colónias individuais são cultivadas até à fase log e são infetadas com fagos auxiliares após o que a produção de anticorpos em fago é deixada prosseguir durante a noite. Os sobrenadantes contendo anticorpo em fago são testados em ELISA para a atividade de ligação a placas de 96 poços revestidas com Her-2-total EC-Ig.

Os anticorpos em fago selecionados que são obtidos no rastreio acima descrito, são validados por ELISA para especificidade. Para este propósito, proteínas de fusão Her-2-Ig contendo fragmentos não sobreponíveis do domínio Her-2 EC são utilizados para revestir placas de ELISA Maxisorp. Após o revestimento, as placas são bloqueadas em 2% MPBS. Os anticorpos em fago selecionados são incubados num volume igual de MPBS a 4%. As placas são esvaziadas, lavadas uma vez em PBS, após o que os fagos bloqueados são adicionados. A incubação é deixada prosseguir durante 1 h, as placas são lavadas em PBS a 0,1% de Tween-20 e os fagos ligados são detetados utilizando um anticorpo anti-M13 conjugado com peroxidase. O processo é efetuado simultaneamente utilizando um anticorpo em fago de controlo dirigido contra tiroglobulina (De Kruif *et al.* 1995a,b), que serve como um controlo negativo. Noutro ensaio os anticorpos em fago selecionados são analisados em relação à sua capacidade para se ligarem a células do

cancro da mama humanas BT474 que expressam Her-2. Para análise de citometria de fluxo, os anticorpos em fago são primeiro bloqueados num volume igual de MPBS a 4% durante 15 min a 4 °C antes da coloração das células BT474. A ligação dos anticorpos em fago às células é visualizada utilizando um anticorpo anti-M13 biotinilado (Santa Cruz Biotechnology) seguido por estreptavidina-ficoeritrina (Caltag).

Alternativamente, os anticorpos em fago que reconhecem múltiplos epitopos em Her-2 são selecionados utilizando um método baseado na competição da ligação dos fagos a Her-2 com a ligação dos bem caracterizados anticorpos anti-Her-2 de murino HER50, HER66 e HER70 (Spiridon *et al*, 2002). A este propósito são incubadas 2×10^6 células BT474 a 4 °C com aproximadamente 10^{13} cfu (0,5 ml) de uma biblioteca semissintética de exposição em fagos em que é apenas representada uma cadeia leve Vkappa1 preparada como descrito supra e bloqueados com 2 volumes de meio contendo 10% de FBS. A mistura é sujeita a rotação lenta a 4 °C durante 2 horas num tubo selado. Subsequentemente, os fagos não ligados são removidos através de duas lavagens com 50 ml de meio frio contendo 10% FBS. Posteriormente, os fagos que reconhecem múltiplos epitopos em Her-2 são eluídos ressuspendendo as células BT474 em 1 ml de meio frio contendo concentrações saturantes (5-20 mg/mL) dos anticorpos anti-Her-2 HER50, HER66 e HER70 de murino. As células são deixadas em gelo durante 10 min, centrifugadas e o sobrenadante contendo os

anticorpos em fago anti-Her-2 é utilizado para reinfetar células XL1-Blue, como descrito *supra*.

A partir do painel de anticorpos em fago específicos para Her-2 produzidos pelos rastreios descritos acima, são selecionados três anticorpos em fago que reconhecem três epitopos não sobreponíveis diferentes na proteína Her-2. As sequências de V_H e a sequência da cadeia leve única de V_{kappa} destes clones, provisionalmente designados VK1HER2-1, VK1HER2-2 e VK1HER2-3, são clonadas atrás das sequências líder HAVT20 do plasmídeo de expressão pCRU-K01 (depósito ECACC 03041601), ou um plasmídeo de expressão semelhante, para obter plasmídeos que codificam uma IgG₁-kappa humana de comprimento total com especificidades de ligação para Her-2. Estes plasmídeos são provisionalmente designados como pCRU-VK1HER2-1, pCRUVK1HER2-2 e pCRU-VK1HER2-3, respetivamente. São produzidas linhas celulares estáveis derivadas de PER.C6™, de acordo com métodos conhecidos das pessoas especialistas na técnica, as linhas celulares que expressam anticorpos codificados pela informação genética em pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 ou pCRU-VK1HER2-3 e uma linha celular que expressa anticorpos codificados por todos os três plasmídeos. Deste modo, as células PER.C6™ são semeadas em DMEM mais FBS a 10% em placas de cultura de tecidos (10 cm de diâmetro) ou em frascos T80 com aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por placa e mantidas durante a noite nas suas condições de cultura normais (concentração de CO₂ de 10% e 37 °C). No dia seguinte, as transfeções são efetuadas em

placas separadas a 37 °C utilizando Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acordo com protocolos convencionais fornecidos pelo fabricante, com 1-2 µg de pCRU-VK1HER2-1, 1-2 mg pCRU-VK1HER2-2, 1-2 mg pCRU-VK1HER2-3 ou 1 µg de uma mistura de pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 e pCRU-VK1HER2-3. Como um controlo para a eficiência de transfeção, algumas placas são transfetadas com um vetor de controlo de LacZ, enquanto algumas placas não são transfetadas e servem como controlos negativos. Após 5 horas as células são lavadas duas vezes com DMEM e realimentadas com meio fresco sem seleção. No dia seguinte, o meio é substituído com meio fresco contendo 500 mg/mL de G418. As células são refrescadas a cada 2 ou 3 dias com meio contendo as mesmas concentrações de G418. Cerca de 20-22 dias após a sementeira, são visíveis um grande número de colónias e de cada transfeção pelo menos 300 são repicadas e cultivadas das placas de 96 poços e/ou de 24 poços ou de 6 poços para frascos T25. Neste ponto, as células são congelados (pelo menos 1, mas normalmente 4 frascos por colónia sub-cultivada) e os níveis de produção de anticorpo de IgG humana recombinante são determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para a IgG₁ humana. Também, neste ponto, a G418 é removida do meio de cultura e nunca reaplicada novamente. Para um número representativo de colónias são cultivados volumes maiores para purificar a fração de IgG₁ recombinante humana a partir do sobrenadante condicionado utilizando cromatografia de afinidade em Proteína A de acordo com procedimentos convencionais. A IgG₁ humana purificada a partir dos vários clones é

analisada em SDSPAGE, focagem isoelétrica (IEF), ensaiada a ligação a proteínas de fusão Her-2-Ig por ELISA, e analisada para ligação a Her-2 na superfície de células BT474 através de citometria de fluxo. Os clones obtidos a partir da co-transfecção de pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 e pCRU-VK1HER2-3 são pesquisados por PCR em DNA genômico para a presença ou ausência de cada uma das três construções. A identidade dos produtos de PCR é ainda confirmada através de sequenciação de DNA. De seguida, é demonstrado que uma linha celular clonal é responsável pela produção de cada uma das três especificidades de ligação. Deste modo, um número limitado de colônias, que deram positivo no rastreio para a produção de cada uma das três especificidades de ligação (tanto por PCR ao nível do DNA assim como em ensaios de ligação especificados contra Her-2), são sujeitas a uma única separação de células por tamanho utilizando um separador de células por tamanho ativado por fluorescência (FACS) (Becton & Dickinson FACS VANTAGE SE). Alternativamente, as colônias são semeadas a 0,3 células/poço para garantir o desenvolvimento clonal. AS populações de células clonais, de aqui em diante designadas como subclones, são refrescadas uma vez por semana com meio fresco. Os subclones são cultivadas e transferidos das placas com 96-poços através de placas de 24- e 6-poços para frascos T25. Neste ponto, os subclones são congelados (pelo menos 1, mas normalmente 4 frascos por subclone) e os níveis de produção do anticorpo IgG₁ recombinante humano são determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para a IgG₁ humana. Para um número

representativo de subclones, são cultivados maiores volumes para purificar a fração de IgG₁ recombinante humana a partir do sobrenadante condicionado utilizando cromatografia de afinidade em Proteína A de acordo com procedimentos convencionais. A IgG₁ humana purificada a partir dos vários subclones é subsequentemente analisada como descrito acima para a IgG₁ humana obtida a partir dos clones parentais, i.e. por SDS-PAGE, Focagem isoeletrica (IEF) e ligação a Her-2. Os subclones também serão pesquisados por PCR em DNA genómico em relação à presença ou ausência de cada uma das três construções pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 e pCRU-VK1HER2-3. A identidade dos produtos de PCR é ainda confirmada por sequenciação de DNA. Outros métodos tais como transferência de Southern e/ou FISH podem também ser utilizados para determinar se cada uma das três construções estão presentes na linha celular clonal. Os sub-clones que demonstraram ser transgênicos para cada uma das três construções são transferidos para cultura durante um período extensivo para determinar se a presença dos transgenes é estável e se a expressão da mistura de anticorpo permanece igual, não apenas em termos dos níveis de expressão, mas também para a proporção entre os vários anticorpos que são secretados a partir da célula. Deste modo, a cultura do subclone é mantida durante pelo menos 25 vezes de duplicação da população quer como uma cultura aderente ou como uma cultura em suspensão. A cada 4-6 duplicações da população, é efetuado um teste de produção específico utilizando a ELISA específica para IgG humana e são cultivados maiores volumes para obter o

sedimento de células e o sobrenadante. O sedimento de células é utilizado para avaliar a presença das três construções no DNA genómico, quer através de PCR, transferência de Southern e/ou FISH. O sobrenadante é utilizado para purificar a fração de IgG₁ recombinante humana, como descrito *supra*. A IgG₁ humana purificada obtida nas várias duplicações da população é analisada como descrito, *i.e.* por SDS-PAGE, focagem isoelétrica (IEF) e ligação a Her-2 por ELISA e por citometria de fluxo utilizando células BT474.

A funcionalidade da mistura de anticorpos dos anticorpos anti-Her-2 é analisada numa base de ensaios de células para determinar se a mistura de IgG₁ humana inibe a proliferação e/ou induz a apoptose de células BT474. Adicionalmente, as misturas de anticorpos são analisadas quanto ao seu potencial para induzir a toxicidade celular dependente de anticorpo e a citotoxicidade dependente do complemento das células BT474.

Em cada uma das experiências descrita abaixo, a funcionalidade da mistura de anticorpos que reconhece Her-2 pode ser analisada e comparada com cada um dos anticorpos IgG₁ individuais e com uma combinação equimolar das três moléculas de IgG₁ monoespecífica individuais.

Para avaliar a capacidade das misturas de anticorpos para inibir a proliferação das células BT474, estas células são deixadas a aderir durante a noite em

placas de 96 poços ($1,5 \times 10^5$ /poço) e são subsequentemente incubadas com várias concentrações (5-20 $\mu\text{g/mL}$) das misturas de anticorpos contra Her-2 durante 72 horas. A proliferação das células é medida pela incorporação de ^3H -timidina durante as últimas 6 horas de cultura. A inibição do crescimento é determinada representando a percentagem da incorporação de ^3H -timidina comparada com células não tratadas (tomadas como o valor de referência de 100%).

Para analisar a indução da apoptose de células BT474, estas células são deixadas aderir durante a noite em placas de 48 poços ($2,5 \times 10^5$ /poço em 1ml) e são subsequentemente incubadas com várias concentrações (5-20 $\mu\text{g/mL}$) das misturas de anticorpos contra Her-2 durante 4 horas. A seguir as células são recolhidas por tripsinização, são lavadas duas vezes com PBS e são incubadas à temperatura ambiente durante 10 min com 100 μl de anexina V marcada com FITC (Caltag) diluída 1: 25 em tampão de ligação de anexina V (Caltag). Antes da análise das amostras por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA) é adicionado iodeto de propídio (PI) (Sigma) para uma concentração final de 5 $\mu\text{g/mL}$ para distinguir as células necróticas (anexina V-/PI⁺) das células apoptóticas (anexina V⁺/PI⁻, células apoptóticas precoces; anexina V⁺/PI⁺, células apoptóticas tardias).

A Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo das misturas de anticorpos é analisada utilizando células mononucleares de sangue periférico como células efectoras e

células BT474 como células alvo num ensaio convencional de libertação de ^{51}Cr como descrito *supra* (Huls *et al*, 1999). A citotoxicidade dependente do complemento é determinada num ensaio semelhante. Em vez das células efetoras, é agora adicionado 50 μl de soro humano às células alvo. Subsequentemente, o ensaio é efetuada como descrito *supra*. Alternativamente, a ADCC e CDC das misturas de anticorpos é determinada utilizando um ensaio de libertação de Európio (Patel e Boyd, 1995) ou utilizando um ensaio de libertação de LDH (Shields *et al*, 2001).

A funcionalidade das misturas de anticorpos contra Her-2 é também testada utilizando modelos animais *in vivo*, tais como por exemplo os descritos em Spiridon *et al*, 2002.

Exemplo 5

Expressão de diferentes IgGs humanos funcionais no leite de animais transgênicos

As sequências de V_H e de V_L de fagos contra proteínas presentes nas células B humanas, *i.e.* CD22 (clone B28), CD72 (clone II-2) e HLA-DR (clone I-2) (Fig. 7) são clonadas no plasmídeo de expressão pBC1 (como fornecido no Sistema de Expressão em Leite de Murganho pBC1, Invitrogen Life Technologies) para obter a expressão específica de glândula mamária e de lactação destas moléculas de IgG humana em animais transgênicos, de acordo com as instruções

do fabricante. Estes vetores de expressão específicos para a glândula mamária, que codificam as sequências de anticorpo para anti-CD22, anti-CD72 e anti-HLA-DR são introduzidos na linha germinal de murino de acordo com as instruções dos fabricantes. As crias obtidas são pesquisados para a presença de cada uma das três construções por PCR em DNA isolado a partir da cauda. As crias, sejam machos ou fêmeas, confirmadas como sendo transgênicas for cada um dos três anticorpos, são desmamadas e amadurecidas. Os murganhos transgênicos fêmeas são fertilizados na idade de 6-8 semanas e as amostras de leite são obtidas em vários pontos de tempo após gestação. Os murganhos transgênicos machos são emparelhados com as fêmeas não transgênicas e as fêmeas transgênicas da descendência (como determinado por PCR como descrito acima) são emparelhados e ordenhadas como descrito acima para as fêmeas transgênicas fundadoras. Sempre que necessário, os fundadores transgênicos machos ou fêmeas são emparelhados para outra geração para de poder obter quantidades suficientes de leite transgênico para cada linha fundadora. O leite transgênico é analisado para a presença de IgG humana com uma ELISA específica para IgG humana, que não faz reação cruzada com IgG de murganho ou outros componentes do leite de murganho. A IgG humana é purificada a partir de leite de murganho transgênico utilizando cromatografia de afinidade em Proteína A de acordo com procedimentos convencionais. A IgG humana purificada é analisada por SDS-PAGE, focagem isoelétrica e ligação nos alvos CD22, CD72 e HLA-DR. A funcionalidade da mistura de anticorpo é analisada como descrito *supra*.

Exemplo 6 Produção de uma mistura de IgA/IgG contra um alvo predefinido num clone derivado de PER.C6™.

As sequências V_H - V_L do fago UBS-54 dirigidas contra a molécula de adesão homotípica EP-CAM (Huls *et al.*, 1999) não foi apenas clonada num vetor que codifica os domínios constantes de uma IgG₁ humana com cadeia leve Kappa (vetor de expressão pUBS3000Neo), mas também num vetor de expressão que codifica os domínios constantes de uma IgA1 humana com cadeia leve Kappa (vetor de expressão pUBS54-IgA, Fig. 8). Assim, os anticorpos derivados de pUBS3000Neo e pUBS54-IgA ligam-se ao mesmo epitopo em EPCAM. As únicas diferenças entre os anticorpos derivados de pUBS3000Neo e de pUBS54-IgA estão nas sequências que codificam os domínios constantes da cadeia pesada, resultando num isotipo IgG₁ ou IgA1. As sequências da cadeia leve Kappa destes dois vetores são idênticas. As linhas celulares estáveis derivadas de PER.C6™ que expressam anticorpos codificados pela informação genética em pUBS3000Neo e pUBS54-IgA são produzidas através de processos bem conhecidos das pessoas especialistas na técnica. Deste modo, as células PER.C6™ são semeadas em DMEM mais FBS a 10% em placas de cultura de tecidos (10 cm de diâmetro) ou frascos T80 com aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por placa e mantidos durante a noite nas suas condições de cultura normais (concentração de CO₂ a 10% e a 37 °C). No dia seguinte, as transfeções são efetuadas em placas separadas a 37 °C utilizando Lipofectamina

(Invitrogen Life Technologies) de acordo com protocolos convencionais fornecidos pelo fabricante, com 1-2 μ g de pUBS3000Neo e pUBS54-IgA. Como um controlo para a eficiência de transfeção, algumas placas são transfectadas com um vetor de controlo de LacZ, enquanto algumas placas não são transfectadas e servem como controlos negativos. Após 4-5 horas, as células são lavadas duas vezes com DMEM e realimentadas com meio fresco sem seleção. No dia seguinte, o meio é substituído com meio fresco contendo 500 μ g/mL de G418. As células são refrescadas a cada 2 ou 3 dias com meio contendo as mesmas concentrações de G418. Cerca de 20-22 dias após a sementeira, é visível um grande número de colónias e de cada transfeção pelo menos 300 são repicadas e cultivadas através de placas de 96-poços e/ou 24-poços via placas de 6-poços para frascos T25. Neste ponto, as células são congelados (pelo menos 1, mas normalmente 4 frascos por colónia subcultivada) e os níveis de produção de anticorpo de IgG humana e IgA humana recombinantes são determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para IgG₁ humana assim como uma ELISA específica para IgA humana. Também, neste ponto G418 é removido do meio de cultura meio e nunca reaplicado novamente. Para um número representativo de colónias são cultivados maiores volumes para purificar a fração de IgG₁ humana e IgA humana recombinantes a partir do sobrenadante condicionado utilizando por exemplo (uma combinação de) cromatografia de afinidade de Proteína L ou LA, cromatografia de permuta catiónica, cromatografia de interação hidrofóbica e filtração em gel. As imunoglobulinas humanas

purificadas dos vários clones são analisadas em SDS-PAGE, Focagem isoelétrica (IEF) e ligação ao alvo EPCAM utilizando linhas celulares possuindo uma expressão elevada desta molécula. Os clones também serão pesquisados por PCR em DNA genómico para a presença ou ausência de pUBS3000Neo e pUBS54-IgA. A identidade dos produtos de PCR é ainda confirmada por sequenciação de DNA. Um número limitado de clones, que são positivos no rastreio para a produção de ambos EPCAM IgG₁ e EPCAM IgA, são sujeitos a separação por tamanho de célula única utilizando um separador por tamanho de células ativado por fluorescência (FACS) (Becton Dickinson FACS VANTAGE SE). Alternativamente, as colónias são semeadas a 0,3 células/poço para garantir um sobrecrecimento clonal. As populações de células clonais, de aqui em diante designadas como subclones, são refrescadas uma vez por semana com meio fresco. Os subclones são cultivados e transferidos de placas de 96-poços via 24- e 6-poços para frascos T25. Neste ponto, os subclones são congelados (pelo menos 1, mas normalmente 4 frascos por subclone) e os níveis de produção de anticorpo de IgG₁ humana e IgA recombinante são determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para uma ELISA específica para IgG₁ humana e uma IgA humana. Para um número representativo de subclones, são cultivados maiores volumes para purificar a fração IgG₁ humana e IgA1 humana recombinante do sobrenadante condicionado utilizando por exemplo (uma combinação de) cromatografia de afinidade da Proteína L ou LA, cromatografia de permuta catiónica, cromatografia de interação hidrofóbica e filtração em gel.

As imunoglobulinas humanas purificadas a partir dos vários clones são analisadas em SDS-PAGE, Focagem isoelétrica (IEF) e ligação ao alvo EPCAM utilizando linhas celulares possuindo uma expressão elevada desta molécula. Também serão rastreados os sub-clone por PCR em DNA genómico para a presença ou ausência de pUBS3000Neo e pUBS54-IgA. A identidade dos produtos de PCR é ainda confirmada por sequenciação de DNA. Outros métodos tais como a transferência de Southern e/ou FISH podem também ser utilizados para determinar se ambas as construções estão presentes na linha da celular clonal.

Exemplo 7 Produção de uma mistura de IgG₁/IgG3 humana contra alvos múltiplos numa linha celular clonal PER.C6™

O clone de fagos UBS-54 e do clone K53 (Fig. 3) foram obtidas como descritos no Exemplo 1. A V_H e V_L do clone UBS-54 foi inserida num vetor de expressão contendo a sequência líder HAVT20 e todas as sequências codificantes para os domínios constantes de uma IgG₁ humana com uma cadeia leve Kappa por um método essencialmente como descrito (Boel *et al*, 2000). O plasmídeo resultante foi designado como pUBS3000Neo (Fig. 4). Será claro que os vetores de expressão contendo domínios constantes de cadeia pesada de qualquer isotipo desejado podem ser construídos através de métodos de rotina da biologia molecular, utilizando as sequências dessas regiões que estão todas disponíveis na técnica. As sequências de V_H e V_L do clone

do fago K53 são clonadas num vetor de expressão contendo a sequência líder de HAVT20 e todas as sequências codificantes para os domínios constantes da cadeia pesada de uma IgG₃ humana com uma cadeia leve Kappa através de um método essencialmente como descrito (Boel *et al*, 2000). Este vetor de expressão é designado como pK53IgG3. Estes plasmídeos são transientemente expressados quer isoladamente ou em combinação em células PER.C6™. Resumidamente, cada frasco de 80 cm² é transfetado por incubação durante 4 horas com 140 µl de lipofectamina + 10 µg de DNA (quer pUBS3000Neo, pK53IgG3 ou 10 pg de ambos) em meio DMEM sem soro a 37 °C. Após 4 horas, este é substituído com DMEM + FBS a 10%, e as células são cultivadas durante a noite a 37 °C. As células são então lavadas com PBS e o meio é substituído com meio Excell 525 (JRH Bioscience). As células são deixadas crescer a 37 °C durante 6 dias, após o que o sobrenadante da cultura de células é recolhido. A análise de ELISA específica para IgG humana, *i.e.* medindo todos os sub-tipos de IgG, é realizada para determinar a concentração de IgG em células transfetadas e não transfetadas PER.C6™. A IgG humana de cada sobrenadante é subsequentemente purificada utilizando cromatografia de afinidade em Proteína A (Hightrap Protein A HP, cat.no. 1-040203) de acordo com procedimentos convencionais, seguindo as recomendações do fabricante (Amersham Biosciences). Após eluição, as amostras são concentradas num concentrador Microcon YM30 (Amicon) e o tampão é mudado para fosfato de sódio a 10 mM, pH 6,7. As amostras são analisadas para ligação aos alvos EPCAM e CD46 utilizando linhas celulares

possuindo uma expressão elevada dessas moléculas tais como células LS174T. Doze μ g de IgG purificada, que expressa transientemente UBS-54 IgG₁, K53 IgG3 ou IgG das células em que ambos os anticorpos foram co-transfetados, são subsequentemente analisadas em géis de focagem isoelétrica (géis Serva Pre-cast IEF, intervalo de pH de 3-10, cat.no. 42866). As amostras são aplicadas no lado do pH baixo e após focagem foi corada com azul coloidal. Os valores de pI das principais isoformas para cada amostra são determinados para ilustrar se houve expressão de UBS-54 IgG₁, K53 IgG3 ou heterodímeros biespecíficos, dependendo de como as células foram transfetadas. A identificação dos heterodímeros iria indicar que as células únicas traduziram a cadeia pesada de IgG3 de K53 e a cadeia pesada de IgG₁ de UBS-54 e as montaram numa molécula de IgG de comprimento total juntamente com a cadeia leve comum. A ausência de heterodímeros biespecíficos indica que é possível traduzir ambos a cadeia pesada de IgG3 de K53 e a cadeia pesada de IgG₁ de UBS-54 em células únicas, mas que estes não de montam numa molécula de IgG de comprimento total juntamente com a cadeia leve comum, *i.e.* há uma ligação preferencial das cadeias pesadas de IgG₁ e IgG3. Isto pode todavia também ser explicado pela falta de co-expressão de UBS-54 IgG₁ e K53 IgG3. Deste modo, linhas celulares clonais estáveis que expressam ambos pUBS3000Neo e pK53IgG3 são produzidas através de procedimentos como aqueles bem conhecidos das pessoas especialistas na técnica. As células PER.C6™ são semeadas em DMEM mais FBS a 10% em placas de cultura de tecidos (10 cm de diâmetro) ou frascos T80 com

aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por placa e mantidos durante a noite nas suas condições de cultura normais (concentração de CO₂ a 10% e a 37 °C). No dia seguinte, as transfeções são efetuadas em placas separadas a 37 °C utilizando Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acordo com protocolos convencionais fornecidos pelo fabricante, com 1-2 µg pUBS3000Neo, pK53IgG3 ou ambos. Como um controlo para a eficiência de transfeção, algumas placas são transfetadas com um vetor de controlo de LacZ, embora algumas placas não serão transfetadas e servem como controlos negativos. Após 4-5 horas, as células são lavadas duas vezes com DMEM e realimentadas com meio fresco sem seleção. No dia seguinte, o meio é substituído com meio fresco contendo 500 µg/mL G418. As células são refrescadas a cada 2 ou 3 dias com meio contendo as mesmas concentrações de G418. Cerca de 20-22 dias após a sementeira, é visível um grande número de colónias e de cada transfeção pelo menos 300 são repicadas e cultivadas de placas de 96-poços e/ou 24-poços através de placas de 6-poços para frascos T25. Neste ponto, as células são congelados (pelo menos 1, mas normalmente 4 frascos por colónia subcultivada) e os níveis de produção do anticorpo IgG humano recombinante são determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para todos os sub-tipos de IgG humana. Também, neste ponto G418 é removido do meio de cultura e nunca reaplicado novamente. Para um número representativo de colónias são cultivados maiores volumes para purificar a IgG recombinante humana a partir do sobrenadante condicionado utilizando cromatografia de

afinidade em Proteína A (Hightrap Protein A HP, cat.no. 1-040203) de acordo com procedimentos convencionais, seguindo as recomendações do fabricante (Amersham Biosciences). As imunoglobulinas humanas purificadas a partir dos vários clones são analisadas em SDS-PAGE, Focagem isoelétrica (IEF) e ligação aos alvos EPCAM e CD46 utilizando linhas celulares possuindo uma expressão elevada dessas moléculas tais como células LS174T. Os clones são também pesquisados por PCR no DNA genómico para a presença ou ausência de pUBS3000Neo e pK53IgG3. A identidade dos produtos de PCR é ainda confirmada por sequenciação de DNA. Um número limitado de clones, que são positivos no rastreio para a produção de ambos EPCAM IgG₁ e K53 IgG3, são sujeitos a separação por tamanho de célula única utilizando um separador de células por tamanho ativado por fluorescência (FACS) (Becton Dickinson FACS VANTAGE SE). Alternativamente, as colónias são semeadas a 0,3 células/poço para garantir sobrecrecimento clonal. Populações de células clonais, de aqui em diante designadas como subclones, são refrescadas uma vez por semana com meio fresco. Os sub-clones são cultivados e transferidos a partir de placas de 96-poços via placas de 24- e 6-poços para frascos T25. Neste ponto, os subclones são congelados (pelo menos 1, mas normalmente 4 frascos por subclone) e os níveis de produção do anticorpo IgG humano recombinante são determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para a IgG humana. Para um número representativo de subclones, são cultivados volumes maiores para purificar a fração de IgG humana recombinante a partir do sobrena-

dante condicionado utilizando cromatografia de afinidade em Proteína A (Hightrap Protein A HP, cat.no. 1-040203) de acordo com procedimentos convencionais, seguindo as recomendações do fabricante (Amersham Biosciences). As imunoglobulinas humanas purificadas dos vários clones são analisadas em SDS-PAGE, Focagem isoelétrica (IEF) e ligação aos alvos EPCAM e CD46 utilizando linhas celulares possuindo uma expressão elevada destas moléculas, tais como por exemplo células LS174T, ou agentes tensioativos que expressam estas moléculas. Os sub- clones são também rastreados por PCR sobre DNA genómico para a presença ou ausência de pUBS3000Neo e pK53IgG3. A identidade dos produtos de PCR é ainda confirmada por sequenciação de DNA. Outros métodos tais como transferência de Southern e/ou FISH podem também ser utilizadas para determinar se ambas as construções estão presentes na linha celular clonal. Assim que os subclones clonais estão disponíveis e foram confirmados positivos para a expressão de ambos UBS-54 IgG₁ e K53 IgG3, a presença de K53 e UBS-54 funcional demonstra que é possível produzir uma mistura de IgG's funcionais com diferentes isotipos com a cadeia leve comum numa célula única. A análise da expressão da ligação de anticorpos biespecíficos a ambos EpCAM e CD46 irá revelar em que extensão em que as cadeias pesadas diferentes possuindo um subtipo diferente irão emparelhar, que irá influenciar a quantidade de anticorpos biespecíficos produzidos. Espera-se que se encontrem neste caso, níveis muito baixos ou nenhuns de anticorpos biespecíficos.

Exemplo 8. Seleção de fagos que comportam fragmentos Fv de cadeia simples reconhecendo especificamente a glicoproteína (RVGP) do vírus da raiva utilizando a proteína de fusão RVGP-Ig, e a expressão de misturas de anticorpos contra o vírus da raiva.

Este exemplo descreve a produção de misturas de anticorpos contra o vírus da raiva, como outro alvo potencial. Como um antígeno, A Glicoproteína do Vírus da Raiva (RVGP) é escolhida, mas outros antígenos da raiva podem também ser escolhidos ou incluídos para este propósito. Já foram descritos na técnica outros anticorpos monoclonais que reconhecem RVGP, e foram reconhecidos anticorpos policlonais como também sendo úteis no tratamento de infecções da raiva (*e.g.* EP0402029; EP0445625). Os fragmentos de anticorpo são selecionados utilizando bibliotecas de apresentação de anticorpo em fagos e tecnologia MAbstract™, essencialmente como descrito na patente US 6 265 150 e em WO 98/15833. Todos os procedimentos são efetuadas à temperatura ambiente salvo referência em contrário. A sequência de RVGP está disponível para uma pessoa especialista na técnica, para objetivos de clonagem (*e.g.* Yelverton *et al*, 1983). Uma proteína de fusão RVGP-Ig consistindo em RVGP total fundido geneticamente com os domínios CH2 e CH3 de IgG₁ humana é produzida utilizando o vetor pcDNA3.1 Zeo-CH2-CH3 expresso em PER.C6™ e revestido durante 2 horas a 37 ° na superfície de tubos de plástico Maxisorp™ (Nunc) a uma concentração de 1,25 mg/mL. Os tubos são bloqueados durante 1 h em 2% de

leite magro em pó dissolvido em PBS (MPBS). Simultaneamente, 500 μ l (aproximadamente 10^{13} cfu) de uma biblioteca de exposição em fagos que expressam fragmentos de Fv (scFv's) de cadeia única essencialmente preparados como descrito por De Kruif *et al* (1995a,b) e referências aí incluídas, é adicionado a dois volumes de MPBS a 4%. Nesta experiência, as seleções são efetuadas utilizando frações da biblioteca original construída utilizando apenas uma única espécie do gene da cadeia leve variável (*e.g.* uma biblioteca 'VK1'). Adicionalmente, o soro humano é adicionado até uma concentração final de 15% e o bloqueamento é deixado prosseguir durante 30-60 min. Os tubos revestidos com RVGP-Ig são esvaziados e a biblioteca dos fagos bloqueados é adicionada. O tubo é selado e sujeito a rotação lenta durante 1 h, seguido por 2 h de incubação sem rotação. Os tubos são esvaziados e lavados 10 vezes em PBS contendo 0,1% de Tween-20, seguido por lavagem 5 vezes em PBS. É adicionado 1 ml de glicina-HCL, 0,05 M, pH 2,2, e o tubo é sujeito a rotação lenta durante 10 min. Os fagos eluídos são adicionados a 500 μ l de 1M Tris-HCl pH 7,4. A esta mistura, é adicionado 3,5 ml de cultura de bactérias XL-1 blue em crescimento exponencial. Os tubos são incubados durante 30 min a 37 °C sem agitação. Depois, as bactérias são plaqueadas em placas de 2TY agar contendo ampicilina, tetraciclina e glucose. Após incubação das placas durante a noite a 37 °C, as colónias são raspadas das placas e utilizadas para preparar uma biblioteca de fagos enriquecida, essencialmente como descrito por De Kruif *et al*. (1995a,b). Resumidamente, as bactérias raspa-

das são utilizadas para inocular meio 2TY contendo ampicilina, tetraciclina e glucose e cultivadas a uma temperatura de 37 °C até uma DO_{600nm} de ~0,3. Os fagos auxiliares são adicionados e deixadas infetar as bactérias após o que o meio é alterado para 2TY contendo ampicilina, tetraciclina e canamicina. A incubação é prosseguida durante a noite a 30 °C. No dia seguinte, as bactérias são removidas do meio 2TY por centrifugação após o que os fagos são precipitados utilizando polietilenoglicol 6000/NaCl. Finalmente, os fagos são dissolvidos num volume pequeno de PBS-1% BSA, esterilizados por filtração e utilizados durante a ronda de seleção seguinte. O processo de seleção/re-infeção é efetuado duas vezes. Após a segunda ronda de seleção, são utilizadas colónias individuais de *E. coli* para preparar anticorpos monoclonais em fago. Essencialmente, as colónias individuais são cultivadas até à fase log e infetadas com fagos auxiliares após o que a produção do anticorpo em fago é deixada prosseguir durante a noite. Os sobrenadantes contendo anticorpo em fago são testados em ELISA para a atividade de ligação a placas de 96 poços revestidas com RVGP-Ig humana.

Anticorpos em fago selecionados que são obtidos no rastreio descrito acima, são validados em ELISA quanto à especificidade. Para este propósito, a RVGP-Ig humana é utilizada para revestir placas de ELISA Maxisorp. Após o revestimento, as placas são bloqueadas em 2% MPBS. Os anticorpos em fago selecionados são incubados num volume igual de 4% MPBS. As placas são esvaziada, lavadas uma vez

em PBS, após o que os fagos bloqueados são adicionados. A incubação é deixada prosseguir durante 1 h, as placas são lavadas em PBS 0,1% Tween-20 e os fagos ligados são detetados utilizando um anticorpo anti-M13 conjugado com peroxidase. Como um controlo, o procedimento é efetuado simultaneamente utilizando um anticorpo em fago de controlo dirigido contra tiroglobulina (De Kruif *et al.* 1995a,b), que serve como um controlo negativo.

Os anticorpos em fago que se ligam à RVGP-Ig humana são subsequentemente testados para ligação a IgG do soro humano para excluir a possibilidade de eles reconhecerem a parte Fc da proteína de fusão.

Noutro ensaio os anticorpos em fago são analisados quanto à sua capacidade para se ligarem a células PER.C6™ que expressam RVGP. A este propósito as células PER.C6™ são transfetadas com um plasmídeo transportando uma sequência de cDNA que codifica RVGP ou com o vetor vazio e os transfetantes estáveis são selecionados utilizando técnicas convencionais conhecidos de uma pessoa especialista da técnica (*e.g.* Coligan, J.E. *et al.* (2001) *Current protocols in protein science*, volume I. John Wiley & Sons, Inc. New York). Para análise de citometria de fluxo, os anticorpos em fago são primeiro bloqueados num volume igual de MPBS a 4% durante 15 min a 4 °C antes da coloração das células PER.C6™ transfetadas com RVGP- e controlo. Os fagos bloqueados são adicionados a uma mistura de células PER.C6™ transfetadas não marcadas de

controle e células PER.C6™ transfetadas com RGVP que foram marcadas a verde utilizando um corante lipofílico (PKH67, Sigma). A ligação dos anticorpos em fago às células é visualizada utilizando um anticorpo anti-M13 biotinilado (Santa Cruz Biotechnology) seguido por estreptavidina-ficoeritrina (Caltag). O scFv anti RVGP cora seletivamente o transfetante PER.C6™ RVGP enquanto não se ligam ao transfetante de controle.

Um modo alternativo de rastreio para fagos que comportam fragmentos Fv de cadeia única que reconhecem especificamente a RVGP humana, é através da utilização de células PER.C6™ transfetadas com RVGP. As células PER.C6™ que expressam RVGP ligada à membrana são produzidas como descrito supra. As experiências de seleção de fagos são efetuadas como descrito supra, utilizando estas células como alvo. A fração da biblioteca de fagos compreendida de partículas de scFv-fago utilizando apenas uma única espécie de scFv (500 µl, aproximadamente 10^{13} cfu) é bloqueada com 2 ml de RPMI/10%FCS/1%NHS durante 15' à temperatura ambiente. As células PER.C6™ não transfetadas ($\sim 10 \times 10^6$ células) são adicionadas às células PER.C6-RVGP ($\sim 1,0 \times 10^6$ células). Esta mistura é adicionada à biblioteca de fagos restritos de cadeia leve bloqueados e incubada durante 2,5 h enquanto é sujeito a rotação lenta a 4 °C. Subsequentemente, as células são lavadas duas vezes e foram ressuspensas em 500 µl RPMI/ 10%FCS e incubadas com um anticorpo anti-RVGP de murino (Becton Dickinson) seguido por um anticorpo IgG anti-murganho conjugado com

ficoeritrina (PE) (Calltag) durante 15' em gelo. As células são lavadas uma vez e transferidas para um tubo de 4 ml. A separação de células por tamanho é efetuada num separador de células por tamanho ativado por fluorescência FACSVantage (Becton Dickinson) e as células RVGP (positivas para PE) são separadas por tamanho. As células separadas por tamanho são centrifugadas, o sobrenadante é guardado e os fagos ligados são eluídos das células ressuspensando as células em 500 µl de Glicina a 50 mM pH 2,2 seguido por incubação durante 5 min. à temperatura ambiente. A mistura é neutralizada com 250 µl de Tris-HCl a 1 M pH 7,4 e adicionada ao sobrenadante recuperado. Coletivamente estes fagos são utilizados para preparar uma biblioteca de fagos enriquecida como descrito acima. O processo de seleção/re-infeção é efetuado duas vezes. Após a segunda ronda de seleção, os anticorpos monoclonais em fago são preparados e testados para ligação às células RVGP-PER.C6™ e às células PER.C6™ não transfectadas como descrito supra. Os fagos que são positivos em células não transfectadas com RVGP são subsequentemente testados para ligação à proteína de fusão RVGP-IgG em ELISA como descrito supra.

Os fragmentos de scFv selecionados são clonados num formato de IgG₁ humana, de acordo com métodos conhecidos na técnica (*e.g.* Boel *et al*, 2000). A este propósito, o fragmento VL partilhado pelos scFv selecionados é amplificado por PCR utilizando oligos que adicionam sítios de restrição apropriados. Um processo semelhante é utilizado para os genes VH. Assim, os genes modificados são

clonados em pCRU-K01 de expressão (depósito ECACC 03041601), que resulta em vetores de expressão que codificam uma cadeia pesada completa de huIgG₁ e um gene de cadeia leve humana completa possuindo a mesma especificidade que o clone de fago original. Através deste método, são clonadas três cadeias pesadas diferentes em vetores de expressão separados, enquanto apenas um dos vetores necessita de compreender a sequência da cadeia leve comum. Estes vetores de expressão são provisoriamente designados pCRU-RVGP-1, pCU-RVGP-2, e pCRU-RVGP-3. Alternativamente, estes três vetores podem não possuir DNA que codifica a região V_L, que pode ser então codificada num quarto vetor de expressão separado que não codifica uma cadeia pesada. É também possível possuir sequências de V_L presentes em todos os três ou dois dos três vetores compreendendo as diferentes sequências de V_H. São produzidas linhas celulares derivadas de PER.C6™ estáveis, de acordo com métodos conhecidos das pessoas especialistas na técnica (ver *e.g.* WO 00/63403), as linhas celulares que expressam anticorpos codificados pela informação genética em pCRU-RVGP-1, pCRURVGP-2 ou pCRU-RVGP-3 e uma linha celular que expressa anticorpos codificada por todos os três plasmídeos. Deste modo, as células PER.C6™ são semeadas em DMEM mais FBS a 10% em placas de cultura de tecidos (10 cm de diâmetro) ou frascos T80 com aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por placa e mantido durante a noite nas suas condições de cultura normais (concentração de CO₂ a 10% e a 37 °C). No dia seguinte, as transfeções são efetuadas em placas separadas a 37 °C utilizando Lipofectamina

(Invitrogen Life Technologies) de acordo com protocolos convencionais fornecidos pelo fabricante, com 1-2 μg pCRU-RVGP-1, 1-2 μg pCRURVGP-2, 1-2 μg pCRU-RVGP-3 ou 1 μg de uma mistura de pCRU-RVGP-1, pCRU-RVGP-2 e pCRU-RVGP-3. Como um controlo para a eficiência de transfeção, algumas placas são transfetadas com um vetor de controlo de LacZ, enquanto algumas placas não serão transfetadas e servem como controlos negativos. Após 4 a 5 horas, as células são lavadas duas vezes com DMEM e realimentadas com meio fresco sem seleção. No dia seguinte, os meios são substituídos com meio fresco contendo 500 $\mu\text{g/mL}$ de G418. As células são refrescadas a cada 2 ou 3 dias com meio contendo as mesmas concentrações de G418. Cerca de 20-22 dias após a sementeira, são visíveis um grande número de colónias e de cada transfeção pelo menos 300 são repicadas e cultivadas através de placas de 96 poços e/ou 24 poços através de placas de 6 poços para frascos T25. Neste ponto, as células são congeladas (pelo menos 1, mas normalmente 4 frascos por colónia subcultivada) e os níveis de produção de anticorpo IgG humano recombinante são determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para IgG₁ humana (descritos na WO 00/63403). Também, neste ponto G418 é removido do meio de cultura e nunca reaplicado novamente. Para um número representativo de colónias serão cultivados volumes maiores para purificar a fração de IgG₁ recombinante humana a partir do sobrenadante condicionado utilizando cromatografia de afinidade em Proteína A de acordo com procedimentos convencionais. A IgG₁ humana purificada a partir de vários clones é analisada em SDS-PAGE, Focagem

isoelétrica (IEF) e ligação a RVGP alvo utilizando um PER.C6-transfetante de RVGP descrito acima. As colônias obtidas a partir da co-transfecção com pCRU-RVGP-1, pCRU-RVGP-2 e pCRU-RVGP-3 são rastreadas por PCR em DNA genômico para a presença ou ausência de cada uma das três construções. A identidade dos produtos de PCR é ainda confirmada por sequenciação de DNA. Um número limitado de colônias, que deram positivo no rastreio para a produção de cada uma das três especificidades de ligação (por PCR ao nível do DNA assim como em ensaios de ligação especificada contra RVGP), são sujeitos a separação por tamanho de células únicas utilizando um separador de células por tamanho ativado por fluorescência (FACS) (Becton & Dickinson FACS VANTAGE SE). Alternativamente, as colônias são semeadas a 0,3 células/poço para garantir o sobrecrecimento clonal. As populações de células clonais, de aqui em diante designadas como subclones, são refrescadas uma vez por semana com meio fresco. Os subclones são cultivados e transferidos através de placas de 96-poços para placas de 24- e 6-poços e para frascos T25. Neste ponto, os subclones são congelados (pelo menos 1, mas normalmente 4 frascos por subclone) e os níveis de produção de anticorpo IgG₁ recombinante humano são determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para uma IgG₁ humana. Para um número representativo de subclones, são cultivados volumes maiores para purificar a fração de IgG₁ recombinante humana a partir do sobrenadante condicionado utilizando cromatografia de afinidade em Proteína A de acordo com procedimentos convencionais. Uma IgG₁ humana

purificada a partir dos vários subclones é subsequentemente analisada como descrito acima para a IgG₁ humana obtida a partir de clones parentais, i.e. por SDS-PAGE, Focagem isoelétrica (IEF) e ligação a RVGP alvo. Os sub-clones são também pesquisados por PCR sobre DNA genómico para a presença ou ausência de cada uma das três construções pCRU-RVGP-1, pCRURVGP-2 e pCRU-RVGP-3. A identidade dos produtos de PCR é ainda confirmada por sequenciação de DNA. Outros métodos tais como transferência de Southern e/ou FISH podem também ser utilizadas para determinar se cada uma das três construções estão presentes na linha de células clona. Os sub-clones que demonstrem ser transgênicos para cada uma das três construções são transferidas para cultura durante um período extenso para determinar se a presença dos transgenes é estável e se a expressão da mistura de anticorpo permanece a mesma, não apenas em termos de níveis de expressão, mas também para a proporção entre as várias isoformas de anticorpo que são secretados da célula. Deste modo, a cultura do subclone é mantida durante pelo menos 25 vezes de duplicação da população quer como uma cultura aderente ou como uma cultura de suspensão. A cada 4-6 duplicações da população, é efetuado um teste de produção específica utilizando a ELISA específica para uma IgG humana e são cultivados volumes maiores para obter o sedimento de células e o sobrenadante. O sedimento de células é utilizado para avaliar a presença das três construções no DNA genómico, quer através de PCR, transferência de Southern e/ou FISH. O sobrenadante é utilizado para purificar a fração de IgG₁ recombinante

humana como descrito supra. A IgG₁ humana purificada obtida nas várias duplicações da população é analisada como descrito, *i.e.* por SDS-PAGE, focagem isoelétrica (IEF) e ligação a RVGP alvo. A eficácia das misturas de anticorpos contra a raiva é testada em ensaios de cultura de células *in vitro* em que a diminuição na dispersão do vírus da raiva é medida, assim como em modelos animais *in vivo* infectados por raiva. Esses modelos são conhecidos das pessoas especialistas na técnica, e são *e.g.* descritos em EP0402029.

Exemplo 9. Produção de uma mistura de anticorpos com uma cadeia leve comum e três diferentes regiões variáveis da cadeia pesada numa única célula.

Um método para produção de uma mistura de anticorpos de acordo com a invenção, utilizando a expressão numa célula hospedeira recombinante de uma cadeia leve simples e três cadeias pesadas diferentes capazes de emparelhar com a cadeia leve simples para formar anticorpos funcionais, é aqui exemplificado e é esquematicamente apresentado na Fig. 6. As IgG humanas UBS54 e K53 contra a molécula de adesão homotípica EP-CAM (Huls *et al.*, 1999) e um cofator da proteína CD46 de membrana (WO 02/18948), respetivamente, são descritos no Exemplo 1. Outro clone que foi identificado para se ligar ao cofator da proteína CD46 foi o clone 02-237 (sequência de V_H proporcionada na Fig. 12). A sequenciação de DNA deste clone revelou que continha

a mesma cadeia leve de UBS54 e K53, mas uma sequência de cadeia pesada variável única (ver alinhamento na Fig. 3). Como resultado, a CDR3 da cadeia pesada de 02-237 difere em 4 posições da de K53 (ver alinhamento na Fig. 13). As sequências de cadeia pesada e leve variáveis do fago 02-237 foram clonadas no plasmídeo de expressão pCRU-K01, (pCRU-K01 é depositado na European Collection of Cell Cultures (ECACC) sob o número 03041601), que contém os domínios constantes da cadeia pesada e leve para um anticorpo IgG1. O plasmídeo resultante foi designado pgG102-237. Devido à estratégia de clonagem seguida, o terminal N resultante da cadeia leve de 02-237 como codificado pelo pgG102-237 diferiam ligeiramente do terminal N de UBS54 e K53 conforme presente em pUBS3000Neo, pCD46_3000 (Neo), respetivamente (Fig. 3). O plasmídeo pgG102-237 foi transientemente produzido em células 293 (T) humanas ou estavelmente em células PER.C6. Parecia que a IgG 02-237 purificada tinha uma muito maior afinidade para o CD46 purificado (Fig. 14) do que a IgG K53, *i.e.* a afinidade aumentou de $9,1 \times 10^{-7}$ M para $2,2 \times 10^{-8}$ M para K53 e 02-237, respetivamente. Também, o 02-237 se ligou muito melhor a CD46 em células de carcinoma do cólon humanas LS174T do que K53 (Fig. 15).

As linhas celulares derivadas de PER.C6™ estáveis que expressam uma combinação dos plasmídeos pUBS3000Neo, pCD46_3000 (Neo) e pgG102-237 que codificam IgG 02-237 humana foram produzidas de acordo com os métodos conhecidos como tais das pessoas especialistas da técnica (ver *e.g.* WO

00/63403). Deste modo, as células PER.C6™ foram semeadas em DMEM mais 10% de FBS em placas de cultura de tecidos (10 cm de diâmetro) com aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por placa e mantidas durante a noite sob as suas normais condições de cultura (concentração de 10% de CO₂ e 37 °C). No dia seguinte, foram efetuadas transfeções em placas separadas a 37 °C utilizando Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acordo com protocolos convencionais proporcionados pelo fabricante, com 2 µg de uma mistura equimolar de pUBS3000Neo, pCD46_3000(Neo) e pgG102-237. Como controlo negativo para a seleção, poucas placas não foram transfetadas. Após 4 a 5 horas, as células foram lavadas duas vezes com DMEM e realimentadas com meio fresco sem seleção. No dia seguinte, o meio foi substituído com meio fresco contendo 500 µg/mL de G418. As células foram refrescadas em cada 2 ou 3 dias com meio contendo as mesmas concentrações de G418. Cerca de 20-22 dias após sementeira, um grande número de colónias foi visível e cerca de 300 foram picadas e cultivadas via placas de 96-poços e/ou 24-poços via 6-poços para frascos T25. Durante a subcultura, os níveis de produção de anticorpo IgG humano recombinante foram determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para a IgG1 humana (descritos na WO 00/63403). Cerca de 25% de todas as colónias parecem ser positivas neste ensaio altamente específico. Os níveis de produção medidos neste estágio foram comparáveis aos níveis quando uma única IgG é expressa em células PER.C6™ (expressão de uma única IgG descrita na Jones *et al.*, 2003). É importante reforçar que estes elevados níveis de expressão foram

obtidos sem quaisquer métodos para a amplificação do transgene e que estes podem ocorrer com um baixo número de cópias do transgene. As 30 colónias melhores produtoras foram congeladas em frascos e os 19 clones maiores produtores foram selecionados para purificação da IgG (Tabela 1). Estes foram subcultivados em frascos T80 e a IgG humana de cada clone foi subsequentemente purificada utilizando cromatografia de afinidade em Proteína A. Deste modo, 15-25 mL de meio condicionado foram aplicados numa coluna de 5 mL de Proteína A FF Sepharose (Amersham Biosciences). A coluna foi lavada com 4 mM de salino tamponado com fosfato, pH 7,4 (PBS) antes da eluição com 0,1 M de citrato a pH 3,0. A fração eluída foi subsequentemente dessalinizada numa coluna Sephadex G25 Fine HiPrep Desalting (Amersham Biotech) para PBS. A concentração da fração IgG purificada foi determinada medição da absorvência a 280 nm utilizando um coeficiente de 1,4 para uma solução a 0,1% (p/v) (Tabela 1). As amostras de IgG purificada foram analisadas numa SDS-PAGE não reduzida e reduzida e IEF. A SDS-PAGE não reduzida (Fig. 16A) mostrou que todas as amostras de IgG migraram de modo comparável ao controlo K53 ou 02-237, como uma molécula de IgG montada, intacta de aproximadamente 150 kDa. Na SDS-PAGE reduzida (Fig. 16B), as amostras da IgG migraram como cadeias pesadas e leves de cerca 50 e 25 kDa, respetivamente, comparáveis à cadeia pesada e leve do controlo K53 ou 02-237. Na IEF, as frações de IgG purificada foram primeiro comparadas com uma mistura de iguais quantidades de K53, UBS54 e 02-237 (Fig. 17).

Claramente, algumas das amostras continham isoformas com um único perfil de pI, quando comparado com a mistura contendo K53, UBS54 e 02-237 purificadas. Algumas das principais isoformas únicas possuem um pI entre o pI de K53 e 02-237 por um lado e UBS54 por outro lado. Isto é também antecipado com base no pI teórico quando calculado com a ferramenta ProtParam proporcionada na página inicial de Expasy (<http://www.expasy.ch>; Appel et al., 1994). K53, 02-237 e UBS54 têm um pI teórico de 8,24, 8,36 e 7,65, respectivamente, enquanto uma isoforma que representa um heterodímero de uma cadeia pesada de UBS54 e uma cadeia pesada de K53 tem um pI teórico de 8,01. A montagem de um destes heterodímeros pode apenas ocorrer quando uma única célula traduz a cadeia pesada de K53 e a cadeia pesada de UBS54 e monta isto numa molécula de IgG de comprimento total em conjunto com a cadeia leve comum. Deste modo, estes resultados sugerem que certos clones expressam pelo menos dois anticorpos funcionais. Para confirmar a identidade única de algumas das isoformas, as amostras dos clones mais interessantes foram aplicadas em paralelo com K53, UBS54 e 02-237, isoladas ou numa mistura (Fig. 18). Isto mostrou ainda que alguns clones expressavam pelo menos dois anticorpos (241, 282, 361). Além disso, proporcionou evidência que alguns clones expressam três anticorpos funcionais (280 e 402). Para confirmar que os clones expressavam misturas de IgG compreendendo todas as três cadeias pesadas, foi utilizado o mapeamento de péptidos (Garnick, 1992; Gelpi, 1995) para analisar a fração IgG policlonal. Empregou-se previamente o mapeamento de

péptidos para recuperar 99% da sequência da proteína de K53. Com base na sequência da proteína proporcionada na Fig. 12, a massa dos péptidos trípticos teóricos de K53, UBS54 e 02-237 foi calculada (Tabela II e III). Poucos péptidos únicos para cada IgG, puderam ser identificados, *i.e.* por exemplo, os péptidos CDR3 para K53, 02-237 e UBS54 com um P_M de 2116,05, 2057,99 e 2307,15 Da, respectivamente. A seguir, uma digestão tríptica de Poly1-280 foi preparada e isto foi analisado utilizando LC-MS (Fig. 19). Os péptidos com P_M de 2116, 2057 e 2308 Da, que representam os péptidos CDR3 únicos de K53, 02-237 e UBS54, respectivamente, foram detetados. A sequência de aminoácidos precisa destes péptidos (como listado na Tabela III) foi confirmada por análise MS-MS (Tabelas IV, V e VI). Confirmou-se também a presença dos dois péptidos únicos N-terminais da cadeia leve com P_M de 2580 e 2554 Da, respectivamente. Os dados de mapeamento de péptidos mostraram inequivocamente que uma mistura de anticorpos compreendendo uma cadeia leve comum e três cadeias pesadas diferentes foi expressa pelo clone Poly1-280 de PER.C6™. Também os clones 055, 241 e 402 foram pesquisados por mapeamento de péptidos os clones 241 e 402 foram confirmados como positivos para todas as três sequências de cadeia pesada, enquanto o clone 055 mostrou apenas a expressão das cadeias pesadas de K53 e 02-237, e não de UBS54. Isto confirma a pesquisa de IEF (Fig. 18), em que nenhuma banda relacionada com UBS54 foi observada na amostra 055. Poly1-280 foi analisado por BIACORE para a ligação a CD46 (Fig. 20). A afinidade de poly1-280 para CD46 foi de $2,1 \times 10^{-8}$ M, o que mostra que a mistura de IgG

contém moléculas de ligação a CD46 possuindo a mesma afinidade da IgG 02-237 isolada. Tomadas em conjunto, esta experiência mostra que é possível expressar uma mistura de moléculas IgG funcionais compreendendo três cadeias pesadas únicas numa única célula e que a seguir aos homodímeros, são também formados heterodímeros consistindo em duas especificidades de ligação. Além disso, a frequência de clones que expressam três cadeias pesadas diferentes sugere que pode também ser possível obter clones que expressam pelo menos 4, 5 ou mais cadeias pesadas, utilizando o mesmo procedimento. No caso de ser difícil obter clones que expressam números elevados de cadeias pesadas, um clone que expressa pelo menos 3 cadeias pesadas de acordo com a invenção pode ser utilizado para introduzir mais cadeias pesadas numa ronda separada de transfeção, por exemplo utilizando um diferente marcador de seleção.

A seguir, foi demonstrado que uma única célula é capaz de produzir uma mistura de mais do que duas IgGs funcionais humanas. Deste modo, os clones 241, 280 e 402, que foram pesquisados como positivos para a produção de cada uma das três IgGs, por IEF e MS, foram sujeitos a diluição limitante, *i.e.* semeadas a 0,3 células/poço em placa de 96 poços para garantir o sobrecrecimento clonal. As populações de células clonais, daqui em diante designadas como subclones, foram refrescadas uma vez por semana com meio fresco. Os subclones foram cultivados e transferidos de placas de 96 poços via 24-e 6-poços, para frascos T25, T80 e T175. No estágio de T80, os subclones

foram congelados. Os níveis de produção de anticorpo IgG1 recombinante humano foram determinados no sobrenadante utilizando uma ELISA específica para a IgG1 humana. Para cada clone parental, foram selecionados e cultivados 3 subclones em alguns frascos T175 para obter meio condicionado suficiente para a purificação utilizando cromatografia de afinidade em Proteína A como descrito acima. Uma IgG1 humana purificada a partir dos subclones foi subsequentemente analisada como descrito acima para a IgG1 humana obtida a partir do clone parental, por focagem Isoelétrica (IEF). O resultado é apresentado na Fig. 21. Os subclones do clone poly1-241 têm cada um o mesmo padrão, mas diferem do clone parental por parecer que lhes falta algumas bandas. Os subclones do clone poly 1-280 parecem diferir todos uns dos outros e do clone parental. Os padrões obtidos por IEF para os subclones do clone parental poly 1-402 são idênticos para todos os três subclones e o clone parental. A partir destes dados pode ser concluído que o clone 402 está a produzir de forma estável uma mistura de anticorpos. Isto demonstra que é factível produzir uma mistura de anticorpos de acordo com a invenção a partir de um único clone celular. Os clones sofreram cerca de 25 duplicações da população (divisões de células) a partir do procedimento da transfeção até à primeira análise (apresentado na Fig. 18) sob pressão de seleção, e a partir desse ponto em que sofreram ainda cerca 30 duplicações da população durante o procedimento de subclonagem na ausência de pressão de seleção, antes do material analisado na Fig. 21 ser recolhido. Deste modo, a

produção de uma mistura de anticorpos a partir de um clone de uma única célula pode ser estável por mais de pelo menos 30 gerações.

A IgG1 purificada a partir dos clones parentais 241, 280 e 402, e subclones, foi também analisada para a reatividade da ligação contra os antigénios CD46-e EpCAM. Para este fim, o cDNA de EpCAM, CD46 e antigénio de controlo CD38 foram clonados em vetores de expressão pcDNA (Invitrogen). Estes vetores foram transfetados em células CHO (dhfr-) utilizando Eugene (Roche) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. As células foram cultivadas em meio Iscove contendo 10% de FBS e suplemento HT (Gibco). Após cultura durante 2 dias, as células foram recolhidas por tripsinização e suspensas em PBS-1% de BSA (PBSB) para utilização em análise FACS. A IgG1 purificada dos clones produtores das misturas de anticorpos e amostras de IgG1 de controlo de anti-GBSIII, um anticorpo anti-CD72 (02-004), assim como os anticorpos anti-EpCAM a partir do clone UBS54 e anti-CD46 dos clones K53 e 02-237 foram diluídos em PBSB para uma concentração de 20 µg de IgG1/mL. Foram adicionados 20 mL de cada a 200 000 células transfetadas e incubadas em gelo durante 1 hora. Depois, as células foram lavadas uma vez em PBSB arrefecido em gelo. A IgG ligada foi então detetada utilizando incubação com anti-IgG humana de cabra marcada com biotina seguida por estreptavidina-PE. Após um passo final de lavagem, as células foram suspensas em PBSB contendo 1 µg/mL de iodeto

de propídeo. As amostras foram analisadas num FACS (FACSVantage, Becton Dickinson). As células vivas foram retiradas e as Intensidades de Fluorescência Médias (MFI) foram calculadas a partir dos gráficos de FACS. Os resultados são representados na Fig. 22. Como esperado, UBS54 ligou-se seletivamente a células transfetadas com EpCAM e 02-237 e K53 ligaram-se seletivamente a transfectantes CD46, enquanto os anticorpos não relacionados não se ligaram a estes transfectantes. Os resultados demonstram que as atividades de ligação contra EpCAM e CD46 estavam presentes nas preparações de IgG1 purificada da maioria dos clones que expressam uma mistura de anticorpos de acordo com a invenção, demonstrando que uma mistura de anticorpos funcionais foi produzida por subclones que sofreram mais do que 30 divisões de células, e que resultam de uma única célula. Os padrões de ligação do subclone 280-015 a CD46 e EpCAM foram semelhantes às do clone parental poly 1-280, em contraste com os outros clones. Deve ser dito que o aspeto quantitativo deste ensaio não é completamente claro. A pesquisa de rotina, *e.g.* através de um teste funcional, pode ser utilizada para encontrar um clone com o perfil de expressão desejado. Os aspetos quantitativos podem também estar incluídos nestas pesquisas. Esta pesquisa permite a identificação dos clones desejados, que expressam a mistura de anticorpos com uma determinada funcionalidade numa forma quantitativamente estável.

Tabela I. Visão global dos clones utilizados para purificação de IgG.

Clone Polyl-	Pesquisa por ELISA ($\mu\text{g/mL}$)	Purificação	
		Conc. no meio fresco ($\mu\text{g/mL}$)	Purificado (mg)
209	6,1	98	1,37
233	10,0	53	0,75
234	8,0	51	0,71
241	6,6	91	1,42
250	12,5	117	2,10
280	6,3	36	0,80
282	8,5	67	1,48
289	8,2	33	0,64
304	7,2	161	3,91
320	6,3	43	0,83
322	15,2	168	3,27
340	6,0	109	2,64
361	10,4	71	1,73
379	9,5	78	1,75
402	39,9	135	3,14
022	16,2	83	1,69
040	7,8	67	1,43
048	6,5	43	0,94
055	11	55	1,04

Tabela II. Péptidos trípticos dos domínios variáveis da cadeia leve de K53/UBS54 e 02-237.

Péptido	Primeiro AA ¹⁾	Último AA	Monoisotópico P _M (Da) K53/UBS54	Monoisotópico P _M (Da) 02-237
L1	1	24	2580,31 (2)	2554,28 (2)
L2	25	59	4039,02	4039,02
L3	60	66	700,35	700,35
L4	67	79	1302,61	1302,61
L5	80	82	374,23	374,23
L6	83	107	2810,29 (2)	2810,29 (2)
L7	108	111	487,30	487,30
L8	112	112	174,11	174,11

1) AA, aminoácido
2) Um resíduo de Cisteína alquilado

Tabela III. Péptidos trípticos de domínios variáveis de cadeias pesadas de K53, 02-237 e UBS54.

K53				02-237				UBS54			
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
H1	1	12	1267,68	H1	1	12	1267,68	H1	1	12	1267,68
H2	13	19	685,41	H2	13	19	685,41	H2	13	19	729,41
H3	20	23	492,24	H3	20	23	492,24	H3	20	23	492,24
H4	24	38	1693,81	H4	24	38	1693,81	H4	24	38	1587,77
H5	39	63	2783,28	H5	39	63	2783,28	H5	39	63	2646,33
H6	64	67	472,28	H6	64	67	472,28	H6	64	67	506,26
H7	68	84	1906,87	H7	68	84	1906,87	H7	68	87	2174,04
H8	85	87	374,23	H8	85	87	374,23	-	-	-	-
H9	88	98	1319,55	H9	88	98	1319,55	H8	88	98	1333,56
H10	99	102	493,21	H10	99	102	475,25	H9	99	119	2307,15
H11	103	122	2116,05	H11	103	122	2057,99	-	-	-	-

Chave:

A: péptido

B: primeiro aminoácido

C: último aminoácido

D: P_n monoisotópico (Da)

Notas:

- 1) para H1, o resíduo de aminoácido 1 é um ácido piroglutâmico
- 2) péptidos H3 e H9 de K53 e 02-237, e péptidos H3 e H8 de UBS54 contêm um resíduo de cisteína alquilada
- 3) Péptidos únicos que podem ser utilizadas para confirmar a presença das respectivas IgG's são indicadas em **negrito** e *itálico*

Tabela IV. Dados MS/MS do péptido CDR3 (H11) de K53, obtidos por *dissociação induzida por colisão* duplamente carregada m/z 1059,06.

Ião	m/z		Ião	m/z
Y" ₁	147,12		B1	n.d.
Y" ₂	248,18		B2	157,10
Y" ₃	<u>335,21 (1)</u>		B3	304,18
Y" ₄	406,25		B4	419,22
Y" ₅	507,30		B5	<u>582,31</u>
Y" ₆	<u>594,33</u>		B6	768,38
Y" ₇	693,40		B7	825,39
Y" ₈	794,46		B8	953,43
Y" ₉	<u>893,54</u>		B9	n.d.
Y" ₁₀	1006,63		B10	n.d.
Y" ₁₁	1107,67		B11	1224,65
Y" ₁₂	<u>1164,68</u>		B12	1323,68

(continuação)

Ião	m/z		Ião	m/z
Y" ₁₃	1292,81		B13	1424,79
Y" ₁₄	1349,77		B14	1523,86
Y" ₁₅	1535,85		B15	n.d.
Y" ₁₆	1698,95		B16	n.d.
Y" ₁₇	1813,95		B17	1782,96
Y" ₁₈	1960,97		B18	n.d.
Y" ₁₉	n.d. (2)		B19	n.d.
¹ Os valores m/z sublinhados são picos principais no espectro MS/MS. ² n.d. é não detetado.				

Tabela V. Dados MS/MS do péptido CDR3 (H11) de 02-237, obtidos por *dissociação induzida por colisão* duplamente carregada m/z 1030,02.

Ião	m/z		Ião	m/z
Y" ₁	147,12		B1	n.d.
Y" ₂	248,18		B2	189,09
Y" ₃	335,20		B3	n.d.
Y" ₄	406,24		B4	451,22
Y" ₅	493,30		B5	n.d.
Y" ₆	580,32		B6	n.d.
Y" ₇	679,40		B7	n.d.
Y" ₈	780,44		B8	n.d.
Y" ₉	879,53		B9	n.d.
Y" ₁₀	992,60		B10	n.d.

(continuação)

Ião	m/z		Ião	m/z
Y" ₁₁	1093,65		B11	n.d.
Y" ₁₂	1150,67		B12	n.d.
Y" ₁₃	1278,80		B13	n.d.
Y" ₁₄	1335,80		B14	n.d.
Y" ₁₅	1521,83		B15	n.d.
Y" ₁₆	1608,90		B16	n.d.
Y" ₁₇	1724,00		B17	n.d.
Y" ₁₈	n.d.		B18	n.d.
Y" ₁₉	n.d.		B19	n.d.
¹ Os valores m/z sublinhados são picos principais no espectro MS/MS. ² n.d. é não detetado.				

Tabela VI. Dados MS/MS do péptido CDR3 (H9) de UBS54, obtidos por *dissociação induzida por colisão* triplamente carregada m/z 770,09.

Ião	m/z		Ião	m/z
Y" ₁	n.d.		B1	n.d.
Y" ₂	248,17		B2	213,17
Y" ₃	<u>335,20</u>		B3	360,16
Y" ₄	406,25		B4	473,27
Y" ₅	<u>507,30</u>		B5	610,32
Y" ₆	<u>594,33</u>		B6	773,41
Y" ₇	<u>693,42</u>		B7	959,48
Y" ₈	<u>794,45</u>		B8	<u>1016,50</u>

(continuação)

Ião	m/z		Ião	m/z
Y" ₉	<u>893,53</u>		B9	<u>1144,57</u>
Y" ₁₀	<u>1006,64</u>		B10	<u>1201,59</u>
Y" ₁₁	1107,67		B11	1302,68
Y" ₁₂	1164,68		B12	1415,72
Y" ₁₃	n.d.		B13	1514,78
Y" ₁₄	n.d.		B14	n.d.
Y" ₁₅	n.d.		B15	n.d.
Y" ₁₆	n.d.		B16	n.d.
Y" ₁₇	n.d.		B17	n.d.
Y" ₁₈	n.d.		B18	n.d.
Y" ₁₉	n.d.		B19	n.d.
Y" ₂₀	n.d.		B20	n.d.
¹ Os valores m/z sublinhados são picos principais no espectro MS/MS. ² n.d. é não detetado.				

Referências

Appel RD, Bairoch A, Hochstrasser DF. 1994. A new production of informaton retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* 19: 258-260.

Bendig MM. 1988. The production of foreign proteins in mammal cells. *Genet Eng* 7: 91-127.

Boel E, Verlaan S, Poppelier MJ, Westerdal NA, Van Strijp

JA, Logtenberg T. 2000. Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv fragments de antibodies. *J Immunol Methods* 239:153-166.

Brink MF, Bishop MD, Pieper FR. 2000. Developing efficient strategies for the production of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology* 53: 139-148.

Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66.

Casellas R, Shih TA, Kleinewietfeld M, Rakoniak J, Nemazee D, Rajewski K, Nussenzweig MC. 2001. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* 291: 1541-1544.

Cockett MI, Bebbington CR, Yarranton GT. 1990. High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamate synthetase gene amplification. *Bio/technology* 8: 662-667.

De Kruif J, Terstappen L, Boel E e Logtenberg T (1995a) Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3938

De Kruif J, Boel E e Logtenberg T (1995b) Selection and

application of human unique chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J Mol Biol* 248:97

Dinnyes A, De Sousa P, King T, Wilmut I. 2002. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. *Cloning Stem Cells* 4: 81-90.

Flavell DJ, Noss A, Pulford KA, Ling N, Flavell SU. 1997. Systemic therapy with 3BIT, a triple combination cocktail of anti-CD19, -CD22, and -CD38-saporin immunotoxins, is curative of human B-cell lymphoma in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 57: 4824-4829.

Fishwild DM, O'Donnell SL, Bengoechea T, Hudson DV, Harding F, Bernhard SL, Jones D, Kay RM, Higgins KM, Schramm SR, Lonberg N. 1996. High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol*.14: 845-51.

Garnick RL. 1992. Peptide mapping for detecting variants in protein products. *Develop. Biol. Standard* 76: 117-130.

Gelpi E. 1995. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography A* 703: 59-80.

Ghetie M-A, Podar EM, Ilgen A, Gordon BE, Uhr JW, Vitetta, ES. 1997. Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce

growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7509-7514.

Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* 18: 1151-1155.

Gorman C, Bullock C. 2000. Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol* 11: 455-460.

Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*. 342: 76-78.

Huls, G. A., Heijnen, I. A., Cuomo, M. E., Koningsberger, J. C., Wiegman, L., Boel, E., van der Vuurst de Vries, A. R., Loyson, S. A., Helfrich, W., van Berge Henegouwen, G. P., van Meijer, M., de Kruif, J. & Logtenberg, T. 1999. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnol* 17: 276-281.

Jespers LS, Roberts A, Mahler SM, Winter G, Hoogenboom HR. 1994. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (N Y)* 12: 899-903.

Jones, D., Kroos, N., Anema, R., Van Montfort, B., Vooys, A., Van Der Kraats, S., Van Der Helm, E., Smits, S., Schouten, J., Brouwer, K., Lagerwerf, F., Van Berkel, P.,

Opstelten, D-J., Logtenberg, T., Bout, A. (2003). Highlevel expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6™. *Biotechnol Prog.* 19, 163-168.

Kim SJ, Kim Ns, Ryu CJ, Hong HJ, Lee GM. 1998. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng* 58: 73-84.

Kohler G e Millstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420.

Larrick JW, Thomas DW. 2001. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 411-418.

Massengale WT, McBurney E, Gurtler J. 2002. CD20-negative relapse of cutaneous B-cell lymphoma after anti-CD20 monoclonal antibody therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* 46: 441-443.

Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, Gallo ML, Louie DM, Lee DV, Erickson KL, Luna

J, Roy CM, Abderrahim H, Kirschenbaum F, Noguchi M, Smith DH, Fukushima A, Hales JF, Klapholz S, Finer MH, Davis CG, Zsebo KM, Jakobovits A. 1997. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet.* 15: 146-56.

Merchant AM, Zhu Z, Yuan JQ, Goddard A, Adams CW, Presta LG, Carter P. 1998. An efficient route to human bispecific IgG. *Nat. Biotech.* 16: 677-681.

Nemazee D. 2000. Receptor editing in B cells. *Adv. Immunol.* 74: 89-126.

Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, Winter G. 1994. Antibody fragments from a "single pot" phage display library as immunological reagents. *EMBO J.* 13: 692-698.

Nowakowski A, Wang C, Powers DB, Amersdorfer P, Smith TJ, Montgomery VA, Sheridan R, Blake R, Smith LA, Marks JD. 2002. Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11346-11350.

Patel AK, Boyd PN. 1995. An improved assay for antibody dependent cellular cytotoxicity based on time resolved fluorometry. *Journal of Immunological Methods* 184: 29-38.

Peeters K, De Wilde C, De Jaeger G, Angenon G, Depicker A. 2001. Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine* 19: 2756-2761.

Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM. 1999. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Methods*. 231: 147-157.

Radic MC, Mascelli MA, Shan H, Weigert M. 1991. Ig H and L chain contributions to autoimmune specificities. *J. Immunol*. 146: 176-182.

Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*. 278: 2130-2133.

Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM. 2001. Introduction: bispecific antibodies. *J Immunol Methods*. 248:1-6.

Shields, RL, Namenuk AK, Hong K, Gloria Meng Y, Rae J, Biggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA e Presta LG. 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγRgR. *J Biol Chem* 276: 6591-6604.

Spiridon CI, Ghetie MA, Uhr J, Marches R, Li JL, Shen GL, Vitetta ES. 2002. Targeting multiple her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res*. 8: 1720-1730.

Van der Vuurst de Vries A, Logtenberg T. 1999. Dissecting the human peripheral B-cell compartment with phage display-derived antibodies. *Immunology* 98: 55-62.

Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS. 1996. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotech.* 14: 309-314.

Wilmot I, Clark AJ. 1991. Basic techniques for transgenesis. *J Reprod Fertil Suppl* 43: 265-275.

Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.

Wilson TJ, Kola I. 2001. The LoxP/CRE system and genome modification. *Methods Mol Biol.* 158:83-94.

Yelverton E, Norton S, Obijeski JF, Goeddel DV. 1983. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science* 219: 614-620.

Yoo EM, Coloma MJ, Trinh KR, Nguyen TQ, Vuong LU, Morrison SL, Chintalacharuvu KR. 1999. Structural requirements for polymeric immunoglobulin assembly and association with J chain. *J Biol Chem.* 274: 33771-33777

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> CRUCELL HOLLAND B.V.

<120> Produção recombinante de misturas de anticorpos

<130> 0079 WO 00 ORD

<160> 18

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> sequência VL de UBS54 (anti-EpCAM) e K53 (anti-CD46)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(333)

<400> 1

gaa att gag ctc act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga	48
Glu Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
1 5 10 15	

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg cat agt	96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser	
20 25 30	

aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct	144
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	

cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tct aat cgg gcc tcc ggg gtc cct	192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro	
50 55 60	

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc	240
---	-----

```

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

agg aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa gct      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
              85              90              95

cta caa act ttc act ttc ggc cct ggg acc aag gtg gag atc aaa      333
Leu Gln Thr Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
              100              105              110

```

<210> 2
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> sequência VL de UBS54 (anti-EpCAM) e K53 (anti-CD46)

```

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
              20              25              30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
              50              55              60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
              85              90              95

Leu Gln Thr Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
              100              105              110

```

<210> 3
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> sequência VL de 02-237 (anti-CD46)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(333)

<400> 3

gac atc gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg cat agt 96

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tct aat cgg gcc tcc ggg gtc cct 192

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aac atc 240

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa gct 288

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

cta caa act ttc act ttc ggc cct ggg acc aag gtg gag atc aaa 333

Leu Gln Thr Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sequência VL de 02-237 (anti-CD46)

<400> 4

```

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20           25           30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
          85           90           95

Leu Gln Thr Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110

```

<210> 5

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> sequência de V_H de UBS54 (anti-EpCAM)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(345)

<400> 5

```

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc      48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1           5           10           15

tcg gtg agg gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat      96
Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
           20           25           30

gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg      144
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
           35           40           45

gga ggg atc atc cct atc ttt ggt acg gca aac tac gca cag aag ttc      192
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
           50           55           60

cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac      240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
           65           70           75           80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95

gca aga gac ccg ttt ctt cac tat tgg ggc caa ggt acc ctg gtc acc      336
Ala Arg Asp Pro Phe Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
           100           105           110

gtc tcg aca      345
Val Ser Thr
           115

```

<210> 6

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sequência de V_H de UBS54 (anti-EpCAM)

<400> 6

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Pro Phe Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Thr
 115

<210> 7
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> sequência de V_H de K53 (anti-CD46)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)

<400> 7

```

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc      48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10          15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt acc agc tat      96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30

ggg atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg      144
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

gga tgg atc agc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc      192
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
          50          55          60

cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc aca gcc tac      240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
          65          70          75          80

atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt      288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

gca agg ggc atg atg agg ggt gtg ttt gac tac tgg ggc caa ggt acc      336
Ala Arg Gly Met Met Arg Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

ctg gtc acc gtc tcg aca                                          354
Leu Val Thr Val Ser Thr
          115

```

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sequência de V_H de K53 (anti-CD46)

<400> 8

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Thr
 115

<210> 9

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> sequência de V_H de 02-237 (anti-CD46)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<400> 9

cag gtc cag ctg gtc cag tct ggg gct gag gtc aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

- 149 -

ggt atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc aca gcc tac 240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca agg ggc ttt ccg cgt acg tgg ttt gac tcc tgg ggc cag ggc acc 336
Ala Arg Gly Phe Pro Arg Thr Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

ctg gtc acc gtc tcc tca 354
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> sequência de V_H de 02-237 (anti-CD46)

<400> 10

Cln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

<210> 11

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> sequência de V_H do clone B28 (anti-CD22 phage)

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (369)

<400> 11

atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggt gtg gta cgg cct 48
 Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro
 1 5 10 15
 gga ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt gat 96
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp

20	25	30	
gat tat ggc atg agc tgg gtc cgc caa gct cca ggg aag ggg ctg gag			144
Asp Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
35	40	45	
tgg gtc tct ggt att aat tgg aat ggt ggt agc aca ggt tat gca gac			192
Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp			
50	55	60	
tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc			240
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser			
65	70	75	80
ctg tat ctg caa atg aac agt ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat			288
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
85	90	95	
tac tgt gca aga ggc ttt ctt cgt ttt gct tcc tcc tgg ttt gac tat			336
Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Leu Arg Phe Ala Ser Ser Trp Phe Asp Tyr			
100	105	110	
tgg ggc caa ggt acc ctg gtc acc gtc tcg aga			369
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg			
115	120		

<210> 12

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sequência de V_H do clone B28 (anti-CD22 phage)

<400> 12

Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro

1

5

10

15

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp

20

25

30

Asp Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Leu Arg Phe Ala Ser Ser Trp Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
 115 120

<210> 13

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> sequência de V_H do clone II-2 (anti-CD72 phage)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(369)

<400> 13

atg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct 48
 Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 1 5 10 15

ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc acc 96
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

agc tac tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag 144

Ser Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35 40 45
 tgg atg gga ata atc aac cct agt ggt ggt ggc aca agc tac gca cag 192
 Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln
 50 55 60
 aag ttc cag ggc aga gtc acc atg acc agg gac acg tcc acg agc aca 240
 Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr
 65 70 75 80
 gtc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat 288
 Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 tac tgt gca aga gac tac tat gtt acg tat gat tcc tgg ttt gac tcc 336
 Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Thr Tyr Asp Ser Trp Phe Asp Ser
 100 105 110
 tgg ggc caa ggt acc ctg gtc acc gtc tcg aga 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
 115 120

<210> 14

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sequência de V_H do clone II-2 (anti-CD72 phage)

<400> 14

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

Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln
 50 55 60

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Thr Tyr Asp Ser Trp Phe Asp Ser
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
 115 120

<210> 15
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> sequência de V_H do clone I-2 (anti-class II phage)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 15
 Atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct 48
 Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 ggc agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt gat 96
 Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp
 20 25 30
 gat tat gcc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag 144
 Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

tgg gtc tca ggt att agt tgg aat agt ggt agc ata ggc tat gcg gac 192
 Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp
 50 55 60

tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc 240
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 65 70 75 80

ctg tat ctg caa atg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc gtg tat 288
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

tac tgt gca agg gac ctt tat ctt gcg cat ttt gac tac tgg ggc caa 336
 Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

ggc acc ctg gtc acc gtc tcg aga 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
 115 120

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sequência de V_H do clone I-2 (anti-class II phage)

<400> 16

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

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

Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp

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

<210> 17
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> sequência de V_L comum de clones B28 (fago anti-CD22), II-2 (fago anti-CD72) e I-2 (fago anti-classe II)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)

<400> 17	
tcg tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag	48
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln	
1 5 10 15	
aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca	96
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala	
20 25 30	
agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc tat	144
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr	
35 40 45	
ggt aaa aac aac cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc	192

- 157 -

```
<210> 18
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de VL comum de clones B28 (fago anti-CD22), II-2 (fago
anti-CD72) e I-2 (fago anti-classe)

<400> 18
```

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

Lisboa, 15 de janeiro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Método para identificar pelo menos um clone de célula hospedeira que produz uma mistura de anticorpos, em que a referida mistura de anticorpos tem um efeito desejado de acordo com um ensaio funcional, compreendendo o método os passos de:

- (i) proporcionar uma célula hospedeira com uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve e sequências de ácido nucleico que codificam duas cadeias pesadas diferentes, em que as referidas cadeias pesadas e leves são capazes de emparelhar uma com a outra;
- (ii) cultura de pelo menos um clone da referida célula hospedeira em condições que conduzem à expressão das referidas sequências de ácido nucleico;
- (iii) pesquisa referida pelo menos um clone da célula hospedeira para produção de uma mistura de anticorpos possuindo o efeito desejado por um ensaio funcional; e
- (iv) identificação de pelo menos um clone que produz uma mistura de anticorpos possuindo o efeito desejado.

2. Método de acordo com reivindicação 1, em que a referida cultura no passo ii) e a referida pesquisa no passo iii) é efetuada com pelo menos dois clones.

3. Método de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1-2, em que a referida célula hospedeira é capaz de elevado nível de expressão de proteínas sem a necessidade de amplificação do ácido nucleico que codifica as referidas proteínas na referida célula.

4. Método de produção de uma mistura de anticorpos, compreendendo o passo de:

(i) cultura de um clone de célula hospedeira identificado por um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3 em condições que conduzem a expressão dos ácidos nucleicos que codificam a uma cadeia leve e as duas cadeias pesadas diferentes.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, compreendendo ainda o passo de: (ii) recuperar a mistura de anticorpos a partir da célula hospedeira ou cultura da células hospedeiras.

6. Método para preparar uma célula hospedeira recombinante para a produção de uma mistura de anticorpos, compreendendo o método o passo de: introduzir sequências de ácido nucleico que codificam duas cadeias pesadas diferentes numa célula hospedeira recombinante compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve comum capaz de emparelhar com as duas cadeias pesadas, resultando apenas em regiões de ligação funcionais.

7. Animal transgênico não humano ou uma planta

transgênica compreendendo uma sequência de ácido nucleico recombinante que codificam a cadeia leve comum e uma sequência de ácido nucleico recombinante ou sequências que codificam pelo menos duas cadeias pesadas diferentes que são capazes de emparelhar com a referida cadeia leve comum, em que as referidas sequências de ácido nucleico recombinantes que codificam as referidas cadeias leves e pesadas estão sob o controle de um promotor específico para o tecido.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, em que uma sequência de ácido nucleico ou sequências que codificam pelo menos uma das referidas cadeias comuns leve e/ou pesadas foram obtidas por um método compreendendo pelo menos um passo de seleção do anticorpo em exposição.

9. Método de rastreamento para uma mistura de anticorpos que é capaz de ligação a um alvo, compreendendo o método os passos de:

- i) colocar uma biblioteca de exposição de anticorpos compreendendo anticorpos em contacto com material compreendendo um alvo;
- ii) pelo menos um passo de seleção de anticorpos de ligação ao referido alvo;
- iii) identificação de pelo menos dois anticorpos de ligação ao referido alvo, em que os referidos pelo menos dois anticorpos compreendem uma cadeia leve comum;

iv) introdução de uma sequência de ácido nucleico que codifica a cadeia leve comum e uma sequência de ácido nucleico ou sequências de ácido nucleico que codificam duas cadeias pesadas dos referidos pelo menos dois anticorpos numa célula hospedeira;

v) cultura de um clone da referida célula hospedeira em condições que conduzem à expressão das referidas sequências de ácido nucleico;

vi) pesquisa do referido clone da referida célula hospedeira para produção de uma mistura de anticorpos possuindo um efeito desejado através de um ensaio funcional; e

(vii) identificação de pelo menos um clone que produz uma mistura de anticorpos possuindo o efeito desejado.

10. Método para a produção de uma mistura de anticorpos num hospedeiro recombinante, incluindo o método o passo de: expressar numa célula hospedeira recombinante uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve comum e uma sequência de ácido nucleico ou sequências que codificam duas cadeias pesadas diferentes que diferem na região variável e que são capazes de emparelhar com a referida cadeia leve comum, e em que as referidas cadeias pesadas diferem ainda nas suas regiões constantes de modo suficiente para reduzir ou prevenir o emparelhamento entre as cadeias pesadas diferentes.

11. Método de acordo com reivindicação 10, em que as referidas cadeias pesadas são as de isotipo diferente.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o referido ensaio funcional é selecionado a partir do grupo de ensaios de ligação, ensaios de apoptose, ensaios de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), ensaios de citotoxicidade dependente do complemento (CDC), ensaios de inibição do crescimento ou proliferação celular (efeito citostático), ensaios de morte celular (efeito citotóxico), ensaios de sinalização de células, ensaios para medir a inibição da ligação de agentes patogénicos à célula alvo, ensaios para medir a secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou outras moléculas segregadas, ensaios para bacteriostase, atividade bacteriana, neutralização de vírus, ensaios para medir a atração de componentes do sistema imunitário para o sítio onde os anticorpos estão ligados, incluindo métodos de hibridação *in situ*, métodos de marcação, ensaios *in vivo* tais como modelos animais, incluindo modelos de tumor em murganho, modelos de doença autoimune, modelos de roedores ou primatas infetados com vírus ou infetados com bactérias.

13. Mistura de anticorpos compreendendo uma cadeia leve comum e duas cadeias pesadas diferentes com uma região variável diferente, em que as duas cadeias pesadas diferentes são capazes de emparelhar com a referida cadeia leve comum, e em que as referidas cadeias pesadas diferem ainda nas suas regiões constantes de forma suficiente para que a quantidade de anticorpos biespecíficos seja diminuída em comparação com a percentagem teórica de anticorpos biespecíficos.

14. Mistura de anticorpos de acordo com a reivindicação 13, em que dois anticorpos da mistura se ligam a diferentes epitopos no mesmo antígeno ou se ligam a diferentes moléculas de antígeno presentes numa mistura compreendendo o antígeno.

15. Mistura de anticorpos de acordo com qualquer uma das reivindicações 13-14 ou obténível por um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 4, 5, 10 ou 11 para utilização no tratamento ou diagnóstico de uma doença ou distúrbio num indivíduo humano ou animal.

16. Composição farmacêutica compreendendo a mistura de anticorpos de acordo com qualquer uma das reivindicações 13-14.

17. Utilização de uma mistura de anticorpos em que duas cadeias pesadas diferentes e uma cadeia leve comum estão presentes, na preparação de um medicamento para o tratamento ou diagnóstico de uma doença ou distúrbio num indivíduo humano ou animal.

18. Utilização da reivindicação 17, em que a mistura é obténível por um método de acordo com as reivindicações de qualquer uma das reivindicações 4, 5 ou 10-11.

19. Utilização de acordo com a reivindicação 17

ou 18, em que a doença ou distúrbio é selecionado a partir de um grupo de doenças autoimunitárias, rejeição de enxerto-versus-hospedeiro, e cancro, incluindo tumores sólidos do cérebro, cabeça e pescoço, mama, próstata, cólon, pulmão, tumores hematológicos, tumores de células B, distúrbios neoplásicos incluindo leucemias, linfomas, sarcomas, carcinomas, tumores de células neurais, carcinomas de células escamosas, tumores de células germinais, metástases, tumores não diferenciados, seminomas, melanomas, mielomas, neuroblastomas, tumores de células mistas, e neoplasias causadas por agentes infecciosos.

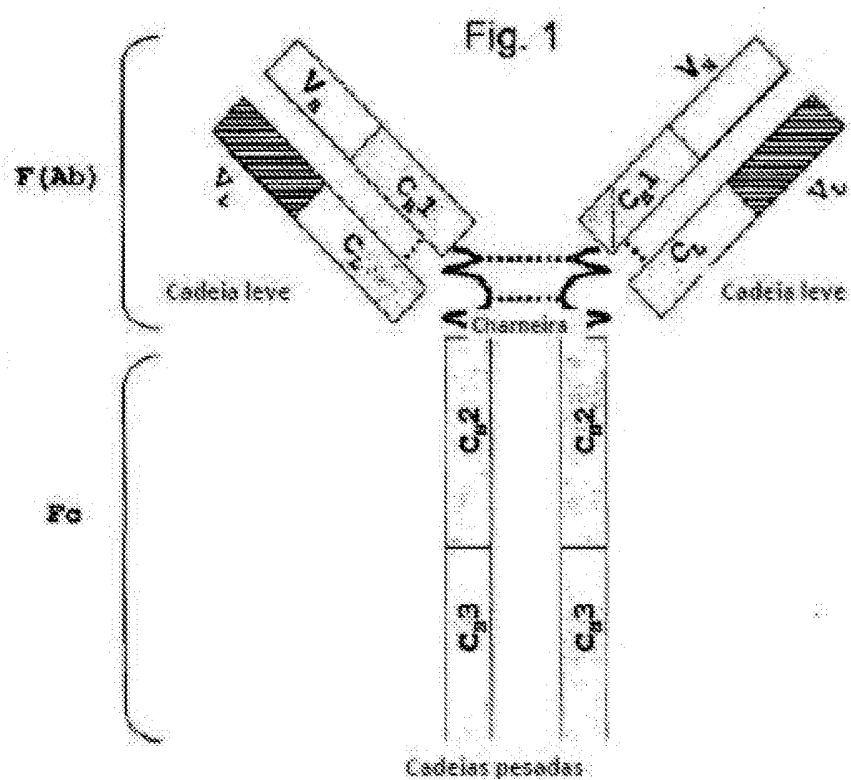
20. Utilização de acordo com a reivindicação 17 ou 18, em que a doença ou distúrbio é causada por uma bactéria, vírus, ou fungo, incluindo o resistente a múltiplos fármacos *S. aureus*, *Candida albicans*, espécies de *Aspergillus*, levedura, Lissavírus e.g. vírus da raiva, Vírus Varicela-Zoster, Adenovírus, Vírus do Sincício Respiratório, Vírus da Imunodeficiência Humana, Metapneumovírus Humano, vírus Influenza, Vírus West Nile, o vírus que causa o Síndrome Respiratório Agudo Grave (SARS), *Bacillus anthracis*, toxina de *Clostridium botulinum*, toxina epsilon de *Clostridium perfringens*, *Yersinia Pestis*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, espécies de *Brucella*, enterotoxina B de *Staphylococcus*, *Variola major*, alfavírus que causa síndromas de meningoencefalite (EEEV, VEEV, e WEEV), vírus conhecidos por causarem febres hemorrágicas tais como vírus Ebola, Marburg e Junin ou contra vírus tais como vírus Nipah, Hantavírus, vírus da encefalite da

carraça e vírus da febre amarela ou contra toxinas *e.g.* toxina Ricina de *Ricinus communis*.

21. Utilização de acordo com a reivindicação 17 ou 18, em que a doença ou distúrbio é causada por um parasita unicelular ou multicelular.

22. Composição farmacêutica compreendendo uma mistura recombinantemente produzida de anticorpos e um veículo adequado, em que as duas cadeias pesadas diferentes e uma cadeia leve comum estão representadas na referida mistura de anticorpos recombinantemente produzidos, e em que as duas cadeias pesadas diferentes são capazes de emparelhar com a referida uma cadeia leve comum.

Lisboa, 15 de janeiro de 2014



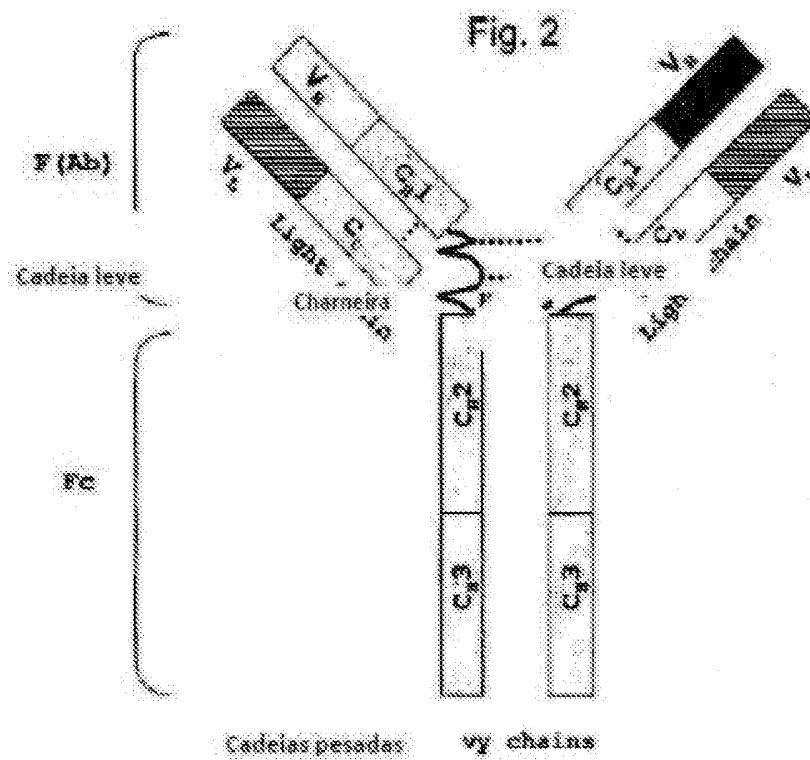


Fig. 3

```

UBS54-VL      GAAATTGAGCTCACTCAGTCCTCCACTCTCCCTGCTCCTCAGCCCTGGAGASCCCGGC
K53-VL        GAAATTGAGCTCACTCAGTCCTCCACTCTCCCTGCTCCTCAGCCCTGGAGASCCCGGC
Q2-237-VL     GRCATCGTGATGACTCAGTCCTCCACTCTCCCTGCTCCTCAGCCCTGGAGASCCCGGC
               ** * * * *
UBS54-VL      TCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCCTCCTGCTAGTAAATGATACAACATATTTGGAT
K53-VL        TCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCCTCCTGCTAGTAAATGATACAACATATTTGGAT
Q2-237-VL     TCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCCTCCTGCTAGTAAATGATACAACATATTTGGAT
               *****
UBS54-VL      TGGTACCTGCAGAGGTCAGGSCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGG
K53-VL        TGGTACCTGCAGAGGTCAGGSCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGG
Q2-237-VL     TGGTACCTGCAGAGGTCAGGSCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGG
               *****
UBS54-VL      GCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGCGAGTGGATCAGGCAAGATTTTACACTGAAA
K53-VL        GCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGCGAGTGGATCAGGCAAGATTTTACACTGAAA
Q2-237-VL     GCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGCGAGTGGATCAGGCAAGATTTTACACTGAAA
               *****
UBS54-VL      ATCAGCAGACTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCAATGCAAGCTCTACAACT
K53-VL        ATCAGCAGACTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCAATGCAAGCTCTACAACT
Q2-237-VL     ATCAGCAGACTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCAATGCAAGCTCTACAACT
               *****
UBS54-VL      TTCACCTTCGGCCCTGGACCAAGGTGGAGATCAAA
K53-VL        TTCACCTTCGGCCCTGGACCAAGGTGGAGATCAAA
Q2-237-VL     TTCACCTTCGGCCCTGGACCAAGGTGGAGATCAAA
               *****

```

Fig. 3, Cont.

```

K53-VH          CAGGTGCAGCTGCTGCACTCTGGGGCTAGGTGAAGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGSTC
92-237-VH      CAGGTGCAGCTGCTGCACTCTGGGGCTAGGTGAAGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGSTC
98S34-VH       CAGGTGCAGCTGCTGCACTCTGGGGCTAGGTGAAGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGSTC
*****
K53-VH          TCCTGCAGGCTTCGGTTACACCTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGGACAGGCC
92-237-VH      TCCTGCAGGCTTCGGTTACACCTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGGACAGGCC
98S34-VH       TCCTGCAGGCTTCGGTTACACCTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGGACAGGCC
*****
K53-VH          CCTGGACAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGGCTTACAAIGSTACACAAACTAT
92-237-VH      CCTGGACAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGGCTTACAAIGSTACACAAACTAT
98S34-VH       CCTGGACAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGGCTTACAAIGSTACACAAACTAT
*****
K53-VH          GCACAGAAGCTGCAGGGCAGAGTCACGATGACACAGACACATCCAGGACACAGCCTAC
92-237-VH      GCACAGAAGCTGCAGGGCAGAGTCACGATGACACAGACACATCCAGGACACAGCCTAC
98S34-VH       GCACAGAAGCTGCAGGGCAGAGTCACGATGACACAGACACATCCAGGACACAGCCTAC
*****
K53-VH          ATGGAGCTGAGGAGGCTGAGATCTGACGACACGCGCTGTATTACTGTGCAAGGGGCTTG
92-237-VH      ATGGAGCTGAGGAGGCTGAGATCTGACGACACGCGCTGTATTACTGTGCAAGGGGCTTG
98S34-VH       ATGGAGCTGAGGAGGCTGAGATCTGACGACACGCGCTGTATTACTGTGCAAGGGGCTTG
*****
K53-VH          ATGAGGGGTGTGTTTGACTACTGGGGCCAAAGGTACCTGTGTLACCGTCTCGACA
92-237-VH      CCGGTACGTCGTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACCTGTGTCACCGTCTCGTCA
98S34-VH       ~~~~~CGTTCTTCACTATTGGGGCCAAAGGTACCTGTGTCACCGTCTCGACA
*****

```

Fig. 4

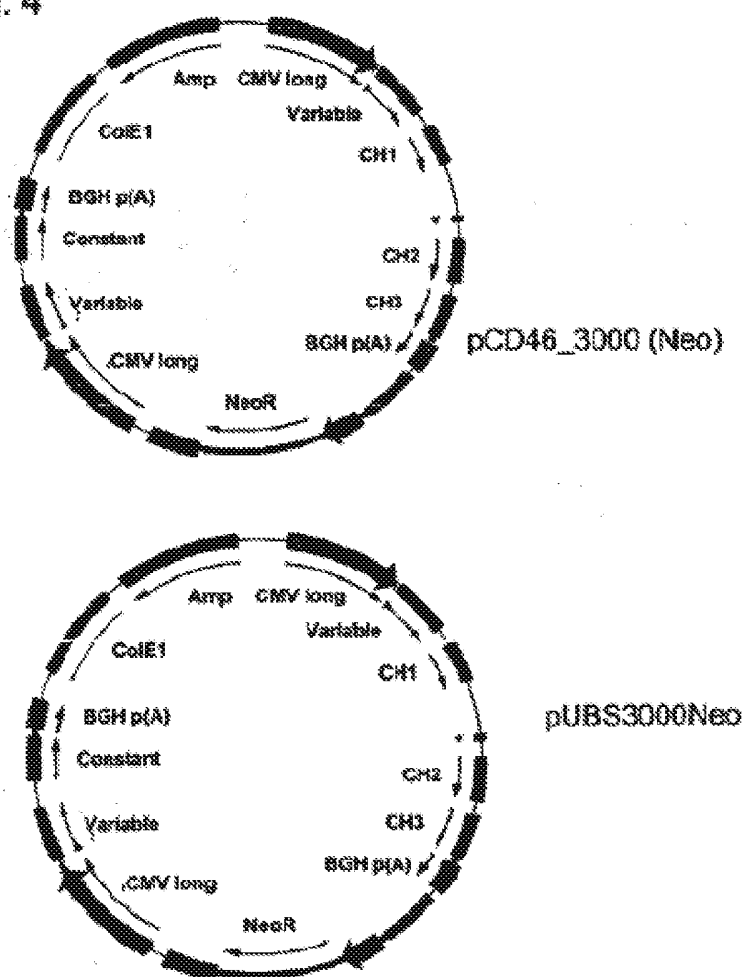
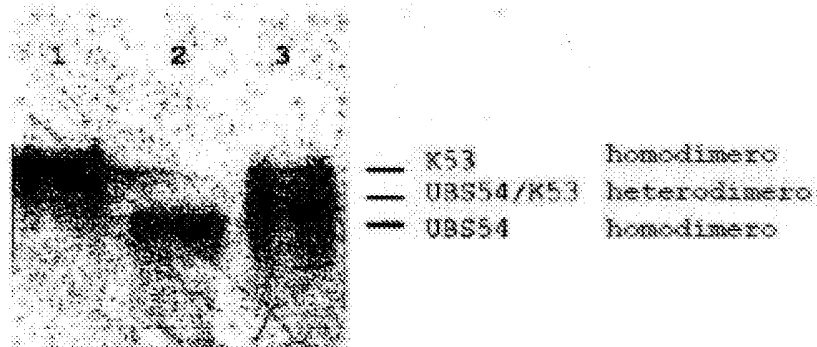


Fig. 5

A.



B.

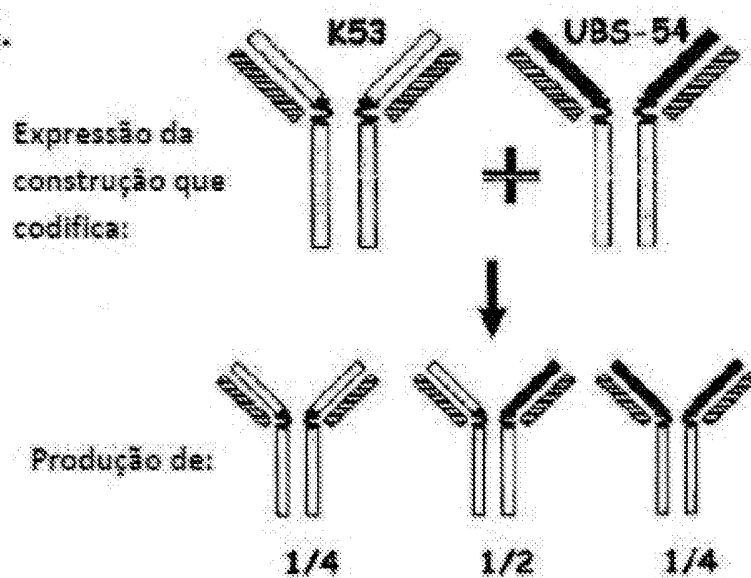
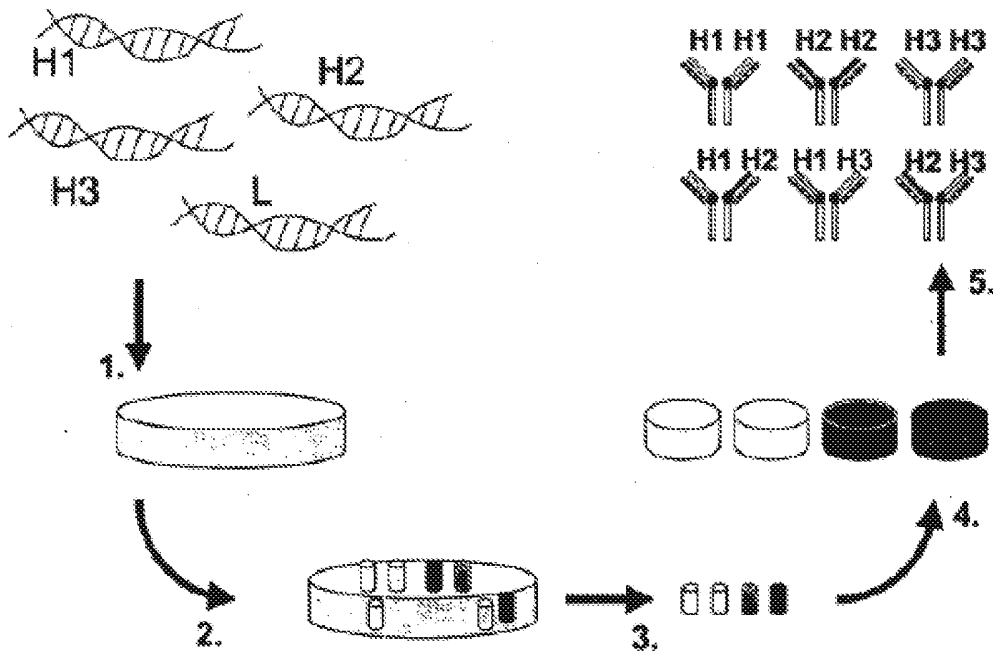


Fig. 6



Document ID: A64-002 (Rev. 02-83)

11-11-11

H A Q V G L Y Q S G A E Y K R P C A S V R Y S C
 1 ATGCCCCAGGTGCACCTGGTCCACTCTGCGGCTCGAGTTGACAGAAGCTTCGCCCTCACTGAAGCTTYCCTG
 - K A S I T T T T T T T T M N W Y E Q A P S Q G L S
 72 CAAGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGCTGCGACAGSCTCCCTGGACAAGGCTTG
 - Y M G I I N F S G G T S Y A Q X F Q G R V T
 143 AGTGGATGGGAATTAATCACCCCTACTGTTGTTGGTGGACAAGCTACGGACACAGAAGTTTCAGGGCCAGAGTCAE
 M T P D T S T C T T T Y M S L S S L K S E D T A V
 214 ATGACAGGGACAGCTCCACGAGACACATCTACATTGAGCTGAGCCGAGCATCTCGAGACACAGGCTGT
 - Y T C A R D Y Y V T Y D S W F D S N G Q S T L V
 285 GTATTACTGTTCAAGAGACTACTATGTTTACGTATGATTCTTGGTTTGACTTCTGGGGCCAAGGTACCTGG
 - T V S S
 356 TCACCGCTCTGACA

Fig. 7. cont

Fragmento V₁ de anti-Classe II (Página I-2)

```

      N A E V Q L V E S S E G G L V Q P G R S L E L S C
1  ATGCGCGAGCTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCCTG
   . A A S G I T F D O Y A M R W V R Q A P G H G L E
72 TGCAGCCCTCTGGATTACCTTTCATGATTATGTCATGCACTGGGTCCGGCAGGTCCAGGSAAGGGCTGG
   . W Y S Q I S W N S G S I S T A D V R G M F I
143 AGTGGCTCTCAGCTATTAGTTCGAATACTGCTAGCATAGCTAAGCGGACTCTCTGAGGGGCCATTGACC
   . I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V
214 ATCTCCAGNACAAACGCCAGCAACTCCCTGTATCTGCATGCAACAGTCTCTGAGCTGAGGACACGCCCGT
   . Y Y C A R D I Y L A S F S Y N G Q G T L V T V S
285 GTATTACTGTGCAAGGGACCTTTATCTTSCCATTTTISACTACTGGGGCCAAGGTACCCCTGGTCACCGTCT
   . R
356 CGAGA

```

Sequência V₂ partilhada de Páginas I-2, II-2 e B28

```

      S S E L T Q D P A V S V A L C Q T V R I T Q Q S
1  TCGCTGAGCTGACTCAGGACCTGCTGTGCTGTGGCTTGGACAGACAGTCAGGATCAGTGCAGG
   . D S I R S Y Y A S W Y Q Q F P G Q A S V I V I Y
72 AGACAGCCTCAGAACTATTATGCAGCTGGTACAGCAGAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCTCT
   . G K N H R F S G I F D R F S G S S S C H T A S
143 ATGCTAAACACACCGGCCCTCAGGATCCAGACCGATCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCC
   . L T I T O A Q A E D E A S V Y C N S R D S S G S
214 TTGACCATCCTGGGGCTCAGGCGAGATCAGCGCTGATATTACTGTAACTCCCGGACACCGCTGTAA
   . K V Y F G G G I R L I V L S R A A
285 CCAAGTGTATTTCGGCGGAGGACTAAGCTCAGCGCTCTAGGTGCGGTGGCA

```

Fig. 8

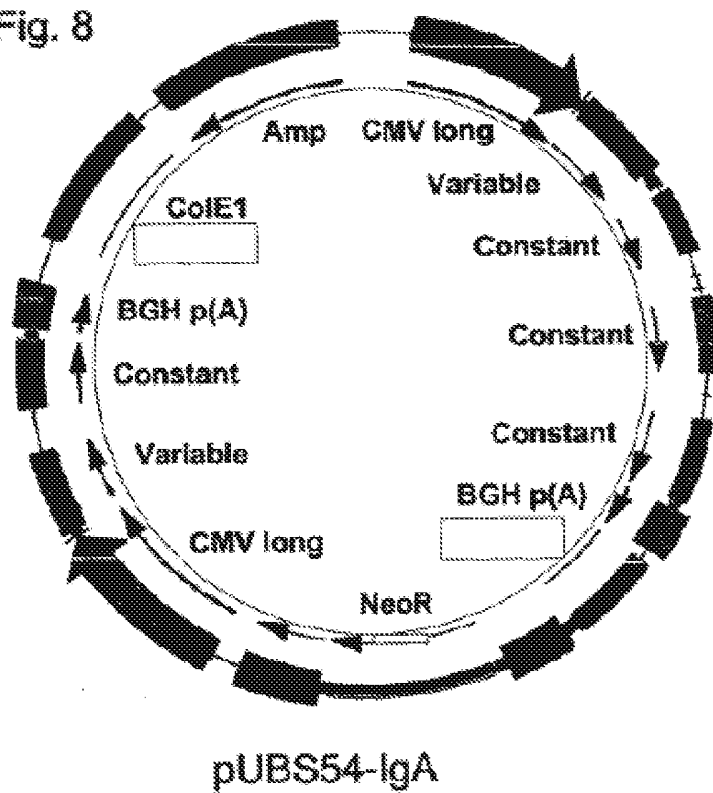


Fig. 9

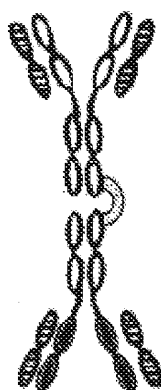


Fig. 10

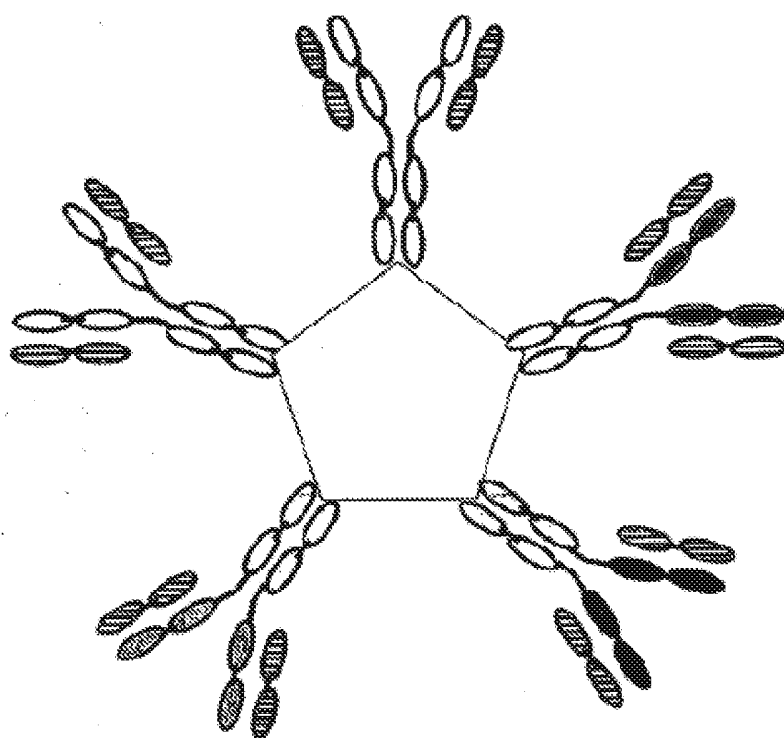
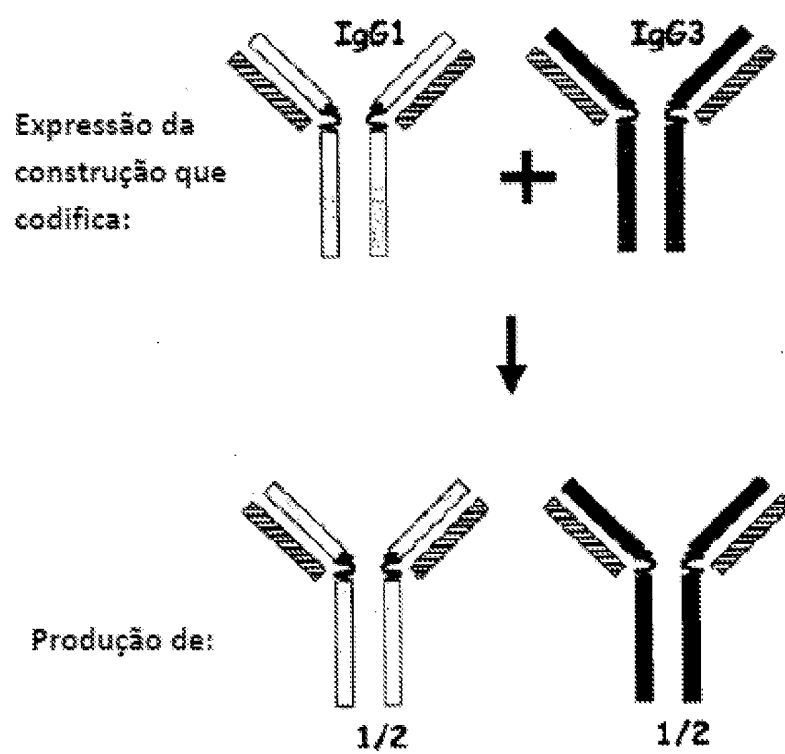


Fig. 11



Sequencia de X de 1993

1 Q V Q L V Q S G R A E V K E P G A S Y K V
CAGGTGCAGCTGCTCCACTGTCTGGGCTGAGGTGAGGAGCTGGGGCTCAGTAAAGGTG

51 S C K A S G I T P T S Y G I S W V R Q A
TGTCTCAGAGCTTCTGGTACAGCTTTALCAGCTATGGLATCAGCTGGGTGGGACAGGCTC

121 P Q Q S L S W H S F I S A Y N G S T S Y
CCTGGACAGAGGCTTGACTGCATGCGATCAGCGCTTACATGCTTACACAACTCT

181 A Q K L Q G R V T N T T T T S T S T A Y
GCACAGAGCTCCAGGACAGACTCAGCATGACACAGACAGATCCAGAGACAGGCTTAC

241 N E L S S L A S S E T A V Y Y C A R C H
ATGGAGCTCAGAGGCTTGAATCTTACAGACAGGCGCTGATTACTGTCCAGAGGCTATG

301 N R E V F D Y N S Q S T L V T V S T
ATGAGGCTGTGTTTGACTACTGGGCTAGGTATCCGCTCAGCCCTCTGACA

Fig. 12, cont

Sequência de V_H da IgG 02-237

```

1      Q V Q L V Q S C A E V K E F G A S Y K Y
    CAGGTGCAGCTGCTGCAATCTGSSGCTGAGCTGAGAAAGCTTGGGGGCTCAGTCAAGGTC

61      S C K A S Q V T F T S V G I S N V R Q A
    TCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACGAGCTATGATATCAGCTGGGTGCACAGGCC

121     P G Q G L E W H G W I S A Y N G N T R Y
    CCTGGACAGGAGCTTGAGTGGATGGATGGATCAGCGCTTACAAATGGTAACACAAACTAT

181     A Q E L G S R Y F H I T S I S I S I A Y
    GCTCAGAGCTCCAGGCCAGACTCAGCATGACCCACACACACTCCAGGAGCCACAGCCTAC

241     H E E R S L D S D D Y A Y V Y C A R E F
    ATGGAGCTGACGAGGCTGAGATCTGACGACACGAGCCCTGTATTAATCTGTCAGGGGCTTT

301     P R T S F D S W S Q S T L V T V S S
    CCGCGTACGTGCTTTTACTCTCTGGGGCCAGGSCACCCCTGCTGACCGTCTCTCA

```

Fig. 12, cont

Sequência de V_H da IgG UB654

```
1      Q V Q L V Q S Q A S Y K K P G S S Y S Y  
      CAGGTGCACCTGCTNCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGAGAGCCTGGGTCTCGGIGAGGGTC  
61      S C K A S G S T F S S Y A I E W V R C A  
      TCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGCACAGGCC  
121     F C Q G L S W N S G I I F I F C T A N Y  
      CCTGGACAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAACTAC  
181     A Q R F Q G R V F I T A S E E T S T A Y  
      GCACAGAGATTCCAGGGGAGTACAGGATTACCGGGAGCAATCCACGAGGCACAGCTTAC  
241     M E L E S L R S S D T A V Y Y C A S C P  
      ATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTCAACAGACCCG  
301     F L N Y W G Q C T L V T V S T  
      TTCTTCACTATGGGGCAAGGTACGCTGGTCACCGTCTCGACA
```

Fig. 12, cont

Sequência de V_H da IgG K33 e UB554

```

1      E T F L T O S P L S L R V T S G E F A
      GAAATTTAGCTCACTCACTCTCTCACTCTCCCTGGCCCTCAGCCCTGGAGAGCCGGGGC

50      S I S C R C S Q S I L N S R S Y N T L D
      TCCATCTCCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCTCCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTGGAT

118     W Y L Q K R G S S P O L L I Y L G S S R
      TGGTACCTGCAGAGCCAGCCAGCTCTCCACAGCTCCTGATCTATTITGGTCTAATCGG

178     A S G V P D R F S G S S S G T D Y T L R
      GCCCTCCGGGTCCCTGACAGCTTCAGTSCCAATGGATCAGGCACAGATTTTCACTGAAR

238     I S R V E A E D V C V Y Y C M Q A L O T
      ATCAGCAGAGTSSAGGCTAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATSCAGGCTCTACAACT

298     F T F S P G T R V E I K
      TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

```

Fig. 12, contSequência de V_H da IgG 82-237

```

1      D I V N T Q S F L S L P V T P G E S A
SACATCCGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTTSCCTCGTCACTCCCTGGAGACCCCGCC
58      S I S C E S S Q S L L S S S G Y N Y I D
TCCATCTCTCTGCAGGTCTATCTCAGAGCTTCTTGCATNGTAATGGATACAACTATTGGAT
116     W Y E Q E F G Q S F D L L I Y L G S N R
TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGTCCCTGATCTATTGGGTTCTATTCG
176     A S G Y P D S F S Q S S S S T D P T L K
GCTCCGGGATCCCTGACAGGTTCAATGSCAGTGGATCAGGCACAGATTCTACACTGAA
236     I S R V E A E C V G V Y Y C K Q A L C T
ATCAGCAGACTGGAGGCTCAGCATCTTCCGCTTTATTACTCCATCCAGGCTCTACAACT
298     P T F G P E T K V K I K
TTCACCTTCGGGCTCGGACCAAGGGGGGATCAA

```

FIG. 13

		<u>CDR1</u>
K53 VH	1	CVQLVQSCAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTSYGISWVRQAPCQGLEWMG
UBS54 VH	1	CVQLVQSCAEVKKPGSSVRVSKKASGCTFTSYAISWVRQAPCQGLEWMG
92-237	1	CVQLVQSCAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTSYGISWVRQAPCQGLEWMG

		<u>CDR2</u>
K53 VH	50	WIAAYNGHTNYAQKLGGRVTNITDTSTAYMEASLRSEDIAVYYCAR
UBS54	50	GIIPLEGNANYAQKLGGRVTITADESTAYMEASLRSEDIAVYYCAR
92-237	50	WIAAYNGHTNYAQKLGGRVTNITDTSTAYMEASLRSEDIAVYYCAR

		<u>CDR3</u>
K53 VH	99	GGAGGVFDYWGQCTLVTVST
UBS54 VH	99	DEFLA---YWGQCTLVTVST
92-237	99	GFFRTSEFDSWGQCTLVTVSS

Fig. 14

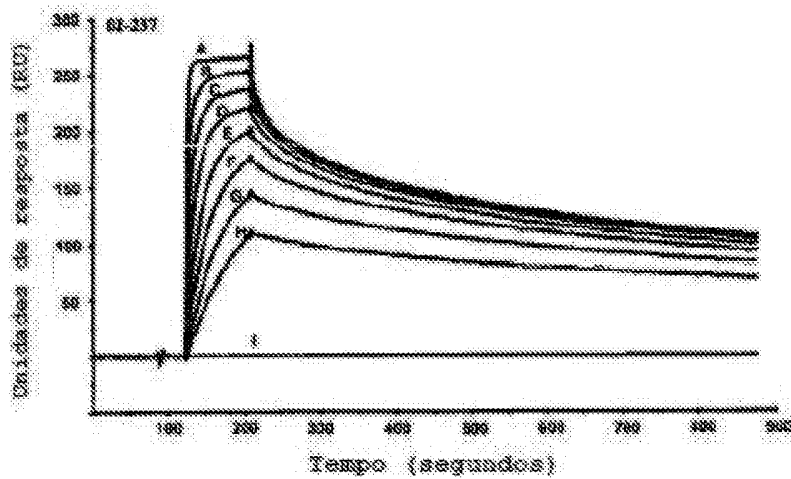
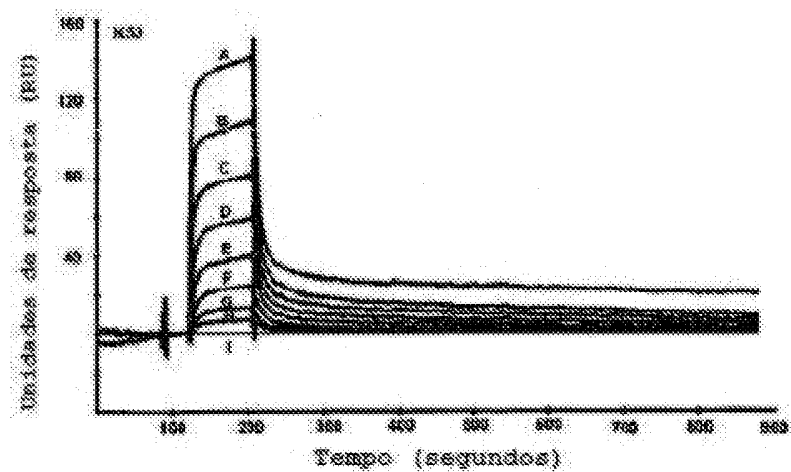


Fig. 15

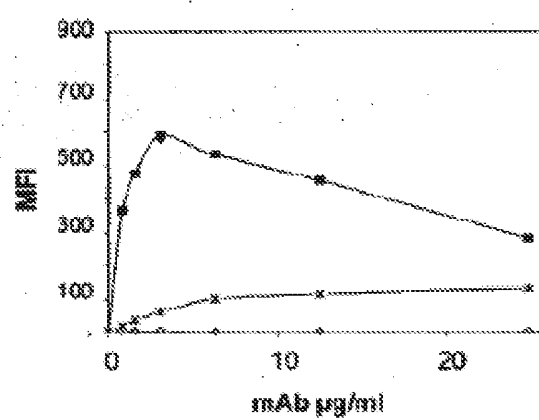


Fig. 16A

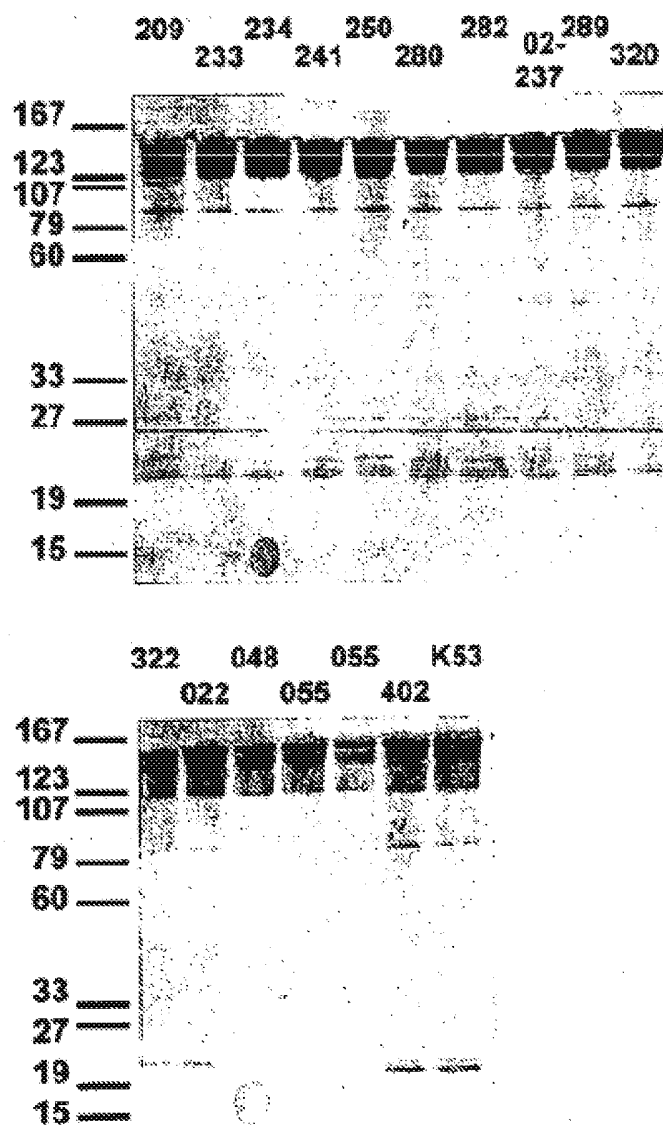


Fig. 16A, cont

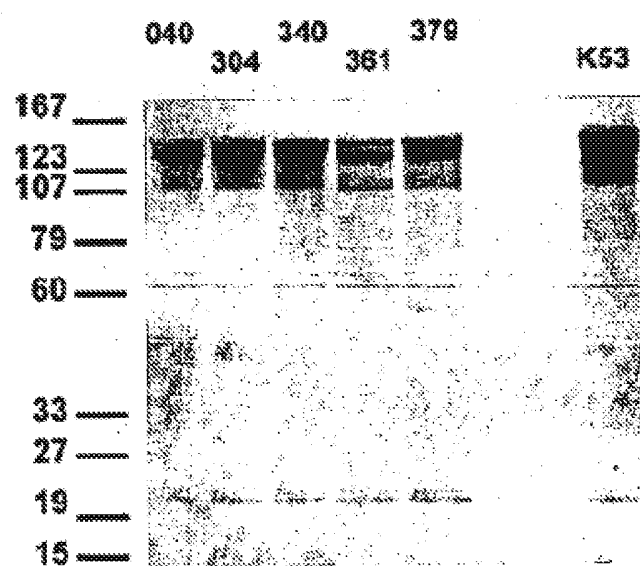


Fig. 16B

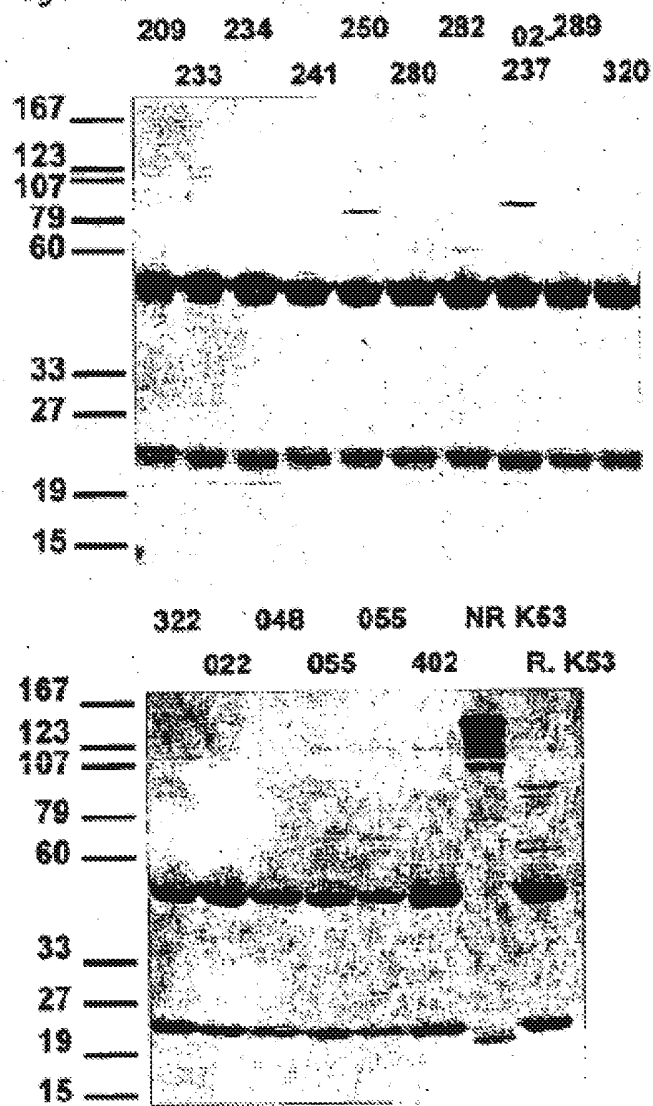


Fig. 16B, cont

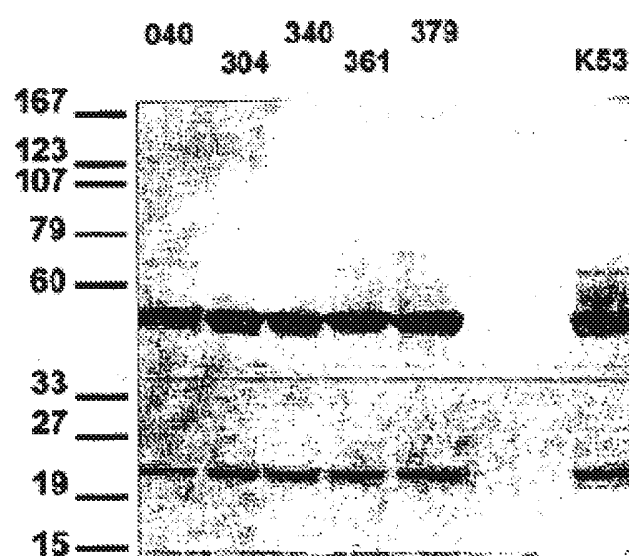


Fig. 17

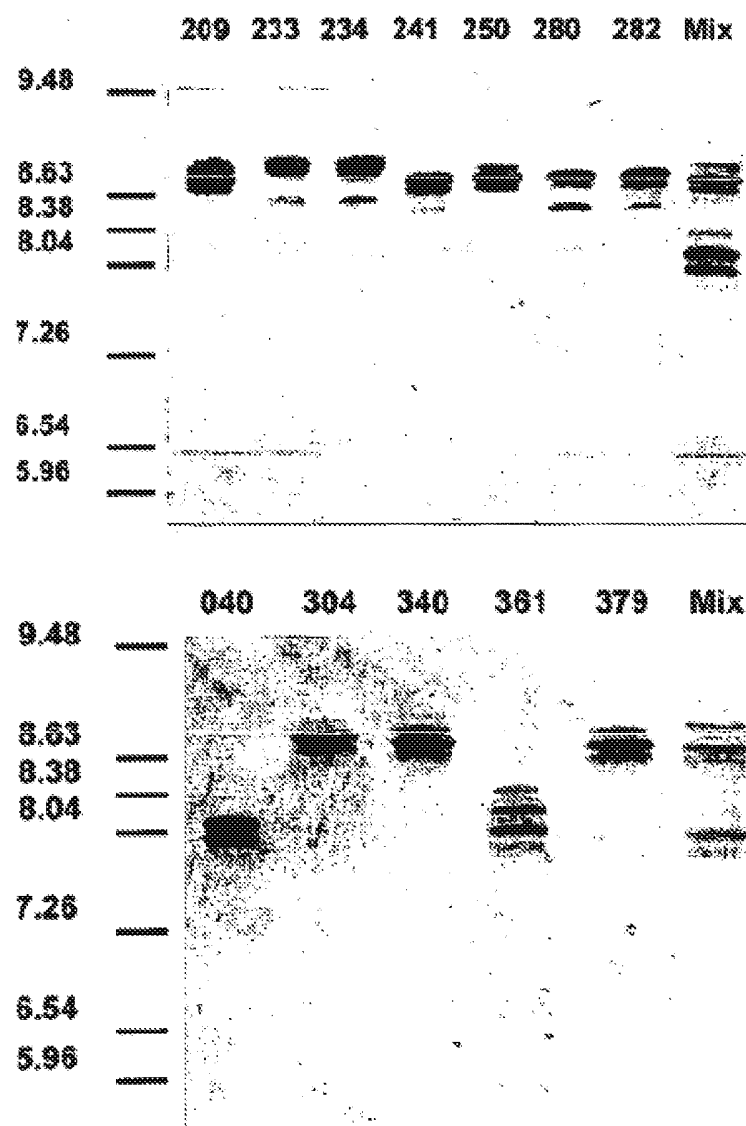


Fig. 17, cont

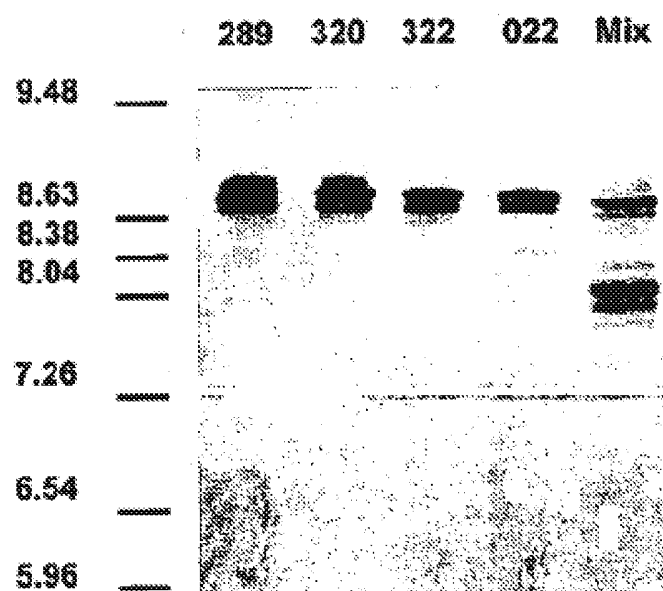


Fig. 17, cont

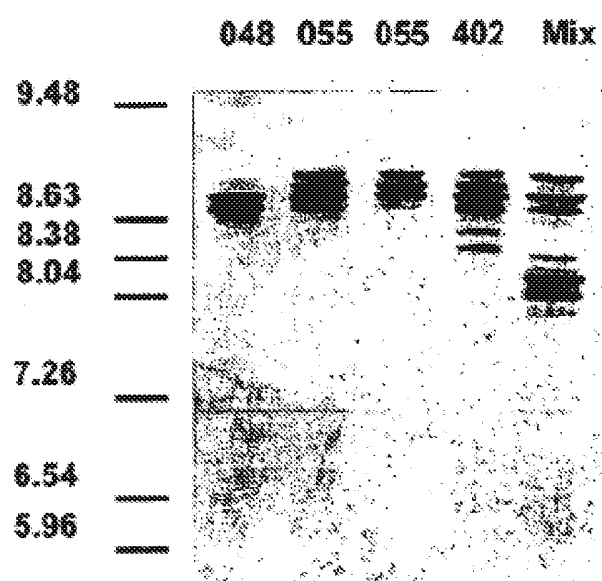


Fig. 18

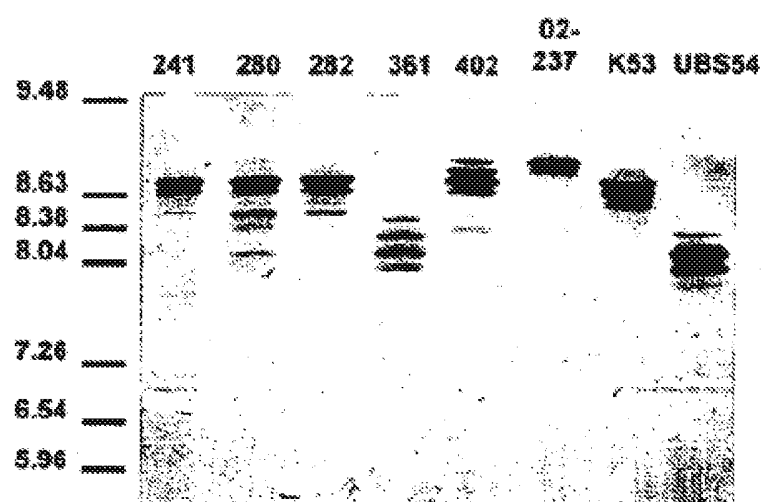


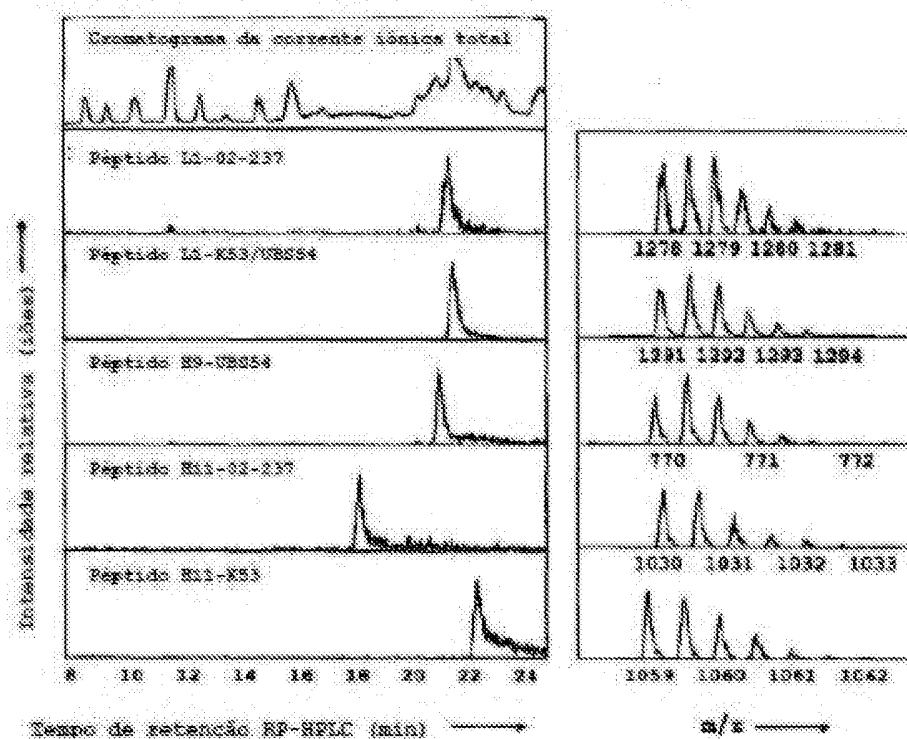
Fig. 19 Mapeamento de peptídeos do Policlonal Poly1-280

Fig. 20

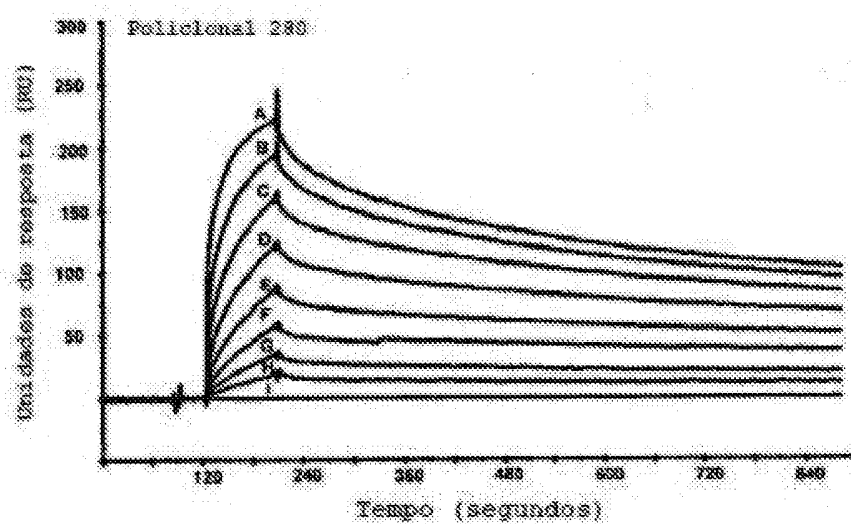


Fig. 21

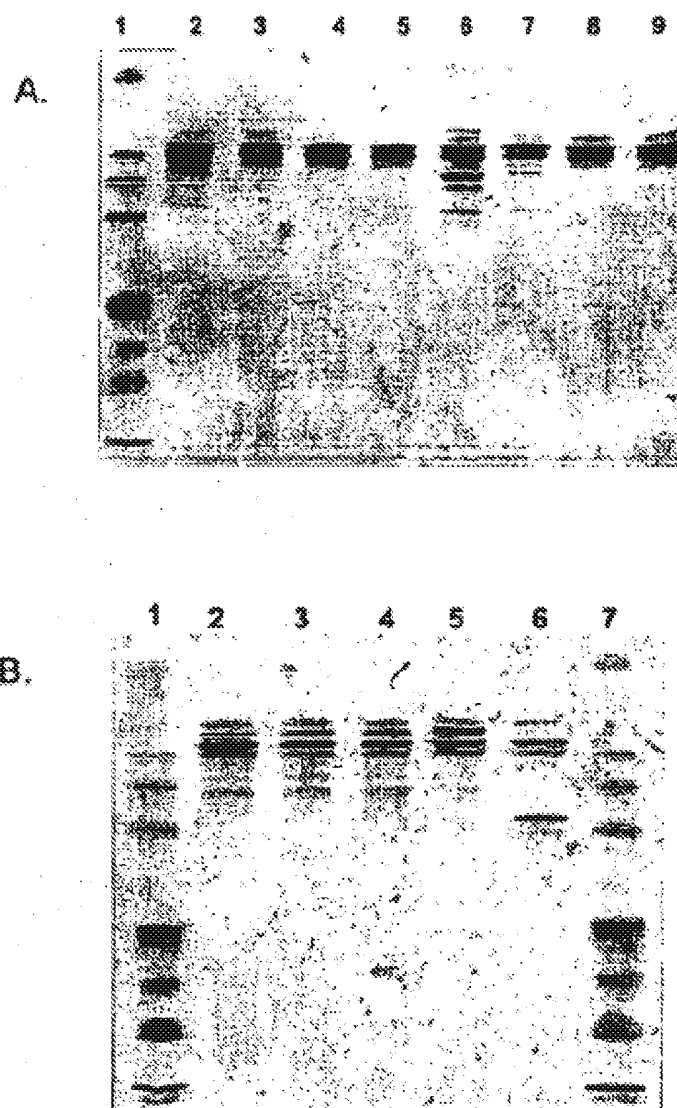
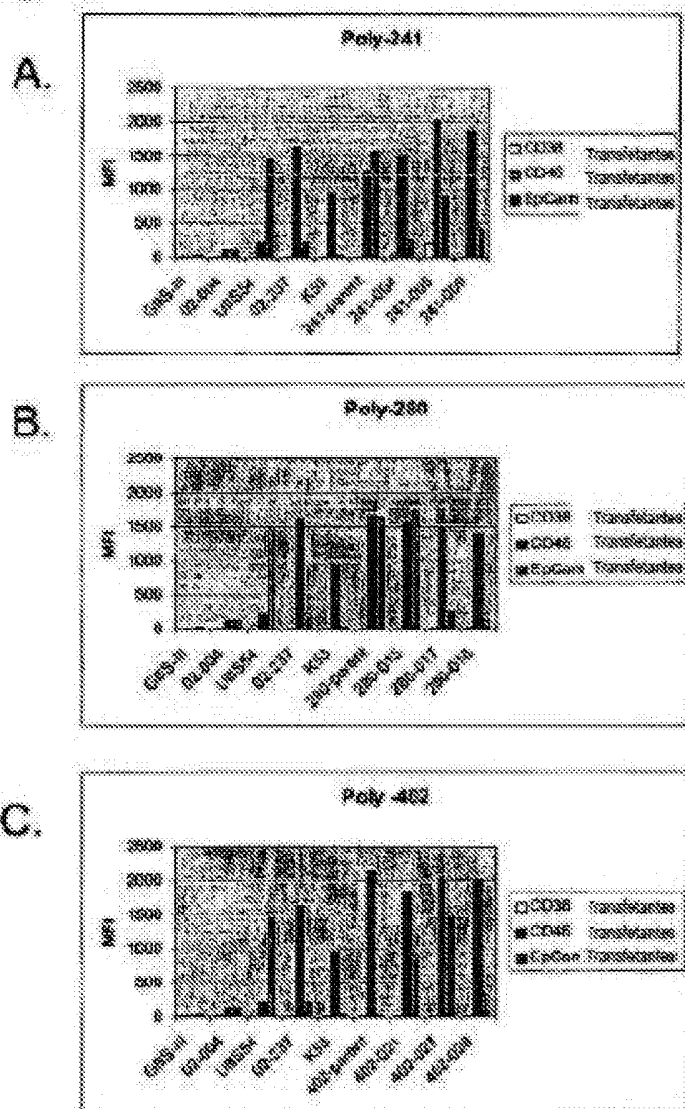


Fig. 22



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- | | |
|-----------------|----------------|
| * EP 0120064 A | * EP 0724639 A |
| * EP 0314181 A | * WO 0132901 A |
| * EP 0481796 A | * US 5733779 A |
| * US 4818567 A | * WO 9841645 A |
| * WO 0063403 A | * WO 0106216 A |
| | * WO 9517065 A |
| * WO 0119334 A | * US 6291740 B |
| * WO 9520401 A | * WO 9517500 A |
| * US 5789208 A | * WO 9839416 A |
| * US 6335163 A | * WO 0104929 A |
| * WO 9850431 A | * WO 9742313 A |
| * WO 03004704 A | * US 5888789 A |
| * EP 0523949 A | * US 6060560 A |
| * US 4801687 A | * WO 9747739 A |
| * US 5151504 A | * WO 9815627 A |
| * US 4369216 A | * US 5772907 A |
| * US 6160357 B | * US 5783186 A |
| * WO 9964582 A | * WO 9827011 A |
| * WO 9906569 A | * EP 0402029 A |
| * US 6295160 B | * EP 0445625 A |
| * WO 0146485 A | * WO 9815633 A |
| * WO 0218948 A | |

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- | | |
|---|--|
| * ROITT, Essential Immunology. Blackwell Scientific Publications, 1984 | * CF BARBAS III et al. Phage Display. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 |
| * MERCHANT et al. Nature Biotechnology, 1998, vol. 16 (7), 677-681 | |
| * LENZ; WEIDLE. Gene, 1990, vol. 87 (2), 213-218 | * SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 1989 |
| | * the series Methods in Enzymology. Current Protocols in Molecular Biology. Academic Press, Inc, 1987 |
| * CF BARBAS III et al. Phage Display. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 | |
| * COLIGAN JE; DUNN SM; PLOEGH HL; SPEICHER DW; WINGFIELD PT. Current Protocols in Protein Science, 1995, ISBN 0-471-11184-8 | * Plant Gene Transfer And Expression Protocols. JONES H. Methods in Molecular Biology, 1995, vol. 49 |
| * Tissue Culture. Academic Press, 1973 | * Current Protocols in Molecular Biology, 1987 |
| * Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach. IRL Press, 1991 | * Methods in Enzymology. Academic Press |
| * In vitro selection and evolution of proteins. A. PLÜCKTHUN et al. Adv. Prot. Chem. Academic Press, 2001, vol. 55, 367-403 | * PCR2. A Practical Approach, 1995 |
| | * Antibodies: A Laboratory Manual, 1998 |
| * In vitro selection and evolution of protein-ligand interactions by ribosome display. C. SCHAFFITZEL et al. Protein-Protein Interactions. A Molecular Cloning Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 535-567 | * COLIGAN, J.E. et al. Current protocols in protein science. John Wiley & Sons, Inc, 2001, vol. 1 |
| | * APPEL RD; BAIRICH A; HOCHSTRASSER DF. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. Trends Biochem. Sci., 1994, vol. 19, 258-260 |

- BENDIG MM. The production of foreign proteins in mammalian cells. *Genet. Eng.* 1988, vol. 7, 91-127
- BOEL E ; VERLAAN S ; POPPELIER MJ ; WEST-ERDAAL NA ; VAN STRIJP JA ; LOGTENBERG T. Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J Immunol Methods*. 2000, vol. 238, 153-166
- BRINK MF ; BISHOP MD ; PIEPER FR. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology*. 2000, vol. 53, 139-148
- CAMPBELL KH ; MCWHIR J ; RITCHIE WA ; WILMUT I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. 1996, vol. 380, 64-66 [0085]
- CASELLAS R ; SHIH TA ; KLEINWITFELT M ; RAKONJAC J ; NEMAZEE D ; RAJEWSKI K ; NUSSENZWEIG MC. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science*. 2001, vol. 291, 1541-1544
- COCKETT MI ; SEBBINGTON CR ; YARRANTON GT. High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamate synthetase gene amplification. *Biotechnology*. 1990, vol. 8, 662-667
- DE KRUIF J ; TERSTAPPEN L ; BOEL E ; LOGTENBERG T. Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995, vol. 92, 3938
- DE KRUIF J ; BOEL E ; LOGTENBERG T. Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J Mol Biol*. 1995, vol. 248, 97
- DINNYES A ; DE SOUSA P ; KING T ; WILMUT I. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. *Cloning Stem Cells*. 2002, vol. 4, 51-56
- FLAVELL DJ ; NOSS A ; PULFORD KA ; LING N ; FLAVELL SU. Systemic therapy with 3E1T, a triple combination cocktail of anti-CD19, -CD22, and -CD38-saporin immunotoxins, is curative of human B-cell lymphoma in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res*. 1997, vol. 57, 4824-4829
- FISHWILD DM ; O'DONNELL SL ; BENGEOCHEA T ; HUDSON DV ; HARDING F ; BERNHARD SL ; JONES D ; KAY RM ; HIGGINS KM ; SCHRAMM SR. High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minitocus transgenic mice. *Nat Biotechnol*. 1996, vol. 14, 845-51
- GARNICK RL. Peptide mapping for detecting variants in protein products. *Develop. Biol. Standard*. 1992, vol. 76, 117-130
- GELPI E. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography A*. 1995, vol. 703, 59-80
- GHETIE M-A ; PODAR EM ; ILGEN A ; GORDON BE ; UHR JW ; VITETTA ES. Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, vol. 94, 7509-7514
- GIDDINGS G ; ALLISON G ; BROOKSD ; CARTER A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* 2000, vol. 18, 1151-1155 [0085]
- GORMAN C ; BULLOCK C. Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol*. 2000, vol. 11, 455-460
- HIATT A ; CAFFERKEY R ; BOWDISH K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*. 1989, vol. 342, 76-78
- HULS, G. A. ; HEIJNEN, I. A. ; CUOMO, M. E. ; KONINGSBERGER, J. C. ; WIEGMAN, L. ; BOEL, E. ; VAN DER VUURST DE VRIES, A. R. ; LOYSON, S. A. ; HELFRICH, W. ; VAN BERGE HENEGOUWEN, G. P. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnol* 1999, vol. 17, 276-281
- JESPERSEN LS ; ROBERTS A ; MAHLER SM ; WINTER G ; HOOGENBOOM HR. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology*. 1994, vol. 12, 899-903
- JONES, D. ; KROOS, N. ; ANEMA, R. ; VAN MONTFORT, B. ; VOOGS, A. ; VAN DER KRAATS, S. ; VAN DER HELM, E. ; SMITS, S. ; SCHOUTEN, J. ; BROUWER, K. High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6. *Biotechnol Prog.*, 2003, vol. 19, 163-168
- KIM SJ ; KIM NS ; RYU CJ ; HONG HJ ; LEE GM. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng*. 1998, vol. 58, 73-84
- KOHLER G ; MILLSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975, vol. 256, 495-497
- KOOPMAN G ; REUTELINGSPERGER CP ; KUIJTEN GA ; KEEHNEN RM ; PALS ST ; VAN OERS MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994, vol. 84, 1415-1420
- LARRICK JW ; THOMAS DW. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001, vol. 12, 411-418

- * MASSENGALE WT ; MCBURNEY E ; GURTLE J. CD20-negative relapse of cutaneous B-cell lymphoma after anti-CD20 monoclonal antibody therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2002, vol. 46, 441-443 [0085]
- * MENDEZ MJ ; GREEN LL ; CORVALAN JR ; JIA XC ; MAYNARD-CURRIE CE ; YANG XD ; GALLO ML ; LOUIE DM ; LEE DY ; ERICKSON KL. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat. Genet.*, 1997, vol. 15, 146-56
- * MERCHANT AM ; ZHU Z ; YUAN JQ ; GODDARD A ; ADAMS CW ; PRESTA LG ; CARTER P. An efficient route to human bispecific IgG. *Nat. Biotech.*, 1998, vol. 16, 677-681
- * NEMAZEE D. Receptor editing in B-cells. *Adv. Immunol.*, 2000, vol. 74, 89-126
- * NESSIMA ; HOOGENBOOM HR ; TOMLINSON IM ; FLYNN G ; MIDGLEY C ; LANE D ; WINTER G. Antibody fragments from a "single pot" phage display library as immunological reagents. *EMBO J.*, 1994, vol. 13, 892-898
- * NOWAKOWSKI A ; WANG C ; POWERS DB ; AMERSDORFER P ; SMITH TJ ; MONTGOMERY VA ; SHERIDAN R ; BLAKER R ; SMITH LA ; MARKS JD. Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoconal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, 11346-11350
- * PATEL AK ; BOYD PN. An improved assay for antibody dependent cellular cytotoxicity based on time resolved fluorometry. *Journal of Immunological Methods*, 1995, vol. 184, 29-38
- * PEETERS K ; DE WILDE C ; DE JAEGER G ; ANGENON G ; DEPICKER A. Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine*, 2001, vol. 19, 2756-2761
- * POLLOCK DP ; KUTZKO JP ; BIRCK-WILSON E ; WILLIAMS JL ; ECHELARD Y ; MEADE HM. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J. Immunol. Methods*, 1999, vol. 231, 147-157
- * RADIC MC ; MASCELLI MA ; SHAN H ; WEIGERT M. Ig H and L chain contributions to autoimmune specificities. *J. Immunol.*, 1991, vol. 146, 176-192
- * SCHNIEKE AE ; KIND AJ ; RITCHIE WA ; MYCOCK K ; SCOTT AR ; RITCHIE M ; WILMUT I ; COLMAN A ; CAMPBELL KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, vol. 278, 2130-2133
- * SEGAL DM ; WEINER GJ ; WEINER LM. Introduction: bispecific antibodies. *J. Immunol. Methods*, 2001, vol. 248, 1-6
- * SHIELDS RL ; NAMENUKAK ; HONG K ; GLORIA MENG Y ; RAE J ; BIGGS J ; XIE D ; LAI J ; STADLEN A ; LI B. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII and Fcγn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 6591-6604
- * SPIRIDON CI ; GHETIE MA ; UHR J ; MARCHES R ; LI JL ; SHEN GL ; VITETTA ES. Targeting multiple her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antitumor activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.*, 2002, vol. 8, 1720-1730
- * VAN DER VUURST DE VRIES A ; LOGTENBERG T. Dissecting the human peripheral B-cell compartment with phage display-derived antibodies. *Immunology*, 1999, vol. 96, 55-62
- * VAUGHAN TJ ; WILLIAMS AJ ; PRITCHARD K ; OSBOURN JK ; POPE AR ; EARNSHAW JC ; MCCAFFERTY J ; HODITS RA ; WILTON J ; JOHNSON KS. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotech.*, 1996, vol. 14, 309-314
- * WILMUT I ; CLARK AJ. Basic techniques for transgenesis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1991, vol. 43, 265-275
- * WILMUT I ; SCHNIEKE AE ; MCWHIR J ; KIND AJ ; CAMPBELL KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, vol. 385, 810-813
- * WILSON TJ ; KOLA I. The LoxP/CRE system and genome modification. *Methods Mol. Biol.*, 2001, vol. 158, 83-94
- * YELVERTON E ; NORTON S ; OBIJESKI JF ; GOEDDEL DV. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science*, 1983, vol. 219, 614-620
- * YOO EM ; COLOMA MJ ; TRINH KR ; NGUYEN TG ; VUONG LU ; MORRISON SL ; CHINTALACHARUVU KR. Structural requirements for polymeric immunoglobulin assembly and association with J chain. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 33771-33777