

(22) Data de pedido: **2002.05.07**

(30) Prioridade(s): **2001.05.25 US 293473 P**
2001.06.04 US 294981 P
2001.08.02 US 309176 P
2001.09.21 US 323807 P
2001.10.09 US 327364 P

(43) Data de publicação do pedido: **2005.09.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.09.18**
237/2013

(73) Titular(es):

HUMAN GENOME SCIENCES, INC.
14200 SHADY GROVE ROAD ROCKVILLE, MD
20850 US

(72) Inventor(es):

CRAIG A. ROSEN US
STEVEN M. RUBEN US
THEODORA SALCEDO US
VIVIAN R. ALBERT US
CLARIE LOUISE DOBSON GB

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS QUE SE LIGAM IMUNOESPECIFICAMENTE AOS RECEPTORES DE TRAIL**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A ANTICORPOS E MOLÉCULAS RELACIONADAS QUE SE LIGAM IMUNOESPECIFICAMENTE AO RECEPTOR DE TRAIL, TR4. TAIS ANTICORPOS TÊM APLICAÇÃO, POR EXEMPLO, NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE CANCROS E OUTROS DISTÚRBIOS PROLIFERATIVOS. A INVENÇÃO REFERE-SE TAMBÉM A MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICAM ANTICORPOS ANTI-TR4, VECTORES E CÉLULAS HOSPEDEIRAS CONTENDO ESTES ÁCIDOS NUCLEICOS, E MÉTODOS PARA PRODUIR OS MESMOS. A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA PREVENIR, DETECTAR, DIAGNOSTICAR, TRATAR OU MELHORAR UMA DOENÇA OU DISTÚRBIO, ESPECIALMENTE CANCRO E OUTROS DISTÚRBIOS HIPERPROLIFERATIVOS, COMPREENDENDO ADMINISTRAR A UM ANIMAL, DE UM MODO PREFERIDO UM HUMANO, UMA QUANTIDADE EFICAZ DE UM OU MAIS ANTICORPOS OU OS SEUS FRAGMENTOS OU VARIANTES, OU MOLÉCULAS RELACIONADAS QUE SE LIGAM IMUNOESPECIFICAMENTE AO RECEPTOR DE TRAIL, TR4.

RESUMO

"ANTICORPOS QUE SE LIGAM IMUNOESPECIFICAMENTE AOS RECEPTORES DE TRAIL"

A presente invenção refere-se a anticorpos e moléculas relacionadas que se ligam imuno especificamente ao receptor de TRAIL, TR4. Tais anticorpos têm aplicação, por exemplo, na prevenção e tratamento de cancros e outros distúrbios proliferativos. A invenção refere-se também a moléculas de ácido nucleico que codificam anticorpos anti-TR4, vectores e células hospedeiras contendo estes ácidos nucleicos, e métodos para produzir os mesmos. A presente invenção refere-se a métodos e composições para prevenir, detectar, diagnosticar, tratar ou melhorar uma doença ou distúrbio, especialmente cancro e outros distúrbios hiperproliferativos, compreendendo administrar a um animal, de um modo preferido um humano, uma quantidade eficaz de um ou mais anticorpos ou os seus fragmentos ou variantes, ou moléculas relacionadas que se ligam imuno especificamente ao receptor de TRAIL, TR4.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS QUE SE LIGAM IMUNOESPECIFICAMENTE AOS RECEPTORES DE TRAIL"

Campo da Invenção

A presente divulgação refere-se a anticorpos e aos seus fragmentos que se ligam imuno especificamente ao receptor de TRAIL TR4. Tais anticorpos têm aplicação, por exemplo, na prevenção e tratamento de cancros e outros distúrbios proliferativos. A divulgação refere-se também a moléculas de ácido nucleico que codificam anticorpos anti-TR4, vectores e células hospedeiras contendo estes ácidos nucleicos. A presente invenção refere-se à prevenção, detecção, diagnóstico, tratamento ou melhoria de uma doença ou distúrbio, especialmente cancro e outros distúrbios hiperproliferativos, num animal, de um modo preferido, um humano, utilizando um ou mais anticorpos ou fragmentos que se ligam imuno especificamente a TR4.

Antecedentes da Invenção

Muitas acções biológicas, por exemplo, resposta a determinados estímulos e processos biológicos naturais, são controlados por factores, tal como citocinas. Muitas citocinas actuam através de receptores activando o receptor e produzindo uma resposta intracelular.

Por exemplo, os factores de necrose tumoral (TNF) alfa e beta, são citocinas que actuam através dos receptores de TNF para regular numerosos processos biológicos, incluindo protecção contra infecção e indução de choque e doença inflamatória. As moléculas de TNF pertencem à superfamília de "ligandos de TNF", e actuam em conjunto com os seus receptores ou contra-ligandos, a superfamília dos "receptores de TNF". Até agora foram identificados pelo menos dezoito membros da superfamília de ligandos de TNF e foram caracterizados pelo menos dezanove membros da superfamília de receptores de TNF (Ver, e. g., Locksley et al., Cell (2001) 104:487-501).

Entre os ligandos estão incluídos os TNF- α , linfotoxina- α (LT- α , também conhecida como TNF- β), LT- β (presente no heterotrímico complexo LT- α 2- β), FasL, CD40L, CD27L, CD30L, 4-1BBL, OX40L e factor de crescimento de tecido nervoso (NGF). A superfamília de receptores de TNF inclui o receptor p55TNF, receptor p75TNF, proteína relacionada com o receptor de TNF, antígeno FAS ou APO-1, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, OX40, p75 de baixa afinidade e receptor de NGF (Meager, A., Biologicals, 22:291-295 (1994)).

Muitos membros da superfamília de ligandos de TNF são expressos por células T activadas, o que implica que estas sejam necessárias para as interacções das células T com outros tipos de células, o que está subjacente à ontogenia e funções celulares. (Meager, A., *supra*).

Foi obtida uma compreensão considerável das funções essenciais de vários membros da família de receptores de TNF a partir da identificação e produção de mutantes que anulam a expressão destas proteínas. Por exemplo, mutações naturais no

antigénio FAS e no seu ligando provocam doença linfoproliferativa (Watanabe-Fukunaga, R., et al., Nature 356:314 (1992)), reflectindo, eventualmente, uma insuficiência de morte celular programada. Mutações do ligando CD40 provocam um estado de imunodeficiência ligado a X, caracterizado por níveis altos de imunoglobulina M e níveis baixos de imunoglobulina G no plasma, indicando activação de células B dependente de células T defeituosa (Allen, R.C. et al., Science 259:990 (1993)). Mutações direccionadas para o receptor do factor de crescimento de tecido nervoso de baixa afinidade provocam um distúrbio caracterizado por renovação sensorial defeituosa de estruturas periféricas (Lee, K.F. et al., Cell 69:737 (1992)).

O TNF e a LT- α são capazes de ligar-se a dois receptores de TNF (os receptores de TNF de 55 e 75 kd). Um grande número de efeitos biológicos desencadeados pelos TNF e LT- α que actuam através dos seus receptores, incluem a necrose hemorrágica de tumores transplantados, citotoxicidade, um papel no choque endotóxico, inflamação, imunorregulação, proliferação e respostas antivirais, bem como protecção contra os efeitos nocivos da radiação ionizante. O TNF e a LT- α estão envolvidos na patogénese de uma grande gama de doenças, incluindo choque endotóxico, malária cerebral, tumores, doença auto-imune, SIDA e rejeição do enxerto-hospedeiro (Beutler, B. e Von Huffel, C., Science 264:667-668 (1994)). Mutações no Receptor p55 provocam maior susceptibilidade para infecção microbiana.

Além do mais, um domínio com, aproximadamente, 80 aminoácidos próximo da extremidade C-terminal do TNFR1 (p55) e Fas foi descrito como o "domínio de morte", o qual é

responsável pela transdução de sinais para a morte celular programada (Tartaglia *et al.*, *Cell* 74:845 (1993)).

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo fisiológico essencial para o desenvolvimento normal e homeostasia de organismos multicelulares (H. Steller, *Science* 267, 1445-1449 (1995)). As perturbações da apoptose contribuem para a patogénese de várias doenças humanas incluindo cancro, distúrbios neurodegenerativos e síndrome da imunodeficiência adquirida (C.B. Thompson, *Science* 267, 1456-1462 (1995)). Recentemente, tem-se centrado muita atenção na transdução de sinal e na função biológica de dois receptores de morte da superfície celular, Fas/APO-1 e TNFR-1 (J.L. Cleveland, *et al.*, *Cell* 81, 479-482 (1995); A. Fraser, *et al.*, *Cell* 85, 781-784 (1996); S. Nagata, *et al.*, *Science* 267, 1449-56 (1995)). Ambos são membros da família de receptores de TNF, a qual inclui também o TNFR-2, NGFR de baixa afinidade, CD40 e CD30, entre outros (C.A. Smith, *et al.*, *Science* 248, 1019-23 (1990); M. Tewari, *et al.*, em *Modular Texts in Molecular and Cell Biology* M. Purton, Heldin, Carl, Ed. (Chapman and Hall, London, 1995). Enquanto os membros da família são definidos pela presença de repetições ricas em cisteína nos seus domínios extracelulares, os Fas/APO-1 e TNFR-1 têm também em comum uma região de homologia intracelular, apropriadamente designada "domínio de morte", a qual é um parente distante do gene suicida da *Drosophila*, reaper (P. Golstein, *et al.*, *Cell* 81, 185-6 (1995); K. White *et al.*, *Science* 264, 677-83 (1994)). Este domínio de morte que têm em comum sugere que ambos os receptores interagem com um conjunto relacionado de moléculas de transdução de sinal que, até recentemente, permaneceram por identificar. A activação de Fas/APO-1 recruta a molécula do adaptador contendo o domínio de morte FADD/MORT1 (A.M. Chinnaiyan, *et al.*, *Cell* 81,

505-12 (1995); M. P. Boldin, et al., *J. Biol Chem* 270, 7795-8 (1995); F.C. Kischkel, et al., *EMBO* 14, 5579-5588 (1995)), a qual, por sua vez, liga-se e presumivelmente activa a FLICE/MACH1, um membro da família ICE/CED-3 de proteases pró-apoptóticas (M. Muzio et al., *Cell* 85, 817-827 (1996); M.P. Boldin, et al., *Cell* 85, 803-815 (1996)). Enquanto o papel central do Fas/APO-1 é desencadear a morte celular, o TNFR-1 pode sinalizar uma matriz de actividades biológicas variadas - muitas das quais derivam da sua aptidão para activar o NF- κ B (L.A. Tartaglia, et al., *Immunol Today* 13, 151-3 (1992)). Portanto, o TNFR-1 recruta a molécula do adaptador multivalente TRADD, o qual como a FADD, contém também um domínio de morte (H. Hsu, et al., *Cell* 81, 495-504 (1995); H. Hsu, et al., *Cell* 84, 299-308 (1996)). Através das suas associações com um número de moléculas de sinalização incluindo FADD, TRAF2 e RIP, a TRADD pode sinalizar a apoptose e activação de NF- κ B (H. Hsu, et al., *Cell* 84, 299-308 (1996); H. Hsu, et al., *Immunity* 4, 387-396 (1996)).

Um ligando de indução de apoptose relacionado com o TNF foi descrito por vários grupos e foi-lhe atribuído o nome Molécula de Indução de Apoptose I (AIM-I) (Pedido Internacional nº WO 97/33899) e ligando de indução de apoptose relacionado com o TNF ou (TRAIL) (Wiley, S.R. et al., *Immunity* 3:673-682 (1995)). Pitti, R.M. et al., referem-se à nova molécula como ligando Apo-2 ou ("Apo-2L"). Por conveniência, ele será aqui referido como TRAIL. A sequência de aminoácidos do TRAIL é dada na SEQ ID N°:66.

Ao contrário do ligando FAS, cujos transcritos parecem estar restringidos, em grande medida, às células T estimuladas, são observados níveis significativos de TRAIL em muitos tecidos

e este é, constitutivamente, transcrito por algumas linhas de células. Foi demonstrado que o TRAIL actua independentemente do ligando FAS (Wiley, S.R., *et al.* (1995)), *supra*). Estudos de Marsters, S.A. *et al.*, indicaram que o TRAIL activa rapidamente a apoptose, dentro de um quadro temporal que é semelhante à sinalização de morte pelo FAS/Apo-1L, mas muito mais rápida do que a apoptose induzida pelo TNF (*Current Biology*, 6:750-752 (1996)).

Foram identificados tanto quanto cinco receptores de TRAIL, incluindo o TR4 (também conhecido como receptor de TRAIL 1 (TRAIL-R1) e receptor de morte 4 (DR4), Pan *et al.*, *Science* 276:111-3 (1997), Pedidos de Patente Internacional nº WO98/32856, WO00/67793, WO99/37684, WO2000/34355, WO99/02653, SEQ ID N°:1); TR7 (também referido como receptor de TRAIL 2 (TRAIL-R2), DR5 e KILLER, Pan *et al.*, *Science* 277:815-8 (1997), Sheridan *et al.*, *Science* 277:818-21 (1997), Chaudhury *et al.*, *Immunity* 7:821-30 (1997), Pedidos de Patente Internacional nº WO98/46643, WO99/09165, WO99/11791, WO98/41629, WO00/66156, e WO98/35986, SEQ ID N°:3); TR1 (também referido como factor inibidor da osteoclastogénese (OCIF) de Osteoprotegerina (OPG), TNFRSF11B, e FTHMA-090 (Pedidos de Patente Internacional nº WO98/12344, WO2000/54651, WO2001/04137, WO66/26217, WO98/07840, WO2000/21554, WO99/53942 e WO2001/03719, SEQ ID N°:5); TR5 (também referido como receptor de TRAIL 3 (TRAIL-R3), receptor chamariz 1 (DcR1) e TRID) (Degli-Esposti *et al.*, *J. Exp. Med.* 186:1165-70 (1997), Pedidos de Patente Internacional nº WO98/30693, WO00/71150, WO99/00423, EP867509, WO98/58062, SEQ ID N°:2); e TR10 (também referido como Receptor de TRAIL 4 (TRAIL-R4), DcR2, e TRUNDD, Pan *et al.*, *FEBS Lett.* 424:41-5 (1998), Degli-Esposti *et al.*, *Immunity* 7:813-20 (1997), Pedidos de Patente Internacional nº WO98/54202, WO00/73321,

WO2000/08155, WO99/03992, WO 2000/34355 e WO9910484, SEQ ID N°:4). Os TR4 e TR7 contêm domínios de morte nas suas caudas citoplasmáticas e a activação destes receptores resulta em apoptose. Por outro lado, os TR1, TR5 e TR10 podem inibir a apoptose induzida pelo ligando citotóxico TRAIL, em parte devido aos seus domínios de morte citoplasmáticos, ausentes ou truncados, respectivamente.

Os efeitos dos ligandos da família de TNF e dos receptores da família de TNF são vários e influenciam muitas funções, normais como anormais, nos processos biológicos do sistema mamífero. Portanto, existe uma necessidade evidente de identificar e caracterizar composições, tal como anticorpos, que influenciem a actividade biológica dos receptores de TNF, normalmente e em estados patológicos. Em particular, há uma necessidade de isolar e caracterizar anticorpos que modulem as actividades biológicas dos receptores de TRAIL. Chuntharapai *et al.*, J. Immunol., 2001; 166(8):4891-4898 divulga a inibição dependente de isotipo do crescimento tumoral *in vivo* por anticorpos monoclonais para o receptor de morte. O documento WO 99/37684 divulga anticorpos para o receptor de morte 4 (DR4), os quais reagem de forma cruzada com o Apo-2 e as suas utilizações. O documento WO 00/73349 divulga anticorpos para o DR4, os quais reagem de forma cruzada com o Apo-2 e as suas utilizações.

Sumário da Invenção

A presente divulgação abrange anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que se ligam imuno especificamente

a um polipéptido de TR4. Em particular, a invenção proporciona um anticorpo ou o seu fragmento compreendendo: (a) a sequência de aminoácidos do domínio VH da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos do domínio VH expresso pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570; e (b) a sequência de aminoácidos do domínio VL da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos do domínio VL expresso pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570, em que o referido anticorpo ou o seu fragmento liga imunoespecificamente TR4. A invenção proporciona também um anticorpo ou o seu fragmento compreendendo: (a) a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VH da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VH expressas pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570; e (b) a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VL da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VL expressas pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570, em que o referido anticorpo ou o seu fragmento liga imunoespecificamente TR4.

A presente invenção proporciona também um método de detecção da expressão de um polipéptido de TR4 compreendendo: (a) analisar a expressão de um polipéptido de TR4 numa amostra biológica de um indivíduo utilizando o anticorpo ou o seu fragmento da invenção; e (b) comparar o nível de um polipéptido de TR4 com um nível padrão de um polipéptido receptor de TRAIL. Em formas de realização extremamente preferidas, a presente invenção refere-se à prevenção, tratamento ou melhoria de cancro e outros distúrbios hiperproliferativos (e. g., leucemia, carcinoma e linfoma). Outras doenças e distúrbios que podem ser tratados, prevenidos ou melhorados com os anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, distúrbios neurodegenerativos (e. g., doença de Parkinson, doença de Alzheimer e doença de Huntington), distúrbios imunológicos (e. g., lúpus, artrite reumatóide, esclerose múltipla, miastenia

grave, doença de Hashimoto e síndrome de imunodeficiência), distúrbios inflamatórios (e. g., asma, distúrbios alérgicos e artrite reumatóide), doenças infecciosas (e. g., SIDA, infecções virais por herpes e outras infecções virais) e distúrbios proliferativos.

A invenção proporciona também o anticorpo ou o seu fragmento da invenção para ser utilizado num método de tratamento, prevenção ou melhoria de um cancro, em que o método compreende administrar o referido anticorpo ou o seu fragmento a um animal. Em formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da presente invenção são para ser utilizados em métodos para prevenir, tratar ou melhorar os seguintes tipos de cancro: cancro da mama, cancro do pulmão, (incluindo cancro das células não pequenas do pulmão), cancro do cólon, cancro do aparelho urinário, cancro da bexiga, cancro do rim, cancro pancreático, cancro do fígado, cancro do estômago, cancro da próstata, leucemia, linfoma Não-Hodgkin, cancro esofágico, cancro do cérebro, leucemia, cancro do ovário, cancro testicular, melanoma, cancro do útero, cancro cervical, cancro da laringe, cancro rectal e cancros da cavidade oral. Em formas de realização específicas, os anticorpos da invenção são administrados em associação com quimioterapêuticos, tais como paclitaxel (Taxol), irinotecano (Camptosar, CPT-11), análogos de irinotecano e gencitabina (GEMZAR™).

A presente invenção proporciona também um método de detecção, diagnóstico, prognóstico ou acompanhamento de cancros e outros distúrbios hiperproliferativos compreendendo: (a) analisar a expressão de um polipéptido de TR4 numa amostra biológica de um indivíduo utilizando o anticorpo ou o seu fragmento da invenção; e (b) comparar o nível de um polipéptido

de TR4 com um nível padrão de polipéptido de TR4. Em formas de realização extremamente preferidas, a presente invenção refere-se à detecção, diagnóstico ou prognóstico de cancros e outros distúrbios hiperproliferativos (e. g., leucemia, carcinoma e linfoma). Outras doenças e distúrbios que podem ser detectados, diagnosticados ou prognosticados com os anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, distúrbios neurodegenerativos (e. g., doença de Parkinson, doença de Alzheimer e doença de Huntington), distúrbios imunológicos (e. g., lúpus, artrite reumatóide, esclerose múltipla, miastenia grave, doença de Hashimoto e síndrome de imunodeficiência), distúrbios inflamatórios (e. g., asma, distúrbios alérgicos e artrite reumatóide), doenças infecciosas (e. g., SIDA, infecções pelo vírus do herpes e outras infecções virais) e distúrbios proliferativos.

Outra forma de realização da presente invenção inclui a utilização dos anticorpos da invenção como uma ferramenta de diagnóstico para seguir a expressão da expressão de TR4 em células. Em particular, a invenção proporciona um método de detecção da expressão do polipéptido de TR4 compreendendo: (a) analisar um polipéptido de TR4 numa amostra biológica de um indivíduo utilizando o anticorpo ou o seu fragmento da invenção; e (b) comparar o nível de um polipéptido de TR4 com um nível padrão de um polipéptido receptor de TRAIL.

A actual requerente produziu Fv de cadeia simples (scFvs) que ligam imuno especificamente polipéptidos de TR4 (e. g., SEQ ID N°:1). Estes scFvs são listados no Quadro 1. Além disso, as linhas de células manipuladas para expressar anticorpos correspondentes a estes scFvs estão depositadas junto da American Type Culture Collection ("ATCC") desde as datas

listadas no Quadro 1 e foram-lhes dados os Números de Depósito ATCC no Quadro 1. A ATCC está localizada na 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EUA. O depósito na ATCC foi realizado de acordo com os termos do Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de microrganismos para efeitos de procedimento de patente.

São também aqui descritos polinucleótidos que codificam os scFvs, bem como as sequências de aminoácidos que codificam os scFvs. São também aqui descritas moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos ou variantes destes scFvs (e. g., domínios VH, CDR de VH, domínios VL ou CDR de VL possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer um dos scFvs referidos no Quadro 1), que se ligam imunoespecificamente a TR4 ou seus fragmentos ou variantes, assim como o são as moléculas de ácido nucleico que codificam estes anticorpos e/ou moléculas. São também aqui descritos anticorpos, ou os seus fragmentos ou variantes, que se ligam às regiões/domínios extracelulares de TR4 ou os seus fragmentos e variantes.

A presente invenção proporciona também anticorpos da invenção que estão acoplados a uma etiqueta detectável, tal como uma enzima, uma etiqueta fluorescente, uma etiqueta luminescente ou uma etiqueta bioluminescente. A presente invenção proporciona também anticorpos da invenção que estão acoplados a um agente terapêutico ou citotóxico. A presente invenção proporciona também anticorpos da invenção que estão acoplados a um material radioactivo.

A presente invenção proporciona também anticorpos da invenção que actuam como agonistas de TR4. Em formas de realização específicas, os anticorpos da invenção estimulam a

apoptose de células que expressam TR4. Noutras formas de realização específicas, os anticorpos da invenção inibem a ligação de TRAIL a TR4. Noutras formas de realização específicas, os anticorpos da invenção regulam positivamente a expressão de TR4.

São também aqui descritos anticorpos que inibem a apoptose de células que expressam TR4 e anticorpos que regulam negativamente a expressão de TR4.

Noutras formas de realização, os anticorpos da invenção têm uma constante de dissociação (K_D) de 10^{-7} M ou inferior. Em formas de realização preferidas, os anticorpos da invenção têm uma constante de dissociação (K_D) de 10^{-9} M ou inferior.

A presente invenção proporciona ainda anticorpos da invenção que estimulam a apoptose de células que expressam TR4 melhor do que uma concentração igual de polipéptido TRAIL estimula a apoptose de células que expressam TR4.

A presente invenção proporciona ainda anticorpos da invenção que estimulam a apoptose de células que expressam TR4 igualmente bem na presença ou ausência de reagentes de reticulação de anticorpo; e/ou estimulam a apoptose com potência igual ou superior a uma concentração igual de TRAIL na ausência de um anticorpo de reticulação ou outro agente de reticulação.

Noutras formas de realização, os anticorpos da invenção têm uma velocidade de dissociação (k_{off}) de $10^{-3}/s$ ou inferior. Em formas de realização preferidas, os anticorpos da invenção têm um velocidade de dissociação (k_{off}) de $10^{-4}/s$ ou inferior. Noutras

formas de realização preferidas, os anticorpos da invenção têm uma velocidade de dissociação (k_{off}) de $10^{-5}/\text{s}$ ou inferior.

Os anticorpos da invenção ligam, de um modo preferido, o TR4 relativamente à sua aptidão para ligar outras proteínas (incluindo TR1, TR5 e TR10).

Em certas formas de realização, as propriedades dos anticorpos da presente invenção, como detalhadas nos Exemplos abaixo, tornam os anticorpos melhores agentes terapêuticos do que os anticorpos de ligação a TR4 anteriormente descritos.

São também aqui descritos painéis de anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos ou variantes de anticorpo) em que os membros do painel correspondem a um, dois, três, quatro, cinco, dez, quinze, vinte ou mais anticorpos da invenção diferentes (e. g., anticorpos inteiros, Fabs, fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fd, Fvs ligados por dissulfureto (sdFvs), anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) e scFvs). São também aqui descritas misturas de anticorpos, em que a mistura corresponde a um, dois, três, quatro, cinco, dez, quinze, vinte ou mais anticorpos da invenção diferentes (e. g., anticorpos inteiros, Fabs, fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fd, Fvs ligados por dissulfureto (sdFvs), anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) e scFvs)). São também aqui descritos composições compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um, dois, três, quatro, cinco, dez, quinze, vinte ou mais anticorpos da presente invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos de anticorpo). Uma composição aqui descrita pode compreender, ou alternativamente consistir de, um, dois, três, quatro, cinco, dez, quinze, vinte ou mais sequências de aminoácidos de um ou

mais anticorpos ou os seus fragmentos ou variantes. Alternativamente, uma composição aqui descrita pode compreender, ou alternativamente consistir de, moléculas de ácido nucleico que codificam um ou mais anticorpos da invenção.

São também aqui descritas proteínas de fusão compreendendo um anticorpo (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos ou variantes de anticorpo) da invenção, e um polipéptido heterólogo (*i. e.*, um polipéptido não relacionado com um anticorpo ou domínio de anticorpo). As moléculas de ácido nucleico que codificam estas proteínas de fusão são também aqui descritas. Uma composição pode compreender ou, alternativamente, consistir de, uma, duas, três, quatro, cinco, dez, quinze, vinte ou mais proteínas de fusão. Alternativamente, uma composição pode compreender ou, alternativamente consistir de, moléculas de ácido nucleico que codificam uma, duas, três, quatro, cinco, dez, quinze, vinte ou mais proteínas de fusão.

A presente invenção proporciona também uma molécula(s) de ácido(s) nucleico(s), geralmente isolada, que codifica um anticorpo (incluindo moléculas, tais como scFvs, domínios VH ou domínios VL, que compreendem, ou alternativamente consistem de, um fragmento de anticorpo do mesmo) da invenção. A presente invenção proporciona também um vector compreendendo a molécula de ácido nucleico da invenção. A presente invenção proporciona também uma célula hospedeira transformada com uma molécula de ácido nucleico da invenção e a sua descendência. Em particular, a presente invenção proporciona uma célula hospedeira compreendendo o vector da invenção ou a molécula de ácido nucleico da invenção. A presente invenção proporciona também um método para a produção de um anticorpo (incluindo uma molécula

compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um seu fragmento de anticorpo) da invenção. Em particular, a presente invenção proporciona um método de preparação de um anticorpo compreendendo: (a) expressar o anticorpo codificado pela molécula de ácido nucleico da invenção; e (b) recuperar o referido anticorpo; e proporciona um anticorpo obtenível pelo método da invenção. A presente invenção proporciona também uma linha celular manipulada para expressar o anticorpo da invenção; um anticorpo que pode ser obtido pela expressão da linha de células da invenção; uma célula que produz o anticorpo ou o seu fragmento da invenção; uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo ou o seu fragmento da invenção; e um kit compreendendo o anticorpo ou o seu fragmento da invenção. Estes e outros aspectos da invenção são descritos em mais pormenor abaixo.

Breve descrição das Figuras

Figura 1 mostra o efeito do tratamento com T1014A04 no crescimento do tumor SW480 em ratinhos Suíços nu/nu com ou sem tratamento com Topotecano a 0,3 mg/kg.

Figura 2 mostra o efeito do tratamento com T1014A04 no crescimento do tumor SW480 em ratinhos Suíços nu/nu com ou sem tratamento com Topotecano a 0,6 mg/kg.

Figura 3 mostra o efeito do tratamento com 14G03 no crescimento de tumores SW480 *in vivo* após 28 dias com e sem tratamento com Topotecano.

Descrição Detalhada da Invenção

Definições

O termo "anticorpo", como aqui utilizado, refere-se a moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente activas de moléculas de imunoglobulina, *i. e.*, moléculas que contêm um sítio de ligação de antígeno que liga imuno especificamente um antígeno. Como tal, o termo anticorpo abrange não só moléculas de anticorpo inteiro, mas também fragmentos de anticorpo. Os exemplos de moléculas que são aqui descritas pelo termo "anticorpo" incluem, mas não estão limitadas a: Fvs de cadeia simples (scFvs), fragmentos Fab, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fvs ligados por dissulfureto (sdFvs), Fvs e fragmentos compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um domínio VL ou um domínio VH. A expressão "Fv de cadeia simples" ou o termo "scFv" como aqui utilizado refere-se a um polipéptido compreendendo um domínio VL de anticorpo ligado a um domínio VH de um anticorpo. Os anticorpos que se ligam imuno especificamente a TR4 podem ter reactividade cruzada com outros antígenos. De um modo preferido, os anticorpos que se ligam imuno especificamente a TR4 não reagem de maneira cruzada com outros antígenos (*e. g.*, outros receptores de TRAIL ou outros membros da superfamília do Receptor do Factor de Necrose Tumoral). Os anticorpos que se ligam imuno especificamente a TR4 podem ser identificados, por exemplo, por imunoensaio ou outras técnicas conhecidas dos especialistas na técnica, *e. g.*, os imunoensaio descritos nos Exemplos abaixo.

Os anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, anticorpos monoclonais, multiespecíficos, humanos ou quiméricos, anticorpos de cadeia simples, fragmentos Fab,

fragmentos F(ab'), anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, e. g., anticorpos anti-Id para anticorpos da invenção), anticorpos feitos intracelularmente (i. e., intracorpos) e fragmentos de ligação a epítomos de qualquer um dos anteriores. As moléculas de imunoglobulina da invenção podem ser de qualquer tipo (e. g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (e. g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) ou subclasse de molécula de imunoglobulina. É aqui descrito um anticorpo que compreende ou, alternativamente, consiste de um domínio VH, CDR de VH, domínio VL ou CDR de VL possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das referidas no Quadro 1, ou um seu fragmento ou variante. Numa forma de realização preferida, a imunoglobulina é uma de isotipo IgG1. Noutra forma de realização preferida, a imunoglobulina é uma de isotipo IgG4. As imunoglobulinas podem ter uma cadeia pesada e cadeia leve. Uma matriz de cadeias pesadas de IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY pode ser emparelhada com uma cadeia leve das formas kappa ou lambda.

O termo "variante" como aqui utilizado refere-se a um polipéptido que possui uma função semelhante ou idêntica a um polipéptido de TR4, um fragmento de um polipéptido de TR4, um anticorpo anti-TR4 ou fragmento de anticorpo do mesmo, mas não compreende, necessariamente, uma sequência de aminoácidos semelhante ou idêntica a um polipéptido de TR4, um fragmento de um polipéptido de TR4, um anticorpo anti-TR4 ou fragmento de anticorpo do mesmo, ou possui uma estrutura semelhante ou idêntica a um polipéptido de TR4, um fragmento de um polipéptido de TR4, um anticorpo anti-TR4 ou fragmento de anticorpo do mesmo, respectivamente. Uma variante possuindo uma sequência de aminoácidos semelhante, refere-se a um polipéptido que satisfaz pelo menos uma das seguintes: (a) um polipéptido compreendendo ou, alternativamente, consistindo de uma sequência de

aminoácidos que é pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99% idêntica à sequência de aminoácidos do polipéptido de TR4 (SEQ ID N°:1), um seu fragmento, um anticorpo anti-TR4 ou fragmento de anticorpo do mesmo (incluindo um domínio VH, CDR de VH, domínio VL ou CDR de VL possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer um ou mais dos scFvs referidos no Quadro 1) aqui descrito; (b) um polipéptido codificado por uma sequência de nucleótidos, cuja sequência complementar hibridiza sob condições estridentes com uma sequência de nucleótidos que codifica o TR4 (SEQ ID N°:1), um fragmento de um polipéptido de TR4, um anticorpo anti-TR4 ou um seu fragmento de anticorpo (incluindo um domínio VH, CDR de VH, domínio VL ou CDR de VL possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das referidas no Quadro 1), aqui descrito, com pelo menos 5 resíduos de aminoácido, pelo menos 10 resíduos de aminoácido, pelo menos 15 resíduos de aminoácido, pelo menos 20 resíduos de aminoácido, pelo menos 25 resíduos de aminoácido, pelo menos 30 resíduos de aminoácido, pelo menos 40 resíduos de aminoácido, pelo menos 50 resíduos de aminoácido, pelo menos 60 resíduos de aminoácido, pelo menos 70 resíduos de aminoácido, pelo menos 80 resíduos de aminoácido, pelo menos 90 resíduos de aminoácido, pelo menos 100 resíduos de aminoácido, pelo menos 125 resíduos de aminoácido ou pelo menos 150 resíduos de aminoácido; e (c) um polipéptido codificado por uma sequência de nucleótidos que é pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99% idêntica à sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de TR4, um fragmento de

um polipéptido de TR4, um anticorpo anti-TR4 ou o seu fragmento de anticorpo (incluindo um domínio VH, CDR de VH, domínio VL ou CDR de VL possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer um ou mais dos scFvs referidos no Quadro 1), aqui descrito. Um polipéptido com estrutura semelhante a um polipéptido de TR4, um fragmento de um polipéptido de TR4, um anticorpo anti-TR4 ou fragmento de anticorpo do mesmo, aqui descrito refere-se a um polipéptido que tem uma estrutura secundária, terciária ou quaternária semelhante a um polipéptido de TR4, um fragmento de um polipéptido de TR4, um anticorpo anti-TR4 ou um seu fragmento de anticorpo, aqui descrito. A estrutura de um polipéptido pode ser determinada por métodos conhecidos dos especialistas na técnica, incluindo mas não estando limitados a, cristalografia de raios X, ressonância magnética nuclear e microscopia electrónica cristalográfica.

Para determinar a percentagem de identidade de duas sequências de aminoácidos ou de duas sequências de ácido nucleico, as sequências são alinhadas para efeitos de comparação óptima (e. g., podem ser introduzidas lacunas na sequência de uma primeira sequência de aminoácidos ou ácido nucleico para alinhamento óptimo com uma segunda sequência de aminoácidos ou ácido nucleico). Os resíduos de aminoácidos ou nucleótidos em posições de aminoácidos ou posições de nucleótidos correspondentes são, em seguida, comparados. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido ou nucleótido que na posição correspondente da segunda sequência, então as moléculas são idênticas nessa posição. A percentagem de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas partilhadas pelas sequências (i. e., % de identidade = número de posições sobrepostas

idênticas/número total de posições $\times 100\%$). Numa forma de realização, as duas sequências são do mesmo comprimento.

A determinação da percentagem de identidade entre duas sequências pode ser efectuada utilizando um algoritmo matemático conhecido dos especialistas na técnica. Um exemplo de um algoritmo matemático para comparar duas sequências é o algoritmo de Karlin e Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 87:2264-2268(1990), modificado como em Karlin e Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90:5873-5877(1993). Os programas BLASTn e BLASTx de Altschul, et al. *J. Mol. Biol.* 215:403-410(1990) têm incorporados um algoritmo desse tipo. As pesquisas de nucleótidos em BLAST podem ser realizadas com o programa BLASTn (pontuação = 100, comprimento de palavra = 12) para obter sequências de nucleótidos homólogas a uma molécula de ácido nucleico da invenção. As pesquisas de proteínas em BLAST podem ser realizadas com o programa BLASTx (pontuação = 50, comprimento de palavra = 3) para obter sequências de aminoácidos homólogas a uma molécula de proteína da invenção. Para obter alinhamentos contendo lacunas para efeitos de comparação, pode utilizar-se o Gapped BLAST como descrito em Altschul et al. *Nucleic Acids Res.* 25:3589-3402(1997). Alternativamente, pode utilizar-se o PSI-BLAST para realizar uma pesquisa iterada que detecta relações distantes entre moléculas (*Id.*). Quando se utiliza os programas BLAST, Gapped BLAST e PSI-BLAST, pode utilizar-se os parâmetros por defeito dos respectivos programas (e. g., BLASTx e BLASTn). (ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)

Outro exemplo de um algoritmo matemático utilizado para comparação de sequências é o algoritmo de Myers e Miller, CABIOS (1989). O programa ALIGN (versão 2.0), o qual faz parte do pacote de software de alinhamento de sequências GCG, tem

incorporado um algoritmo desse tipo. Outros algoritmos para análise de sequências conhecidos na técnica incluem ADVANCE e ADAM como descrito em Torellis e Robotti *Comput. Appl. Biosci.*, 10:3-5(1994); e FASTA descrito em Pearson e Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-8(1988). No FASTA, a ktup é uma opção de controlo que fixa a sensibilidade e velocidade da pesquisa.

O termo "derivado" como aqui utilizado, refere-se a um polipéptido variante que compreende ou, alternativamente, consiste de uma sequência de aminoácidos de um polipéptido de TR4, um fragmento de um polipéptido de TR4 ou um anticorpo da invenção que se liga imuno especificamente a um polipéptido de TR4, o qual foi alterado pela introdução de substituições, supressões ou adições de resíduos de aminoácidos. O termo "derivado" como aqui utilizado refere-se também a um polipéptido de TR4, um fragmento de um polipéptido de TR4, um anticorpo que se liga imuno especificamente a um polipéptido de TR4, o qual foi modificado, e. g., pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula ao polipéptido. Por exemplo, mas não a título de limitação, um polipéptido de TR4, um fragmento de um polipéptido de TR4 ou um anticorpo anti-TR4, pode ser modificado, e. g., por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivatização com grupos protectores/bloqueadores conhecidos, dissociação proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc. Um derivado de um polipéptido de TR4, um fragmento de um polipéptido de TR4 ou um anticorpo anti-TR4 pode ser modificado por modificações químicas utilizando técnicas conhecidas dos especialistas na técnica, incluindo, mas não estando limitadas a, dissociação química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Além disso, um derivado de um polipéptido de TR4, um fragmento de um polipéptido de TR4 ou um anticorpo anti-TR4 pode conter um ou

mais aminoácidos não clássicos. Um derivado de polipéptido possui uma função semelhante ou idêntica à de um polipéptido de TR4, um fragmento de um polipéptido de TR4 ou um anticorpo anti-TR4, aqui descrito.

O termo "epítomos" como aqui utilizado refere-se a porções de TR4 possuindo actividade antigénica ou imunogénica num animal, de um modo preferido um mamífero. Um epítomo possuindo actividade imunogénica é uma porção de TR4 que desencadeia uma resposta de anticorpos num animal. Um epítomo possuindo actividade antigénica é uma porção de TR4 à qual se liga imunoespecificamente um anticorpo, como se pode determinar por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, pelos imunoensaios aqui descritos. Os epítomos antigénicos não têm de ser necessariamente imunogénicos.

O termo "fragmento" como aqui utilizado refere-se a um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos de pelo menos 5 resíduos de aminoácido, pelo menos 10 resíduos de aminoácido, pelo menos 15 resíduos de aminoácido, pelo menos 20 resíduos de aminoácido, pelo menos 25 resíduos de aminoácido, pelo menos 30 resíduos de aminoácido, pelo menos 35 resíduos de aminoácido, pelo menos 40 resíduos de aminoácido, pelo menos 45 resíduos de aminoácido, pelo menos 50 resíduos de aminoácido, pelo menos 60 amino resíduos, pelo menos 70 resíduos de aminoácido, pelo menos 80 resíduos de aminoácido, pelo menos 90 resíduos de aminoácido, pelo menos 100 resíduos de aminoácido, pelo menos 125 resíduos de aminoácido, pelo menos 150 resíduos de aminoácido, pelo menos 175 resíduos de aminoácido, pelo menos 200 resíduos de aminoácido ou pelo menos 250 resíduos de aminoácido, da sequência de aminoácidos de TR4, ou um anticorpo anti-TR4 (incluindo moléculas, tal como scFvs que compreendem,

ou alternativamente consistem de fragmentos de anticorpo ou seus variantes).

A expressão "proteína de fusão", como aqui utilizada refere-se a um polipéptido que compreende ou, alternativamente, consiste de uma sequência de aminoácidos de um anticorpo anti-TR4 da invenção e uma sequência de aminoácidos de um polipéptido heterólogo (*i. e.*, um polipéptido não relacionado com um anticorpo ou domínio de anticorpo).

A expressão "célula hospedeira" como aqui utilizada refere-se à célula objecto particular transfectada com uma molécula de ácido nucleico e à descendência ou potencial descendência de uma tal célula. A descendência pode não ser idêntica à célula-mãe transfectada com a molécula de ácido nucleico devido a mutações ou influências ambientais que possam ocorrer nas gerações seguintes ou integração da molécula de ácido nucleico no genoma da célula hospedeira.

Os anticorpos da presente invenção são, de um modo preferido, proporcionados numa forma isolada e, de um modo preferido, estão substancialmente purificados. Por "isolado" pretende referir-se um anticorpo retirado do seu ambiente nativo. Assim, por exemplo, um polipéptido produzido e/ou contido dentro de uma célula hospedeira recombinante é considerado isolado para os fins da presente invenção.

Estrutura do Anticorpo

Sabe-se que a unidade estrutural básica de anticorpo compreende um tetrâmero. Cada tetrâmero é constituído por dois

pares idênticos de cadeias polipeptídicas, possuindo cada par uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" (cerca de 50-70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos essencialmente responsáveis pelo reconhecimento do antigénio. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante essencialmente responsável pela função efectora. As cadeias leves humanas são classificadas como cadeias leves kappa e lambda. As cadeias pesadas são classificadas como mu, delta, gama, alfa ou épsilon, e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. *Ver em geral, Fundamental Immunology* Capítulo 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.I. (1989)). As regiões variáveis de cada par cadeia leve/pesada formam o sítio de ligação do anticorpo.

Assim, um anticorpo IgG intacto tem dois sítios de ligação. À excepção de anticorpos bifuncionais ou biespecíficos, os dois sítios de ligação são iguais.

As cadeias apresentam todas a mesma estrutura geral de regiões estruturais (FR) relativamente conservadas unidas por três regiões hipervariáveis, também chamadas regiões determinantes de complementaridade ou CDR. As CDR das cadeias pesada e leve de cada par são alinhadas pelas regiões estruturais, permitindo a ligação a um epítipo específico. A partir da extremidade N-terminal para a C-terminal, ambas as cadeias leve e pesada compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A atribuição dos aminoácidos a cada domínio está de acordo com as definições de Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 e 1991)), ou Chotia & Lesk *J Mol.*

Biol. 196:901-917 (1987); Chotia et al. *Nature* 342:878-883 (1989).

Um anticorpo biespecífico ou bifuncional é um anticorpo híbrido artificial possuindo dois pares de cadeia pesada/leve diferentes e dois sítios de ligação diferentes. Os anticorpos biespecíficos podem ser produzidos por uma variedade de métodos incluindo fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Ver, e. g., Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. *J Immunol.* 148:1547-1553 (1992). Além disso, os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como "diacorpos" (Holliger et al. "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments" *PNAS EUA* 90:6444-6448 (1993)) ou "Janusinas" (Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" *EMBO J* 10:3655-3659 (1991) e Traunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992)).

A produção de anticorpos biespecíficos pode ser um processo relativamente trabalhoso em comparação com a produção de anticorpos convencionais e os rendimentos e grau de pureza são geralmente inferiores para os anticorpos biespecíficos. Os anticorpos biespecíficos não existem na forma de fragmentos possuindo um único sítio de ligação (e. g., Fab, Fab', e Fv).

Anticorpos anti-TR4

Utilizando tecnologia de apresentação em fago, a actual requerente identificou moléculas de anticorpo de cadeia simples ("scFvs") que se ligam imuno-especificamente a TR4 (ou os seus

fragmentos ou variantes). As moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos ou variantes destes scFvs (e. g., incluindo domínios VH, CDR de VH, domínios VL ou CDR de VL possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das referidas no Quadro 1) que se ligam imuno especificamente a TR4 (ou aos seus fragmentos ou variantes) também são abrangidos pela invenção, assim como o são as moléculas de ácido nucleico que codificam estes scFvs e/ou moléculas.

São aqui descritos scFvs compreendendo ou, alternativamente, consistindo de uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo de SEQ ID N°: 42-53, de um modo preferido, SEQ ID N°:42 e 43 como referidas no Quadro 1 abaixo. São também aqui descritas moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos ou variantes destes scFvs (e. g., incluindo domínios VH, CDR de VH, domínios VL ou CDR de VL possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das referidas no Quadro 1) que se ligam imuno especificamente a TR4, assim como o são as moléculas de ácido nucleico que codificam estes scFvs e/ou moléculas (e. g., SEQ ID N°:54-65).

Os ScFvs correspondentes às SEQ ID N°:42-53 foram seleccionados pela sua aptidão para ligar o polipéptido de TR4.

A presente invenção proporciona anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que se ligam imuno especificamente a um polipéptido ou um fragmento de polipéptido de TR4. Em particular, a invenção proporciona um anticorpo ou o seu fragmento compreendendo (a) a sequência de aminoácidos do domínio VH da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos do domínio VH expresso pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570

e (b) a sequência de aminoácidos do domínio VL da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos do domínio VL expresso pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570, em que o referido anticorpo ou o seu fragmento liga imuno especificamente o TR4; e um anticorpo ou o seu fragmento compreendendo (a) a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VH da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VH expressas pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570 e (b) a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VL da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VL expressas pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570, em que o referido anticorpo ou o seu fragmento liga imuno especificamente o TR4. Outros anticorpos aqui descritos correspondem aos scFvs referidos no Quadro 1. Tais scFvs podem ser rotineiramente "convertidos" em moléculas de imunoglobulina, por exemplo, inserindo as sequências de nucleótidos que codificam os domínios VH e/ou VL do scFv num vector de expressão que contém as sequências dos domínios constantes e manipulado para coordenar a expressão da molécula de imunoglobulina, como descrito em mais pormenor no Exemplo 5 abaixo.

As linhas de células NS0 que expressam os anticorpos de IgG1 que compreendem os domínios VH e VL dos scFvs foram depositadas na American Type Culture Collection ("ATCC") nas datas listadas no Quadro 1 e dados os Números de Depósito na ATCC identificados no Quadro 1. A ATCC está localizada na 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EUA. O depósito na ATCC foi feito de acordo com os termos do Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de microrganismos para efeitos de procedimento de patente.

São aqui descritos anticorpos que compreendem os domínios VH e VL dos scFvs no Quadro 1.

Numa forma de realização preferida, um anticorpo da invenção é o anticorpo expresso pela linha de células TRAIL (NSO) 14G03 N° 39 P:14 7/2/01 (ver Quadro 1).

É também aqui descrito um anticorpo expresso pela linha de células NSO α TRAIL 1985 BU N°81 P:15 6/21/01 (ver Quadro 1).

É também aqui descrito um anticorpo expresso pela linha de células NSO anti-TRAIL 14F08 N°28 P:11 (ver Quadro 1).

Quadro 1: scFvs que se ligam imuno especificamente aos receptores de TRAIL

scFv	proteína scFv SEQ ID Nº:	ADN de scFv SEQ ID Nº:	AAs do domínio VH	AAs da CDR1 de VH	AAs da CDR2de VH	AAs da CDR3de VH	AAs do domínio VL	AAs da CDR1de VL	AAs da CDR2de VL	AAs da CDR3de VL	Linha de Células que Expressam o anticorpo	Número de Depósito ATCC	Data de Depósito ATCC
T1014A04	42	54	1-118	26-35	50-66	99-107	135-245	157-170	186-192	225-234	NSO α TRAIL 1985 BU Nº81 P:15 6/21/01	PTA-3571	30 de Julho de 2001
T1014G03	43	55	1-118	26-35	50-66	99-107	135-245	157-170	186-192	225-234	TRAIL (NSO) 14G03 Nº39 P:14 7/2/01	PTA-3570	30 de Julho de 2001
T1014A02	44	56	1-116	26-35	50-65	98-105	134-244	156-168	184-190	223-233			
T1014A12	45	57	1-118	26-35	50-66	99-107	135-245	157-170	186-192	225-234			
T1014B01	46	58	1-118	26-35	50-66	99-107	135-245	157-170	186-192	225-234			
T1014B11	47	59	1-118	26-35	50-66	99-107	135-245	157-170	186-192	225-234			
T1014F08	48	60	1-118	26-35	50-66	99-107	135-245	157-170	186-192	225-234	NSO anti- TRAIL 14F08 Nº28 P:11	PTA-3675	29 de Agosto de 2001
T1014G04	49	61	1-118	26-35	50-66	99-107	135-245	157-170	186-192	225-234			
T1015A02	50	62	1-123	26-37	52-67	100-112	140-250	162-174	190-196	229-239			
T1015A07	51	63	1-118	26-35	50-66	99-107	135-245	157-170	186-192	225-234			
T1015E01	52	64	1-118	26-35	50-66	99-107	135-245	157-170	186-192	225-234			
T1006F07	53	65	1-125	26-35	50-66	99-114	142-249	164-174	190-196	229-238			

A presente invenção abrange anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que se ligam imuno especificamente a TR4. Um polipéptido de TR4 inclui, mas não está limitado a, TR4 (SEQ ID N°:1) ou o polipéptido codificado pelo ADNc do clone HCUDS60 contido no Depósito ATCC 97853 depositado em 21 de Janeiro de 1997. São também aqui descritos anticorpos que se podem ligar imuno especificamente a TR4 como descrito acima e a TR7 (SEQ ID N°:3) ou o polipéptido codificado pelo ADNc no clone HLYBX88 contido no Depósito ATCC 97920 depositado em 7 de Março de 1997. Os receptores de TRAIL podem ser produzidos através da expressão recombinante de ácidos nucleicos que codificam os polipéptidos da SEQ ID N°:1-5, (TR4, TR5, TR7, TR10 e TR1; e. g., os ADNc nos Depósitos ATCC Números 97853, (TR4) 97798 (TR5, depositado em 20 de Novembro de 1996), 97920 (TR7) ou 209040 (TR10, depositado em 15 de Maio de 1997).

Os anticorpos da invenção ligam de um modo preferido o TR4 (SEQ ID N°:1) relativamente à sua aptidão para ligar outras proteínas incluindo TR1, TR5, TR7 ou TR10 (SEQ ID N°: 5, 2, 3 e 4) ou os seus fragmentos, variantes ou proteínas de fusão dos mesmos. São também aqui descritos anticorpos que se ligam, de um modo preferido, a TR4 e a TR7 (SEQ ID N°:1 e 3) ou os seus fragmentos ou variantes, relativamente à sua aptidão para ligar outras proteínas incluindo TR1, TR5 ou TR10 (SEQ ID N°: 5, 2 e 4) ou os seus fragmentos, variantes ou proteínas de fusão. São também aqui descritos anticorpos que ligam TR1 TR4, TR5, TR7 e TR10 (SEQ ID N°: 5, 1, 2, 3 e 4). A aptidão de um anticorpo para ligar de um modo preferido um antígeno em comparação com outro antígeno pode ser determinada utilizando qualquer método conhecido na técnica.

Polipéptidos de TR4

Os anticorpos da presente invenção ligam imunoespecificamente o TR4. A secção seguinte descreve em mais pormenor os polipéptidos, fragmentos e variantes de TR4 que podem ser ligados pelos anticorpos da invenção. Os polipéptidos, fragmentos e variantes de TR4 que podem ser ligados pelos anticorpos da invenção são também descritos nas Publicações Internacionais com os Números, por exemplo, W098/32856 e W000/67793.

Os anticorpos da presente invenção ligam imunoespecificamente o polipéptido de TR4. Um anticorpo que liga imunoespecificamente TR4 pode, nalgumas formas de realização, ligar fragmentos, variantes (incluindo ortólogos de espécie de TR4), multímeros ou formas modificadas de TR4. Por exemplo, um anticorpo imuno específico para TR4 pode ligar a unidade TR4 de uma proteína de fusão compreendendo a totalidade ou uma porção de TR4.

As proteínas de TR4 podem encontrar-se como monómeros ou multímeros (*i. e.*, dímeros, trímeros, tetrâmeros e multímeros superiores). Por conseguinte, a presente invenção refere-se a anticorpos que ligam proteínas de TR4 presentes como monómeros ou como parte de multímeros. Em formas de realização específicas, os anticorpos da invenção ligam monómeros, dímeros, trímeros ou tetrâmeros de TR4. Em formas de realização adicionais, os anticorpos da invenção ligam pelo menos dímeros, pelo menos trímeros ou pelo menos tetrâmeros contendo um ou mais polipéptidos de TR4.

Os anticorpos da invenção podem ligar homómeros ou heterómeros de TR4. Como aqui utilizado, o termo homómero, refere-se a um multímero contendo apenas proteínas de TR4 (incluindo fragmentos, variantes e proteínas de fusão de TR4, como aqui descritos). Estes homómeros podem conter proteínas de TR4 possuindo sequências polipeptídicas idênticas ou diferentes. Numa forma de realização específica, um homómero é um multímero contendo apenas proteínas de TR4 possuindo uma sequência polipeptídica idêntica. Noutra forma de realização específica, os anticorpos da invenção ligam homómeros de TR4 contendo proteínas de TR4 possuindo sequências polipeptídicas diferentes. Em formas de realização específicas, os anticorpos da invenção ligam um homodímero de TR4 (e. g., contendo proteínas de TR4 possuindo sequências polipeptídicas idênticas ou diferentes). Em formas de realização adicionais, os anticorpos da invenção ligam pelo menos um homodímero, pelo menos um homotrímero ou pelo menos um homotetrâmero de TR4.

Em formas de realização específicas, os anticorpos da presente invenção ligam homotrímeros de TR4 (e. g., contendo proteínas de TR4 possuindo sequências polipeptídicas idênticas ou diferentes).

Como aqui utilizado, o termo heterómero refere-se a um multímero contendo proteínas heterólogas (*i. e.*, proteínas contendo sequências polipeptídicas que não correspondem a uma sequência polipeptídica codificada pelo gene de TR4) além da proteínas de TR4. Numa forma de realização específica, os anticorpos da invenção ligam um heterodímero, um heterotrímero ou um heterotetrâmero. Em formas de realização adicionais, os anticorpos da invenção ligam pelo menos um homodímero, pelo

menos um homotrímero ou pelo menos um homotetrâmero contendo um ou mais polipéptidos de TR4.

Em formas de realização específicas, os anticorpos da presente invenção ligam um heterotrímero de TR4 (e. g., contendo 1 ou 2 proteínas de TR4 e, respectivamente, 2 ou 1 proteína(s) de TR7).

Os multímeros ligados por um ou mais anticorpos da invenção podem ser o resultado de associações hidrófobas, hidrófilas, iónicas e/ou covalentes e/ou podem ser ligados indirectamente, por exemplo, através da formação de lipossomas. Assim, numa forma de realização, os multímeros ligados por um ou mais anticorpos da invenção, tais como, por exemplo, homodímeros ou homotrímeros, são formados quando as proteínas de TR4 contactam umas com as outras em solução. Noutra forma de realização, os heteromultímeros ligados por um ou mais anticorpos da invenção, tais como, por exemplo, heterotrímeros ou heterotetrâmeros, são formados quando as proteínas contactam anticorpos para os polipéptidos de TR4 (incluindo anticorpos para a sequência polipeptídica heteróloga numa proteína de fusão) em solução. Noutras formas de realização, os multímeros ligados por um ou mais anticorpos da invenção são formados por associações covalentes com e/ou entre as proteínas de TR4. Tais associações covalentes podem envolver um ou mais resíduos de aminoácido contidos na sequência polipeptídica da proteína (e. g., a sequência polipeptídica especificada na SEQ ID N°:1 ou o polipéptido codificado pelo clone de ADNc depositado do Depósito ATCC 97853). Num caso, as associações covalentes são reticulações entre resíduos de cisteína localizados nas sequências polipeptídicas das proteínas que interagem no polipéptido nativo (*i. e.*, natural). Noutro caso, as associações

covalentes são a consequência de manipulação química ou recombinante. Alternativamente, tais associações covalentes podem envolver um ou mais resíduos de aminoácido contidos na sequência polipeptídica heteróloga numa proteína de fusão de TR4. Num exemplo, as associações covalentes são entre a sequência heteróloga contida numa proteína de fusão (ver, e. g., Patente US Número 5478925). Num exemplo específico, as associações covalentes são entre a sequência heteróloga contida numa proteína de fusão de TR4-Fc (como aqui descrita). Noutro exemplo específico, as associações covalentes de proteínas de fusão são entre sequências polipeptídicas heterólogas de outro membro dos ligandos/receptores da família de TNF que é capaz de formar multímeros covalentemente associados, tal como por exemplo, osteoprotegerina (ver, e. g., Publicação Internacional nº WO 98/49305).

Os multímeros que podem ser ligados por um ou mais anticorpos da invenção podem ser produzidos utilizando técnicas químicas conhecidas na matéria. Por exemplo, as proteínas que se deseja que estejam contidas nos multímeros podem ser quimicamente reticuladas utilizando moléculas de ligação e técnicas de optimização do comprimento da molécula de ligação conhecidas na matéria (ver, e. g., Patente US Número 5478925). Além disso, os multímeros que podem ser ligados por um ou mais anticorpos da invenção podem ser produzidos utilizando técnicas conhecidas na matéria para formar uma ou mais reticulações intermoleculares entre os resíduos de cisteína localizados na sequência polipeptídica das proteínas que se pretende que estejam contidas no multímero (ver, e. g., Patente US Número 5478925). Além disso, as proteínas que podem ser ligadas por um ou mais anticorpos da invenção podem ser rotineiramente modificadas pela adição de cisteína ou biotina à extremidade

C-terminal ou extremidade N-terminal da sequência polipeptídica da proteína e podem ser aplicadas técnicas conhecidas na técnica para produzir multímeros contendo um ou mais destas proteínas modificadas (ver, e. g., Patente US Número 5 478 925). Adicionalmente, podem ser aplicadas técnicas conhecidas na matéria para produzir lipossomas contendo os componentes proteicos que se pretende que estejam contidos no multímero que pode ser ligado por um ou mais anticorpos da invenção (ver, e. g., Patente US Número 5478925).

Alternativamente, os multímeros que podem ser ligados por um ou mais anticorpos da invenção podem ser produzidos utilizando técnicas de engenharia genética conhecidas na técnica. Numa forma de realização, as proteínas contidas nos multímeros que podem ser ligados por um ou mais anticorpos da invenção são produzidas de maneira recombinante utilizando tecnologia de proteínas de fusão aqui descrita ou, de outro modo, conhecida na técnica (ver, e. g., Patente US Número 5478925). Numa forma de realização específica, os polinucleótidos que codificam um homodímero que pode ser ligado por um ou mais anticorpos da invenção são produzidos ligando uma sequência polinucleotídica que codifica um polipéptido de TR4 com uma sequência que codifica um polipéptido de ligação e, em seguida, ainda com um polinucleótido sintético que codifica o produto traduzido do polipéptido na orientação inversa da extremidade C-terminal original para a extremidade N-terminal (que carece da sequência líder) (ver, e. g., Patente US Número 5478925). Noutra forma de realização, as técnicas recombinantes aqui descritas ou, de outro modo, conhecidas na técnica são aplicadas para produzir polipéptidos de TR4 recombinantes, os quais contêm um domínio transmembranar e os quais podem ser incorporados por técnicas de reconstituição de

membranas em lipossomas (ver, e. g., Patente US Número 5478925). Noutra forma de realização, dois ou mais polipéptidos de TR4 são unidos através de unidades de ligação sintéticas (e. g., péptidos, hidratos de carbono ou unidades de ligação de polímeros solúveis). Os exemplos incluem as unidades de ligação peptídicas descritas na Pat. U.S. nº 5073627. As proteínas compreendendo múltiplos polipéptidos de TR4 separados por unidades de ligação peptídicas podem ser produzidas utilizando tecnologia de ADN recombinante convencional. Em formas de realização específicas, os anticorpos da invenção ligam proteínas compreendendo múltiplos polipéptidos de TR4 separados por unidades de ligação peptídicas.

Outro método para preparar polipéptidos de TR4 multiméricos envolve a utilização de polipéptidos de TR4 fundidos com um fecho de leucina ou sequência polipeptídica de isoleucina. Os domínios de fecho de leucina e os domínios de fecho de isoleucina são polipéptidos que promovem a multimerização das proteínas nas quais se encontram. Os fechos de leucina foram inicialmente identificados em várias proteínas de ligação a ADN (Landschulz et al., Science 240:1759, (1988)) e têm sido desde então encontrados numa variedade de proteínas diferentes. Entre os fechos de leucina conhecidos encontram-se péptidos naturais e seus derivados que dimerizam ou trimerizam. Os exemplos de domínios de fecho de leucina adequados para produzir proteínas de TR4 multiméricas solúveis são aqueles descritos no pedido PCT WO 94/10308. As proteínas de fusão recombinantes compreendendo um polipéptido de TR4 solúvel fundido com um péptido que dimeriza ou trimeriza em solução são expressas nas células hospedeiras adequadas e o TR4 multimérico solúvel resultante é recuperado a partir do sobrenadante da cultura utilizando técnicas conhecidas na matéria. Em formas de realização

específicas, os anticorpos da invenção ligam monómeros de proteína de fusão de TR4-fecho de leucina e/ou multímeros de proteína de fusão de TR4-fecho de leucina.

Pensa-se que determinados membros da família de TNF de proteínas existem na forma trimérica (Beutler e Huffer, Science 264:667, 1994; Banner *et al.*, Cell 73:431, 1993). Assim, o TR4 trimérico pode apresentar a vantagem de uma actividade biológica melhorada. As unidades de fecho de leucina preferidas são aquelas que, de um modo preferido, formam trímeros. Um exemplo é um fecho de leucina derivado da proteína tensioactiva pulmonar D (SPD), como descrito em Hoppe *et al.* (FEBS Letters 344:191, (1994)) e no pedido de patente U.S. com o nº de Série 08/446922. Em formas de realização específicas, os anticorpos da invenção ligam os trímeros de proteína de fusão de TR4-fecho de leucina.

Podem ser utilizados outros péptidos derivados de proteínas triméricas naturais na preparação do TR4 trimérico. Em formas de realização específicas, os anticorpos da invenção ligam monómeros da proteína de fusão de TR4 e/ou trímeros da proteína de fusão de TR4.

Os anticorpos que ligam os polipéptidos do receptor TR4 podem ligá-los como polipéptidos isolados ou no seu estado natural. Por "polipéptido isolado" pretende referir-se um polipéptido retirado do seu ambiente nativo. Assim, um polipéptido produzido e/ou contido dentro de uma célula hospedeira recombinante é considerado isolado para os objectivos da presente invenção. De igual modo, são também entendidos como um "polipéptido isolado" os polipéptidos que foram, parcial ou substancialmente, purificados a partir de uma célula hospedeira recombinante. Por exemplo, uma versão produzida de modo

recombinante do polipéptido de TR4 é, substancialmente, purificada pelo método de um passo descrito em Smith e Johnson, Gene 67:31-40 (1988). Assim, os anticorpos da presente invenção podem ligar polipéptidos do receptor TR4 produzidos de modo recombinante. Numa forma de realização específica, os anticorpos da presente invenção ligam um receptor TR4 expresso na superfície de uma célula compreendendo um polinucleótido que codifica os aminoácidos 1 a 468 da SEQ ID N°:1, operacionalmente, associado a uma sequência reguladora que controla a expressão do gene.

Os anticorpos aqui descritos podem ligar fragmentos polipeptídicos de TR4 compreendendo ou, alternativamente, consistindo de uma sequência de aminoácidos contida na SEQ ID N°:1, codificada pelo ADNc contido no Depósito ATCC Número 97853 ou codificada por ácidos nucleicos que hibridizam (e. g., sob condições de hibridação estringentes) com a sequência de nucleótidos contida no Depósito ATCC Número 97853, ou com a cadeia complementar àquela. Os fragmentos de proteína podem ser "livres", ou podem estar compreendidos num polipéptido maior no qual o fragmento constitui uma parte ou região, de um modo muito preferido como uma única região contínua. Os anticorpos da presente invenção podem ligar fragmentos de polipéptido, incluindo, por exemplo, fragmentos que compreendem ou alternativamente, consistem aproximadamente dos resíduos de aminoácido: 1 a 23, 24 a 43, 44 a 63, 64 a 83, 84 a 103, 104 a 123, 124 a 143, 144 a 163, 164 a 183, 184 a 203, 204 a 223, 224 a 238, 239 a 264, 265 a 284, 285 a 304, 305 a 324, 325 a 345, 346 a 366, 367 a 387, 388 a 418, 419 a 439 e/ou 440 a 468 da SEQ ID N°:1. Neste contexto "aproximadamente" inclui o valor particularmente especificado, e maiores ou menores em vários (5, 4, 3, 2 ou 1) aminoácidos, em qualquer um dos extremos ou em

ambos os extremos. Além do mais, os fragmentos de polipéptido ligados pelos anticorpos aqui descritos podem ter pelo menos cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175 ou 200 aminoácidos de comprimento. Neste contexto "cerca de" inclui o valor particularmente especificado, e maiores ou menores em vários (5, 4, 3, 2, ou 1) aminoácidos, em qualquer um dos extremos ou em ambos os extremos.

De um modo preferido, os anticorpos aqui descritos ligam fragmentos de polipéptido seleccionados do grupo: um polipéptido compreendendo ou, alternativamente, consistindo do domínio extracelular do receptor TR4 (que se prevê que constitua os resíduos de aminoácido desde cerca de 24 até cerca de 238 na SEQ ID N°:1); um polipéptido compreendendo ou, alternativamente, consistindo de ambos os domínios ricos em cisteína de TR4 (os quais podem ser ambos encontrados no fragmento de proteína consistindo dos resíduos de aminoácido desde cerca de 131 até cerca de 229 na SEQ ID N°:1); um polipéptido compreendendo ou, alternativamente, consistindo do domínio rico em cisteína de TR4 consistindo dos resíduos de aminoácido desde cerca de 131 até cerca de 183 na SEQ ID N°:1); um polipéptido compreendendo ou, alternativamente, consistindo do domínio rico em cisteína de TR4 consistindo dos resíduos de aminoácido desde cerca de 184 até cerca de 229 na SEQ ID N°:1); um polipéptido compreendendo ou, alternativamente, consistindo do domínio transmembranar do receptor TR4 (que se prevê que constitua os resíduos de aminoácido desde cerca de 239 até cerca de 264 na SEQ ID N°:1); um polipéptido compreendendo ou, alternativamente, consistindo do fragmento do polipéptido de TR4 maduro previsto, em que o fragmento tem uma actividade funcional de TR4 (e. g., actividade antigénica ou actividade biológica); um polipéptido compreendendo ou, alternativamente, consistindo do domínio

intracelular do receptor TR4 (que se prevê que constitua os resíduos de aminoácido desde cerca de 265 até cerca de 468 na SEQ ID N°:1); um polipéptido compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos domínios extracelular e intracelular do receptor TR4 com a totalidade ou parte do domínio transmembranar suprimido; um polipéptido compreendendo ou, alternativamente, consistindo do domínio de morte do receptor TR4 (que se prevê que constitua os resíduos de aminoácido desde cerca de 379 até cerca de 422 na SEQ ID N°:1); e um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo de, um, dois, três, quatro ou mais, epítomos portadores de porções da proteína receptora TR4. Em casos adicionais, os fragmentos de polipéptido compreendem, ou alternativamente, consistem de qualquer associação de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou todos os 8 dos membros acima. Os resíduos de aminoácido que constituem os domínios extracelular, transmembranar e intracelular do receptor TR4 foram previstos por análise computacional. Assim, como um técnico médio compreenderia, os resíduos de aminoácido que constituem estes domínios podem variar ligeiramente (e. g., em cerca de 1 até cerca de 15 resíduos de aminoácido) dependendo dos critérios utilizados para definir cada domínio. Os polinucleótidos que codificam estes polipéptidos são também aqui descritos.

Julga-se que um ou ambos os motivos ricos em cisteína extracelulares do TR4 sejam importantes para as interacções entre TR4 e os seus ligandos (e. g., TRAIL). Por conseguinte, em casos altamente preferidos, os anticorpos aqui descritos ligam fragmentos polipeptídicos de TR4 compreendendo, ou alternativamente consistindo dos resíduos de aminoácido 131 a 183, e/ou 184 a 229 da SEQ ID N°:1. Noutro caso altamente preferido, os anticorpos aqui descritos ligam polipéptidos de TR4 compreendendo, ou alternativamente consistindo de ambos os

motivos ricos em cisteína extracelulares (resíduos de aminoácido 131 a 229 da SEQ ID N°:1.) Noutro caso preferido, os anticorpos aqui descritos ligam polipéptidos de TR4 compreendendo, ou alternativamente consistindo do domínio extracelular solúvel de TR4 (resíduos de aminoácido 24-238 de SEQ ID N°:1.) Em casos altamente preferidos, os anticorpos aqui descritos que ligam a totalidade ou uma porção do domínio extracelular solúvel de TR4 (e. g., um ou ambos os domínios ricos em cisteína) impedem o ligando TRAIL de se ligar ao TR4. Noutros casos altamente preferidos, os anticorpos aqui descritos que ligam a totalidade ou uma porção do domínio extracelular solúvel de TR4 (e. g., um ou ambos os domínios ricos em cisteína) agonizam o receptor TR4. Noutros casos altamente preferidos, os anticorpos aqui descritos que ligam a totalidade ou uma porção do domínio extracelular solúvel de TR4 (e. g., um ou ambos os domínios ricos em cisteína) induzem a morte celular da célula que expressa o receptor TR4.

Os anticorpos aqui descritos podem ligar também fragmentos compreendendo, ou alternativamente, consistindo de atributos estruturais ou funcionais de TR4. Tais fragmentos incluem resíduos de aminoácido que compreendem hélices alfa e regiões formadoras de hélice alfa ("regiões alfa"), folhas beta e regiões formadoras de folha beta ("regiões beta"), dobras e regiões formadoras de dobra ("regiões de dobra"), enrolamentos e regiões formadoras de enrolamento ("regiões de enrolamento"), regiões hidrófilas, regiões hidrófobas, regiões anfipáticas alfa, regiões anfipáticas beta, regiões formadoras de superfície e regiões de alto índice antigénico (*i. e.*, contendo quatro ou mais aminoácidos contíguos possuindo um índice antigénico maior ou igual a 1,5, como identificado utilizando os parâmetros por defeito do programa de Jameson-Wolf) do TR4 completo (*i. e.*,

inteiro). Determinadas regiões preferidas são aquelas mostradas no Quadro 2 e incluem, mas não estão limitados a, regiões dos tipos supramencionados identificadas por análise da sequência de aminoácidos representada na (SEQ ID N°:1), tais regiões preferidas incluem; regiões alfa, regiões beta, regiões de dobra e regiões de enrolamento previstas por Garnier-Robson; regiões alfa, regiões beta e regiões de dobra previstas por Chou-Fasman; regiões hidrófilas previstas por Kyte-Doolittle; regiões anfipáticas alfa e beta de Eisenberg; regiões formadoras de superfície de Emini; e regiões de alto índice antigénico de Jameson-Wolf, como previstas utilizando os parâmetros por defeito destes programas de computador.

Os dados que representam os atributos estruturais ou funcionais do TR4 definidos no Quadro 2, como descritos acima, foram produzidos utilizando os vários módulos e algoritmos do ADN*STAR ajustado para os parâmetros por defeito. A Coluna I representa os resultados de uma análise de Garnier-Robson das regiões helicoidais alfa; a Coluna II representa os resultados de uma análise de Chou-Fasman das regiões helicoidais alfa; a Coluna III representa os resultados de uma análise de Garnier Robson das regiões de folha beta; a Coluna IV representa os resultados de uma análise de Chou-Fasman das regiões de folha beta; a Coluna V representa os resultados de uma análise de Garnier Robson das regiões de dobra; a Coluna VI representa os resultados de uma análise de Chou-Fasman das regiões de dobra; a Coluna VII representa os resultados de uma análise de Garnier Robson das regiões de enrolamento; a Coluna VIII representa um gráfico de hidrofiliidade de Kyte-Doolittle; Coluna; a Coluna IX representa os resultados de uma análise de Eisenberg das regiões anfipáticas alfa; a Coluna X representa os resultados de uma análise de Eisenberg das regiões anfipáticas

beta; a Coluna XI representa os resultados de uma análise de Karplus-Schultz das regiões flexíveis; a Coluna XII representa a pontuação do índice antigénico de Jameson-Wolf; e a Coluna XIII representa o gráfico de probabilidade de superfície de Emini.

Num caso preferido, os dados apresentados nas colunas VIII, XII e XIII do Quadro 2 podem ser utilizados para determinar as regiões de TR4 que apresentam um alto grau de potencial para antigenicidade. As regiões de alta antigenicidade são determinadas a partir dos dados apresentados nas colunas VIII, XII e/ou XIII escolhendo os valores que representam regiões do polipéptido com probabilidades de serem expostas na superfície do polipéptido num ambiente em que possa ocorrer o reconhecimento do antigénio no processo de iniciação de uma resposta imunológica.

As regiões preferidas supramencionadas mostradas no Quadro 2 incluem, mas não estão limitados a, regiões dos tipos supramencionados identificados por análise da sequência de aminoácidos explicitada na SEQ ID N°:1. Como mostrado no Quadro 2, tais regiões preferidas incluem regiões alfa, regiões beta, regiões de dobra e regiões de enrolamento de Garnier-Robson, regiões alfa, regiões beta e regiões de dobra de Chou-Fasman, regiões hidrófilas de Kyte-Doolittle, regiões anfipáticas alfa e beta de Eisenberg, regiões flexíveis de Karplus-Schulz, regiões de alto índice antigénico de Jameson-Wolf e regiões formadoras de superfície de Emini. Entre os fragmentos de polipéptido preferidos ligados por um ou mais anticorpos são aqui descritos aqueles que compreendem regiões de TR4 que combinam várias características estruturais, tais como várias (e. g., 1, 2, 3 ou 4) das características de região iguais ou diferentes mostradas acima e no Quadro 2.

Quadro 2

Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Met	1	.	.	B	0,12	.	.	.	-0,10	0,90
Ala	2	C	-0,08	*	*	.	0,25	1,08
Pro	3	C	0,42	*	*	.	0,10	0,86
Pro	4	T	C	-0,04	*	*	.	1,05	1,69
Pro	5	A	T	.	0,31	.	*	F	1,00	1,24
Ala	6	A	T	.	0,10	.	*	F	1,00	1,10
Arg	7	A	T	.	0,34	.	*	.	0,10	0,58
Val	8	.	.	B	B	.	.	.	-0,03	.	*	.	-0,30	0,37
His	9	.	.	B	B	.	.	.	-0,52	.	*	.	-0,30	0,37
Leu	10	.	.	B	B	.	.	.	-1,12	.	*	.	-0,60	0,17
Gly	11	.	.	B	B	.	.	.	-1,12	.	*	.	-0,60	0,18
Ala	12	.	.	B	B	.	.	.	-2,09	.	*	.	-0,60	0,14
Phe	13	.	.	B	B	.	.	.	-1,54	.	*	.	-0,60	0,12
Leu	14	.	.	B	B	.	.	.	-1,72	.	.	.	-0,60	0,18
Ala	15	.	.	B	B	.	.	.	-0,91	.	.	.	-0,60	0,27
Val	16	.	.	B	B	.	.	.	-0,78	.	.	.	-0,60	0,51
Thr	17	.	.	B	B	.	.	.	-0,53	.	.	F	-0,45	0,95
Pro	18	.	.	.	B	.	.	C	-0,13	.	.	F	0,05	0,93
Asn	19	T	C	0,09	.	.	F	0,60	1,69
Pro	20	T	C	0,09	.	.	F	0,60	1,18
Gly	21	T	T	.	0,64	.	.	F	0,65	0,77
Ser	22	T	C	0,61	.	.	F	0,45	0,64
Ala	23	C	0,51	.	.	F	0,25	0,41
Ala	24	T	C	0,51	.	.	F	0,45	0,60
Ser	25	.	.	B	.	.	T	.	0,13	.	.	F	0,85	0,78
Gly	26	A	T	.	-0,11	.	.	F	0,85	0,78
Thr	27	A	T	.	-0,40	.	.	F	0,85	0,78
Glu	28	A	A	-0,40	.	.	F	0,45	0,58
Ala	29	A	A	-0,12	.	.	.	0,30	0,60
Ala	30	A	A	-0,03	.	.	.	0,30	0,60
Ala	31	A	A	0,01	.	.	.	0,30	0,53
Ala	32	A	A	0,37	.	.	.	-0,30	0,71
Thr	33	A	T	.	-0,49	*	.	F	1,00	1,40
Pro	34	A	T	.	-0,19	.	.	F	1,00	1,03
Ser	35	.	.	B	.	.	T	.	0,06	.	.	F	0,40	1,07
Lys	36	.	.	B	.	.	T	.	0,34	.	.	F	0,25	0,73
Val	37	.	.	B	B	.	.	.	0,63	.	.	F	-0,15	0,64

(continuação)														
Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Trp	38	.	.	B	B	.	.	.	0,36	.	.	F	-0,15	0,64
Gly	39	.	.	B	B	.	.	.	0,22	*	*	F	-0,15	0,32
Ser	40	C	0,63	*	*	F	-0,05	0,43
Ser	41	T	C	-0,30	*	*	F	0,45	0,80
Ala	42	T	C	0,56	*	*	F	1,05	0,57
Gly	43	T	C	0,63	*	*	F	1,35	0,73
Arg	44	.	.	B	.	.	T	.	1,09	*	*	F	1,49	0,84
Ile	45	.	.	B	1,04	*	*	F	1,78	1,63
Glu	46	.	.	B	1,00	*	*	F	2,12	1,63
Pro	47	.	.	B	.	.	T	.	1,24	*	*	F	2,51	0,83
Arg	48	T	T	.	1,70	*	*	F	3,40	1,17
Gly	49	T	T	.	1,24	*	*	F	3,06	1,32
Gly	50	T	T	.	1,54	*	*	F	2,57	0,84
Gly	51	T	C	0,73	*	*	F	2,03	0,44
Arg	52	T	C	0,73	*	*	.	1,39	0,36
Gly	53	.	.	B	.	.	T	.	0,31	*	*	F	0,85	0,57
Ala	54	.	.	B	.	.	T	.	0,36	.	*	F	0,85	0,83
Leu	55	.	.	B	0,10	.	*	F	0,65	0,57
Pro	56	.	.	B	0,10	.	*	F	-0,25	0,57
Thr	57	.	.	B	-0,01	.	*	F	-0,25	0,55
Ser	58	.	.	B	.	.	T	.	0,30	.	.	F	0,10	1,16
Met	59	.	.	B	.	.	T	.	0,54	.	.	F	0,40	1,02
Gly	60	.	.	B	.	.	T	.	1,14	.	.	F	0,25	0,70
Gln	61	T	T	.	1,06	.	.	F	0,65	0,81
His	62	C	0,78	.	*	F	0,40	1,10
Gly	63	T	C	1,19	.	*	F	0,60	1,12
Pro	64	T	C	1,20	.	*	F	1,20	1,27
Ser	65	T	C	1,66	.	*	F	1,05	0,94
Ala	66	.	.	B	.	.	T	.	1,07	.	*	F	1,30	1,86
Arg	67	.	.	B	0,76	*	*	.	1,29	1,22
Ala	68	.	.	B	1,21	*	*	.	1,48	0,90
Arg	69	.	.	B	.	.	T	.	0,83	.	*	.	2,17	1,74
Ala	70	.	.	B	.	.	T	.	0,92	.	*	F	2,51	0,90
Gly	71	T	T	.	1,17	.	*	F	3,40	1,37
Arg	72	T	.	0,84	.	*	F	2,71	0,69
Ala	73	T	C	1,54	*	.	F	2,48	1,06
Pro	74	T	C	1,22	*	.	F	2,70	2,10
Gly	75	T	C	1,22	*	.	F	2,62	1,66
Pro	76	T	C	1,68	*	*	F	2,24	1,66
Arg	77	C	1,57	*	.	F	2,60	2,10

(continuação)

Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Pro	78	.	A	B	1,57	*	.	F	1,94	3,68
Ala	79	.	A	B	1,48	*	.	F	1,68	2,40
Arg	80	.	A	B	1,61	*	*	F	1,42	1,64
Glu	81	.	A	B	1,93	*	*	F	1,16	1,64
Ala	82	A	A	1,01	*	*	F	0,90	3,19
Ser	83	A	T	.	1,33	*	*	F	1,30	1,34
Pro	84	A	T	.	1,07	*	*	F	1,30	1,52
Arg	85	A	T	.	0,92	*	*	F	1,00	1,12
Leu	86	A	T	.	0,97	.	*	.	0,85	1,13
Arg	87	A	.	.	B	.	.	.	1,24	.	*	.	0,75	1,46
Val	88	A	.	.	B	.	.	.	0,84	*	*	.	0,75	1,08
His	89	A	.	.	B	.	.	.	1,10	.	*	.	-0,15	1,13
Lys	90	A	.	.	B	.	.	.	0,29	*	*	F	0,90	1,16
Thr	91	.	.	B	B	.	.	.	0,24	*	*	F	0,00	1,35
Phe	92	.	.	B	B	.	.	.	-0,72	*	*	.	-0,30	0,74
Lys	93	.	.	B	B	.	.	.	-0,72	*	*	.	-0,30	0,27
Phe	94	.	.	B	B	.	.	.	-1,03	*	.	.	-0,60	0,14
Val	95	.	.	B	B	.	.	.	-1,93	*	.	.	-0,60	0,16
Val	96	.	.	B	B	.	.	.	-2,43	.	*	.	-0,60	0,06
Val	97	.	.	B	B	.	.	.	-2,54	.	*	.	-0,60	0,06
Gly	98	.	.	B	B	.	.	.	-2,59	.	*	.	-0,60	0,06
Val	99	.	.	B	B	.	.	.	-2,74	.	.	.	-0,60	0,15
Leu	100	.	.	B	B	.	.	.	-2,74	*	.	.	-0,60	0,15
Leu	101	.	.	B	B	.	.	.	-2,10	*	.	.	-0,60	0,11
Gln	102	.	.	B	B	.	.	.	-1,54	*	.	.	-0,60	0,23
Val	103	.	.	B	B	.	.	.	-1,50	.	.	.	-0,60	0,37
Val	104	.	.	B	.	.	T	.	-1,23	.	.	.	-0,20	0,61
Pro	105	.	.	B	.	.	T	.	-1,01	*	.	F	0,25	0,35
Ser	106	A	T	.	-0,51	*	.	F	-0,05	0,48
Ser	107	A	T	.	-1,40	*	*	F	0,25	0,94
Ala	108	A	-0,50	.	*	F	0,05	0,43
Ala	109	A	-0,46	.	*	.	0,50	0,63
Thr	110	A	-0,28	.	*	.	-0,10	0,39
Ile	111	A	0,02	.	*	.	-0,10	0,53
Lys	112	.	.	B	0,32	.	*	.	0,50	0,87
Leu	113	.	.	B	0,61	.	*	F	1,05	1,04
His	114	.	.	B	0,31	.	*	F	1,30	1,99
Asp	115	T	C	0,28	*	*	F	1,80	0,70
Gln	116	T	T	.	0,86	.	*	F	1,65	0,84
Ser	117	T	T	.	0,81	.	.	F	2,50	0,89

(continuação)														
Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Ile	118	T	T	.	1,62	.	.	F	2,25	0,92
Gly	119	C	1,37	.	.	F	1,00	0,92
Thr	120	C	1,37	.	.	F	0,45	0,72
Gln	121	.	.	B	.	.	.	C	1,33	.	.	F	0,65	1,79
Gln	122	.	.	B	1,33	.	.	F	0,20	2,46
Trp	123	.	.	B	2,01	.	.	.	0,05	2,28
Glu	124	C	1,54	.	.	.	0,25	2,04
His	125	C	1,51	.	.	.	0,10	0,97
Ser	126	T	C	1,51	.	.	F	0,45	0,91
Pro	127	T	T	.	0,70	.	.	F	1,55	0,91
Leu	128	T	T	.	0,32	.	.	F	0,65	0,55
Gly	129	T	T	.	0,11	.	.	F	0,65	0,22
Glu	130	T	.	.	-0,07	.	.	F	0,45	0,22
Leu	131	.	.	B	-0,11	*	.	.	0,18	0,42
Cys	132	.	.	B	-0,20	*	.	F	1,21	0,42
Pro	133	.	.	B	.	.	T	.	0,58	*	*	F	1,69	0,32
Pro	134	T	T	.	1,03	.	*	F	1,47	0,53
Gly	135	T	T	.	0,73	.	*	F	2,80	1,94
Ser	136	T	C	1,54	*	.	F	2,32	1,68
His	137	C	2,32	*	.	F	2,48	1,88
Arg	138	.	.	B	2,32	*	.	F	2,34	3,72
Ser	139	.	.	B	2,19	*	.	F	2,40	4,29
Glu	140	T	.	.	1,94	*	.	F	2,86	3,12
Arg	141	T	T	.	1,58	*	.	F	3,40	1,61
Pro	142	T	T	.	1,61	.	*	F	2,91	0,64
Gly	143	T	T	.	1,61	.	*	F	2,57	0,60
Ala	144	T	T	.	1,24	.	*	.	2,08	0,60
Cys	145	T	.	.	0,93	.	*	.	1,41	0,21
Asn	146	.	.	B	0,82	.	*	.	0,84	0,30
Arg	147	.	.	B	0,69	*	.	.	1,01	0,52
Cys	148	.	.	B	.	.	T	.	0,18	*	.	F	1,83	0,96
Thr	149	.	.	B	.	.	T	.	0,42	*	.	F	1,70	0,44
Glu	150	.	.	B	.	.	T	.	0,84	*	.	F	1,53	0,22
Gly	151	.	.	B	.	.	T	.	0,53	*	.	F	0,76	0,65
Val	152	.	.	B	B	.	.	.	0,42	.	*	F	0,19	0,65
Gly	153	.	.	B	B	.	.	.	0,50	.	.	.	-0,13	0,61
Tyr	154	.	.	B	B	.	.	.	0,51	.	.	.	-0,60	0,62
Thr	155	.	.	B	B	.	.	.	0,51	.	.	F	-0,30	1,12
Asn	156	.	.	.	B	.	.	C	0,86	.	.	F	0,20	1,81
Ala	157	T	T	.	0,90	.	.	F	0,80	1,86

(continuação)														
Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Ser	158	T	T	.	0,54	.	.	F	0,80	1,06
Asn	159	T	T	.	0,20	.	.	F	0,35	0,57
Asn	160	T	T	.	-0,16	*	.	F	0,35	0,57
Leu	161	.	A	B	-0,97	*	.	.	-0,60	0,23
Phe	162	.	A	B	-0,59	.	.	.	-0,60	0,12
Ala	163	.	A	B	-0,96	.	.	.	-0,60	0,11
Cys	164	.	A	B	-1,27	*	.	.	-0,60	0,07
Leu	165	.	.	B	.	.	T	.	-1,86	.	.	.	-0,20	0,12
Pro	166	.	.	B	.	.	T	.	-1,71	*	.	.	-0,20	0,12
Cys	167	T	T	.	-0,97	*	.	.	0,20	0,12
Thr	168	A	T	.	-0,68	.	.	.	0,10	0,30
Ala	169	A	-0,01	.	.	.	0,50	0,26
Cys	170	A	T	.	0,80	.	.	.	0,70	0,80
Lys	171	A	T	.	1,01	.	.	F	1,15	0,96
Ser	172	A	T	.	1,68	.	*	F	1,30	1,65
Asp	173	A	T	.	2,10	.	*	F	1,30	5,33
Glu	174	A	A	2,39	.	*	F	0,90	5,22
Glu	175	A	A	2,84	.	*	F	1,24	5,22
Glu	176	A	A	2,13	.	*	F	1,58	4,83
Arg	177	.	A	.	.	T	.	.	2,12	.	.	F	2,32	1,50
Ser	178	T	C	1,81	.	.	F	2,86	1,25
Pro	179	T	T	.	1,50	*	.	F	3,40	1,04
Cys	180	T	T	.	1,61	*	.	F	2,61	0,77
Thr	181	T	T	.	1,61	*	.	F	2,67	1,12
Thr	182	T	.	.	1,19	*	*	F	2,38	1,16
Thr	183	T	T	.	0,90	.	.	F	2,49	3,13
Arg	184	T	T	.	0,44	.	.	F	2,40	2,19
Asn	185	T	T	.	1,11	.	.	F	2,50	0,81
Thr	186	T	T	.	0,76	*	.	F	2,25	0,98
Ala	187	T	.	.	1,11	*	.	.	1,65	0,27
Cys	188	T	.	.	1,21	*	.	.	1,40	0,33
Gln	189	.	.	B	0,76	*	.	.	0,75	0,36
Cys	190	.	.	B	0,44	.	.	.	0,50	0,35
Lys	191	.	.	B	.	.	T	..	0,06	.	*	F	0,85	0,94
Pro	192	T	T	.	0,76	.	.	F	0,65	0,47
Gly	193	T	T	.	1,42	.	*	F	1,74	1,72
Thr	194	.	.	B	.	.	T	.	1,42	.	*	F	1,68	1,38
Phe	195	.	.	B	2,09	.	*	F	1,82	1,49
Arg	196	T	.	.	1,74	.	*	F	2,56	2,42
Asn	197	T	T	.	1,37	.	*	F	3,40	2,25

(continuação)														
Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Asp	198	T	T	.	1,71	.	*	F	3,06	2,63
Asn	199	T	C	1,42	.	*	F	2,52	2,32
Ser	200	A	T	.	1,46	.	*	F	1,98	1,43
Ala	201	A	1,46	.	*	.	1,14	0,46
Glu	202	A	1,50	*	.	.	0,80	0,56
Met	203	A	0,83	*	.	.	1,11	0,83
Cys	204	A	T	.	0,53	*	.	.	1,62	0,44
Arg	205	T	T	.	0,52	*	.	.	2,33	0,34
Lys	206	T	T	.	0,77	*	.	F	2,49	0,50
Cys	207	T	T	.	0,10	*	.	F	3,10	0,92
Ser	208	T	.	.	0,49	*	*	F	2,59	0,25
Thr	209	T	.	.	1,27	*	*	F	1,98	0,19
Gly	210	T	.	.	0,81	*	.	F	1,67	0,71
Cys	211	.	.	B	.	.	T	.	0,17	*	*	F	1,16	0,53
Pro	212	T	T	.	-0,02	*	*	F	1,25	0,36
Arg	213	T	T	.	0,32	*	*	F	0,65	0,27
Gly	214	.	.	B	.	.	T	.	-0,22	*	*	.	0,85	1,01
Met	215	.	.	B	B	.	.	.	0,17	*	*	.	0,30	0,48
Val	216	.	.	B	B	.	.	.	0,83	*	*	.	0,79	0,49
Lys	217	.	.	B	B	.	.	.	0,38	*	*	.	0,98	0,83
Val	218	.	.	B	B	.	.	.	-0,04	*	*	F	1,32	0,45
Lys	219	.	.	B	B	.	.	.	0,09	.	*	F	1,51	0,88
Asp	220	.	.	B	0,40	.	*	F	1,90	0,68
Cys	221	.	.	B	0,96	.	*	F	0,81	0,96
Thr	222	T	C	0,91	.	*	F	1,62	0,65
Pro	223	T	T	.	0,88	.	*	F	1,63	0,65
Trp	224	T	T	.	0,83	.	*	F	0,54	0,84
Ser	225	A	T	.	0,17	.	.	F	1,00	1,01
Asp	226	A	A	-0,02	.	.	F	0,45	0,35
Ile	227	A	A	0,26	*	.	.	-0,30	0,25
Glu	228	A	A	0,51	*	.	.	0,30	0,25
Cys	229	.	A	B	0,80	*	.	.	0,60	0,30
Val	230	A	A	0,80	*	*	.	0,60	0,74
His	231	A	A	0,46	*	*	.	0,60	0,58
Lys	232	A	A	1,34	*	.	F	0,60	1,06
Glu	233	.	A	.	.	T	.	.	1,00	*	.	F	1,30	2,30
Ser	234	T	T	.	1,63	*	.	F	1,70	1,68
Gly	235	T	T	.	2,49	*	.	F	1,70	1,14
Asn	236	T	T	.	1,63	*	.	F	1,40	1,06
Gly	237	T	C	1,30	*	.	F	0,45	0,55

(continuação)														
Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
His	238	.	.	.	B	.	.	C	0,44	.	.	.	-0,40	0,59
Asn	239	.	.	.	B	.	.	C	-0,14	.	.	.	-0,40	0,27
Ile	240	.	.	B	B	.	.	.	-0,61	.	.	.	-0,60	0,19
Trp	241	.	.	B	B	.	.	.	-1,47	.	.	.	-0,60	0,12
Val	242	.	.	B	B	.	.	.	-1,98	.	.	.	-0,60	0,05
Ile	243	.	.	B	B	.	.	.	-2,26	.	.	.	-0,60	0,06
Leu	244	.	.	B	B	.	.	.	-3,07	.	.	.	-0,60	0,08
Val	245	.	.	B	B	.	.	.	-3,03	.	.	.	-0,60	0,09
Val	246	.	.	B	B	.	.	.	-3,60	.	.	.	-0,60	0,09
Thr	247	.	.	B	B	.	.	.	-2,96	.	.	.	-0,60	0,08
Leu	248	.	.	B	B	.	.	.	-2,88	.	.	.	-0,60	0,17
Val	249	.	.	B	B	.	.	.	-2,88	.	*	.	-0,60	0,19
Val	250	.	.	B	B	.	.	.	-2,83	.	.	.	-0,60	0,11
Pro	251	.	.	B	B	.	.	.	-2,83	.	.	.	-0,60	0,11
Leu	252	.	.	B	B	.	.	.	-3,11	.	.	.	-0,60	0,11
Leu	253	A	.	.	B	.	.	.	-3,16	.	.	.	-0,60	0,15
Leu	254	A	.	.	B	.	.	.	-3,11	.	.	.	-0,60	0,07
Val	255	A	.	.	B	.	.	.	-3,14	.	.	.	-0,60	0,07
Ala	256	A	.	.	B	.	.	.	-3,79	.	.	.	-0,60	0,06
Val	257	.	.	B	B	.	.	.	-3,64	.	.	.	-0,60	0,05
Leu	258	.	.	B	B	.	.	.	-3,50	.	.	.	-0,60	0,04
Ile	259	.	.	B	B	.	.	.	-3,36	.	.	.	-0,60	0,02
Val	260	.	.	B	B	.	.	.	-3,39	.	.	.	-0,60	0,02
Cys	261	.	.	B	B	.	.	.	-3,14	.	.	.	-0,60	0,01
Cys	262	.	.	B	B	.	.	.	-2,59	.	.	.	-0,60	0,02
Cys	263	.	.	B	B	.	.	.	-2,12	.	.	.	-0,60	0,03
Ile	264	.	.	B	B	.	.	.	-1,90	.	.	.	-0,60	0,06
Gly	265	T	T	.	-1,39	.	.	F	0,35	0,06
Ser	266	T	T	.	-1,07	.	.	F	0,35	0,11
Gly	267	T	T	.	-0,40	.	.	F	0,65	0,16
Cys	268	T	T	.	0,06	.	.	F	1,25	0,27
Gly	269	T	.	.	0,99	.	*	F	1,39	0,31
Gly	270	T	.	.	0,67	.	.	F	2,03	0,62
Asp	271	T	C	0,37	.	*	F	2,37	0,62
Pro	272	T	T	.	0,71	*	*	F	2,91	0,62
Lys	273	T	T	.	1,49	*	*	F	3,40	1,05
Cys	274	.	.	B	.	.	T	.	0,98	*	*	.	2,51	1,23
Met	275	.	.	B	B	.	.	.	0,66	*	*	.	1,62	0,59
Asp	276	.	.	B	B	.	.	.	-0,04	*	*	.	1,28	0,16
Arg	277	.	.	B	B	.	.	.	-0,12	.	*	.	0,04	0,26

(continuação)														
Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Val	278	.	.	B	B	.	.	.	-0,06	.	*	.	-0,60	0,27
Cys	279	.	.	B	B	.	.	.	-0,20	.	.	.	0,30	0,32
Phe	280	.	.	B	B	.	.	.	0,06	.	*	.	-0,60	0,13
Trp	281	.	.	B	B	.	.	.	-0,76	.	.	.	-0,60	0,18
Arg	282	.	.	B	B	.	.	.	-1,68	.	.	.	-0,60	0,28
Leu	283	.	.	B	B	.	.	.	-0,71	.	.	.	-0,60	0,26
Gly	284	.	.	.	B	T	.	.	-0,39	.	*	.	-0,20	0,49
Leu	285	.	.	.	B	.	.	C	0,10	.	*	.	0,50	0,25
Leu	286	.	.	.	B	.	.	C	0,04	.	*	.	0,20	0,46
Arg	287	.	.	.	B	.	.	C	-0,66	.	.	F	0,65	0,46
Gly	288	T	C		0,16	.	.	F	1,35	0,57
Pro	289	T	C		0,50	.	*	F	2,70	1,19
Gly	290	T	C		1,31	*	*	F	3,00	1,01
Ala	291	A	.	.	.	T	.		1,53	.	.	F	2,50	1,65
Glu	292	A	1,39	.	.	F	2,00	1,08
Asp	293	A	1,73	.	.	F	1,70	1,48
Asn	294	A	.	.	.	T	.		1,94	.	*	.	1,45	2,36
Ala	295	A	.	.	.	T	.		1,40	.	*	.	1,15	2,36
His	296	A	.	.	.	T	.		1,18	*	.	.	1,00	0,99
Asn	297	A	.	.	.	T	.		0,88	.	.	.	0,10	0,51
Glu	298	A	0,88	*	.	.	-0,10	0,67
Ile	299	A	0,29	*	*	.	-0,10	0,80
Leu	300	A	0,88	*	*	.	-0,10	0,50
Ser	301	A	0,61	*	.	F	0,65	0,48
Asn	302	A	.	.	.	T	.		-0,20	*	.	F	0,25	0,92
Ala	303	A	.	.	.	T	.		-0,50	*	.	F	0,25	0,92
Asp	304	A	.	.	.	T	.		0,08	*	.	F	0,85	0,92
Ser	305	T	C		0,19	*	.	F	1,05	0,83
Leu	306	.	.	.	B	.	.	C	-0,37	*	.	F	0,05	0,71
Ser	307	.	.	B	B	.	.	.	-0,67	*	.	F	-0,15	0,31
Thr	308	.	.	B	B	.	.	.	-0,08	*	.	.	-0,60	0,31
Phe	309	.	.	B	B	.	.	.	-0,08	*	.	.	-0,30	0,66
Val	310	A	.	.	B	.	.	.	0,22	.	.	F	-0,15	0,85
Ser	311	A	A	0,43	.	.	F	0,00	1,03
Glu	312	A	A	0,73	.	.	F	0,00	1,17
Gln	313	A	A	0,74	.	.	F	0,90	2,73
Gln	314	A	A	1,44	.	.	F	0,90	2,73
Met	315	A	A	2,30	.	.	F	0,90	2,73
Glu	316	A	A	2,39	.	.	F	0,90	2,73
Ser	317	A	A	1,80	.	*	F	0,90	2,44

(continuação)

Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Gln	318	A	A	1,80	.	*	F	0,90	2,49
Glu	319	A	A	0,99	.	*	F	0,90	2,40
Pro	320	A	A	1,28	.	*	F	0,90	1,48
Ala	321	A	A	0,93	.	.	F	0,60	1,23
Asp	322	A	A	.	B	.	.	.	0,38	.	.	F	0,45	0,70
Leu	323	A	A	.	B	.	.	.	0,07	.	.	F	-0,15	0,34
Thr	324	.	A	B	B	.	.	.	-0,79	.	.	F	-0,15	0,48
Gly	325	.	A	B	B	.	.	.	-0,58	.	.	.	-0,30	0,21
Val	326	.	.	B	B	.	.	.	-0,29	.	.	.	-0,60	0,45
Thr	327	.	.	B	B	.	.	.	-0,50	.	.	.	-0,60	0,42
Val	328	.	.	B	B	.	.	.	-0,03	.	*	F	-0,17	0,65
Gln	329	.	.	B	B	.	.	.	0,28	.	*	F	0,11	0,87
Ser	330	T	C	0,03	.	*	F	2,04	1,05
Pro	331	T	.	0,89	.	*	F	2,32	1,42
Gly	332	T	T	.	0,53	.	*	F	2,80	1,42
Glu	333	A	T	.	0,58	.	*	F	1,97	0,57
Ala	334	.	.	B	-0,23	.	*	.	0,74	0,30
Gln	335	.	.	B	-0,28	.	.	.	0,46	0,25
Cys	336	.	.	B	-0,28	.	.	.	0,18	0,14
Leu	337	.	.	B	-0,52	.	*	.	-0,40	0,22
Leu	338	-0,52	.	*	.	-0,40	0,13
Gly	339	.	A	C	-0,52	.	*	F	0,05	0,42
Pro	340	A	A	-0,52	.	*	F	-0,15	0,51
Ala	341	A	A	-0,20	.	*	F	0,60	1,07
Glu	342	A	A	0,31	.	*	F	0,90	1,07
Ala	343	A	A	1,12	*	*	F	0,75	0,93
Glu	344	A	A	1,58	.	*	F	0,90	1,60
Gly	345	A	A	1,90	.	*	F	0,90	1,80
Ser	346	A	T	.	2,60	.	*	F	1,30	3,50
Gln	347	A	T	.	1,79	.	*	F	1,30	3,96
Arg	348	A	T	.	1,57	.	*	F	1,30	3,30
Arg	349	.	.	B	.	.	T	.	0,71	.	*	F	1,30	2,03
Arg	350	.	.	B	B	.	.	.	0,84	.	*	F	0,75	0,87
Leu	351	.	.	B	B	.	.	.	0,56	.	*	.	0,60	0,69
Leu	352	.	.	B	B	.	.	.	0,56	.	*	.	0,30	0,35
Val	353	.	.	B	B	.	.	.	0,10	*	*	.	-0,30	0,29
Pro	354	.	.	B	.	.	T	.	-0,60	*	.	.	-0,20	0,35
Ala	355	T	T	.	-0,71	.	*	.	0,50	0,43
Asn	356	T	C	-0,11	.	.	F	1,65	0,96
Gly	357	T	C	0,39	.	.	F	1,95	0,96

(continuação)

Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Ala	358	C	1,24		.	F	2,20	1,37
Asp	359	T	C	1,14		.	F	3,00	1,48
Pro	360	T	.	0,92	*	.	F	2,50	2,16
Thr	361	T	.	0,32		.	F	1,90	1,76
Glu	362	A	T	.	-0,14		.	F	1,60	1,04
Thr	363	A	.	.	B	.	.	.	-0,26		.	F	0,15	0,56
Leu	364	A	.	.	B	.	.	.	-0,96	*	.	.	-0,60	0,33
Met	365	A	.	.	B	.	.	.	-0,74	*	.	.	-0,60	0,17
Leu	366	A	.	.	B	.	.	.	-0,39	*	.	.	-0,60	0,19
Phe	367	A	.	.	B	.	.	.	-1,09	*	.	.	-0,60	0,47
Phe	368	A	.	.	B	.	.	.	-1,37	*	.	.	-0,60	0,41
Asp	369	A	.	.	B	.	.	.	-0,56	*	.	.	-0,60	0,50
Lys	370	A	A	-0,84	*	.	.	-0,30	0,93
Phe	371	A	A	.	B	.	.	.	-0,89	*	.	.	-0,30	0,75
Ala	372	A	A	.	B	.	.	.	-0,40	*	.	.	-0,30	0,34
Asn	373	.	A	B	B	.	.	.	-0,40	*	.	.	-0,60	0,26
Ile	374	.	A	B	B	.	.	.	-0,40	*	.	.	-0,60	0,26
Val	375	.	A	B	B	.	.	.	-0,74	.	.	.	-0,60	0,43
Pro	376	.	A	.	B	.	.	C	-0,33	.	.	.	-0,10	0,36
Phe	377	T	T	.	0,26	.	.	.	0,20	0,54
Asp	378	T	T	.	0,26	.	.	F	0,80	1,21
Ser	379	T	T	.	0,33	.	.	F	1,40	1,35
Trp	380	A	T	.	0,59	*	*	F	0,40	1,29
Asp	381	A	A	0,91	*	.	F	-0,15	0,76
Gln	382	A	A	1,61	*	.	.	-0,15	1,11
Leu	383	A	A	0,80	*	.	.	-0,15	1,84
Met	384	A	A	1,10	*	.	.	0,30	0,91
Arg	385	A	A	0,58	*	.	.	0,30	0,87
Gln	386	A	A	0,27	*	.	.	-0,30	0,87
Leu	387	A	A	0,31	*	.	.	0,45	1,27
Asp	388	A	A	1,12	*	.	.	0,75	1,30
Leu	389	A	A	1,72	*	.	F	0,60	1,21
Thr	390	A	T	.	0,72	*	.	F	1,30	2,54
Lys	391	A	T	.	0,72	.	*	F	1,30	1,07
Asn	392	A	T	.	0,68	*	*	F	1,30	2,16
Glu	393	A	T	.	-0,18	*	.	F	1,30	1,11
Ile	394	.	.	B	B	.	.	.	0,74	*	.	F	0,75	0,41
Asp	395	.	.	B	B	.	.	.	0,47	*	*	.	0,60	0,50
Val	396	.	.	B	B	.	.	.	0,08	*	*	.	0,60	0,29
Val	397	.	.	B	B	.	.	.	-0,23	.	.	.	0,51	0,41

(continuação)														
Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Arg	398	.	.	B	.	.	T	.	-0,82	*	.	.	1,12	0,36
Ala	399	.	.	B	.	.	T	.	-0,28	*	.	.	0,73	0,49
Gly	400	T	T	.	-0,49	*	.	F	2,09	0,65
Thr	401	T	C	0,02	*	*	F	2,10	0,51
Ala	402	C	0,88	*	*	F	1,09	0,50
Gly	403	T	C	0,18	.	*	F	1,68	0,85
Pro	404	T	C	-0,04	.	.	F	1,47	0,59
Gly	405	T	C	0,06	.	.	F	1,26	0,48
Asp	406	A	T	.	-0,22	*	.	F	0,25	0,76
Ala	407	A	A	-0,23	.	.	.	-0,30	0,50
Leu	408	A	A	-0,70	.	.	.	-0,60	0,50
Tyr	409	A	A	-1,09	*	.	.	-0,60	0,25
Ala	410	A	A	-0,70	*	.	.	-0,60	0,24
Met	411	A	A	-0,99	*	.	.	-0,60	0,59
Leu	412	A	A	-1,26	*	.	.	-0,60	0,39
Met	413	A	A	-0,44	*	.	.	-0,60	0,29
Lys	414	A	A	.	B	.	.	.	-0,16	*	.	.	-0,60	0,47
Trp	415	A	A	.	B	.	.	.	0,12	*	.	.	0,15	1,14
Val	416	A	A	.	B	.	.	.	0,38	*	*	.	0,45	1,66
Asn	417	A	T	.	1,30	*	.	F	1,75	0,82
Lys	418	A	T	.	1,90	*	.	F	2,20	1,53
Thr	419	T	C	1,27	*	.	F	3,00	3,32
Gly	420	T	C	1,26	*	.	F	2,70	2,08
Arg	421	T	.	.	1,22	*	.	F	2,40	1,40
Asn	422	T	C	1,19	*	.	F	1,65	0,68
Ala	423	.	.	B	.	.	T	.	0,83	.	.	.	1,00	0,93
Ser	424	.	.	B	.	.	T	.	0,33	.	.	.	0,70	0,69
Ile	425	.	.	B	.	.	T	.	-0,13	.	*	.	-0,20	0,35
His	426	.	A	B	-0,24	.	*	.	-0,60	0,29
Thr	427	.	A	B	-0,83	*	*	.	-0,60	0,36
Leu	428	A	A	-1,06	*	*	.	-0,60	0,52
Leu	429	A	A	-0,76	*	*	.	-0,60	0,31
Asp	430	A	A	0,24	*	*	.	-0,30	0,38
Ala	431	A	A	-0,32	*	*	.	0,30	0,89
Leu	432	A	A	-0,01	*	*	.	0,75	1,07
Glu	433	A	A	0,80	*	*	.	0,75	1,11
Arg	434	A	A	1,72	*	*	F	0,90	1,90
Met	435	A	A	1,69	*	*	F	0,90	4,52
Glu	436	A	A	1,69	*	*	F	0,90	3,55
Glu	437	A	A	2,54	*	.	F	0,90	1,83

(continuação)														
Res	Posição	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Arg	438	A	A	2,54	*	*	F	0,90	3,70
His	439	A	A	2,48	*	*	F	0,90	3,70
Ala	440	A	A	2,19	*	*	F	0,90	4,28
Lys	441	A	A	2,19	*	*	F	0,90	1,53
Glu	442	A	A	2,19	*	.	F	0,90	1,95
Lys	443	A	A	1,27	*	*	F	0,90	3,22
Ile	444	A	A	0,49	*	*	F	0,90	1,33
Gln	445	A	A	0,22	*	*	F	0,75	0,63
Asp	446	A	A	0,18	*	*	F	-0,15	0,23
Leu	447	A	A	-0,12	*	.	.	-0,30	0,56
Leu	448	A	A	-0,51	*	.	.	0,55	0,43
Val	449	A	A	0,42	*	.	F	0,95	0,26
Asp	450	A	T	.	-0,28	*	.	F	1,60	0,62
Ser	451	T	T	.	-1,17	.	.	F	2,25	0,65
Gly	452	T	T	.	-0,60	.	.	F	2,50	0,62
Lys	453	.	.	B	.	.	T	.	-0,60	.	.	F	1,25	0,58
Phe	454	.	A	B	0,26	.	.	.	0,15	0,36
Ile	455	.	A	B	0,26	.	.	.	0,20	0,62
Tyr	456	.	A	B	0,21	*	.	.	0,55	0,52
Leu	457	.	A	B	0,24	*	.	.	-0,03	0,59
Glu	458	.	A	B	-0,14	.	.	F	0,54	1,22
Asp	459	.	A	.	.	T	.	.	0,26	.	.	F	1,66	0,77
Gly	460	T	T	.	0,56	.	.	F	2,78	1,26
Thr	461	T	C	-0,06	*	.	F	2,70	0,73
Gly	462	T	C	0,46	*	.	F	2,13	0,33
Ser	463	T	C	-0,36	.	.	F	1,26	0,44
Ala	464	A	-0,36	.	.	.	0,14	0,25
Val	465	.	.	B	-0,40	.	.	.	0,17	0,44
Ser	466	.	.	B	-0,48	.	.	.	-0,10	0,42
Leu	467	.	.	B	-0,52	.	.	.	-0,10	0,53
Glu	468	A	-0,61	.	.	.	0,50	0,92

É também aqui descrito um anticorpo que liga um péptido ou polipéptido compreendendo um porção portadora de epítipo de um polipéptido aqui descrito. O epítipo desta porção de polipéptido é um epítipo imunogénico ou antigénico de um polipéptido. Um "epítipo imunogénico" é definido como uma parte de uma proteína que desencadeia uma resposta de anticorpos quando a proteína

inteira é o imunogénio. Por outro lado, uma região de uma molécula de proteína à qual se pode ligar um anticorpo é definida como um "epítopo antigénico." O número de epítomos imunogénicos de uma proteína é geralmente inferior ao número de epítomos antigénicos. Ver, por exemplo, Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 81:3998- 4002 (1983).

No que se refere à selecção de péptidos ou polipéptidos que têm um epítopo antigénico (*i. e.*, que contêm uma região de uma molécula de proteína à qual se pode ligar um anticorpo), é bem conhecido na técnica que péptidos sintéticos relativamente curtos que imitam parte de uma sequência de proteína são rotineiramente capazes de desencadear um anti-soro que reage com a proteína parcialmente mimetizada. Ver, por exemplo, Sutcliffe, J. G., Shinnick, T. M., Green, N. e Learner, R.A. (1983) Antibodies that react with predetermined sites on proteins. *Science* 219:660-666. Os péptidos capazes de desencadear soros reactivos com proteínas estão frequentemente representados na sequência primária de uma proteína, podem ser caracterizados por um conjunto de regras químicas simples e não estão confinados às regiões imunodominantes de proteínas intactas (*i. e.*, epítomos imunogénicos) nem às extremidades amino ou carboxilo.

Por conseguinte, os péptidos e polipéptidos portadores do epítopo antigénico são úteis para produzir anticorpos, incluindo anticorpos monoclonais, que se ligam a um polipéptido de TR4. Ver, por exemplo, Wilson *et al.*, Cell 37:767-778 (1984) na 777. Os péptidos e polipéptidos portadores do epítopo antigénico contêm de um modo preferido uma sequência de pelo menos sete, de um modo mais preferido, pelo menos, nove e, de um modo muito preferido, entre, pelo menos, cerca de 15 até cerca de 30 aminoácidos contidos na sequência de aminoácidos de SEQ ID N°:1.

Os anticorpos aqui descritos podem ligar um ou mais polipéptidos ou péptidos antigénicos de TR4 incluindo, mas não estando limitado a: um polipéptido compreendendo os resíduos de aminoácido desde cerca de 35 até cerca de 92 da SEQ ID N°:1; um polipéptido compreendendo os resíduos de aminoácido desde cerca de 114 até cerca de 160 da SEQ ID N°:1; um polipéptido compreendendo os resíduos de aminoácido desde cerca de 169 até cerca de 240 da SEQ ID N°:1; um polipéptido compreendendo os resíduos de aminoácido desde cerca de 267 até cerca de 298 da SEQ ID N°:1; um polipéptido compreendendo os resíduos de aminoácido desde cerca de 330 até cerca de 364 da SEQ ID N°:1; um polipéptido compreendendo os resíduos de aminoácido desde cerca de 391 até cerca de 404 da SEQ ID N°:1; e/ou um polipéptido compreendendo os resíduos de aminoácido desde cerca de 418 até cerca de 465 da SEQ ID N°:1. Neste contexto "cerca de" inclui a gama particularmente especificada, e gamas maiores ou menores em vários (5, 4, 3, 2, ou 1) aminoácidos, em qualquer uma das extremidades ou em ambas as extremidades. Como indicado acima, a requerente determinou que os fragmentos de polipéptido acima são regiões antigénicas da proteína TR4. Os péptidos e polipéptidos de TR4 portadores de epítipo podem ser produzidos por quaisquer meios convencionais. Houghten, R.A., "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids", *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 82:5131-5135 (1985). Este processo de "Síntese Simultânea de Múltiplos Péptidos (SMPS)" é descrito em mais detalhe na Patente U.S. nº 4631211 de Houghten *et al.* (1986).

Como um especialista na técnica compreenderá, os polipéptidos de TR4 e os seus fragmentos portadores de epítipo

aqui descritos (e. g., correspondentes a uma porção do domínio extracelular tal como, por exemplo, os resíduos de aminoácido 1 a 240 da SEQ ID N°:1 podem ser combinados com partes do domínio constante de imunoglobulinas (IgG), resultando em polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusão facilitam a purificação e exibem uma maior semivida *in vivo*. Isto foi demonstrado, e. g., para proteínas quiméricas consistindo dos dois primeiros domínios do polipéptido CD4 humano e vários domínios das regiões constantes das cadeias pesadas ou leves de imunoglobulinas de mamífero (EPA 394 827; Traunecker *et al.*, Nature 331:84-86 (1988)). As proteínas de fusão que têm uma estrutura dimérica ligada por dissulfureto devido à parte de IgG podem ser também mais eficientes na ligação e neutralização de outras moléculas do que a proteína TR4 monomérica ou fragmento de proteína sozinho (Fountoulakis *et al.*, J Biochem 270:3958-3964 (1995)). Assim, anticorpos aqui descritos podem ligar proteínas de fusão que compreendem a totalidade ou uma porção de um polipéptido de TR4 tal como o TR4.

A tecnologia de ADN recombinante conhecida dos especialistas na técnica pode ser utilizada para criar novas proteínas mutantes ou "muteínas" incluindo substituições, supressões, adições simples ou múltiplas de aminoácidos ou proteínas de fusão. Tais polipéptidos modificados podem exibir, e. g., melhor actividade ou maior estabilidade. Além disso, eles podem ser purificados em maiores rendimentos e mostrar melhor solubilidade do que o polipéptido natural correspondente, pelo menos em certas condições de purificação e conservação. Os anticorpos aqui descritos podem ligar também tais polipéptidos de TR4 modificados, ou fragmentos ou variantes polipeptídicos de TR4.

Por exemplo, sabe-se na técnica que para muitas proteínas, incluindo o domínio extracelular de uma proteína associada à membrana ou a(s) forma(s) madura(s) de uma proteína segregada, podem ser suprimidos um ou mais aminoácidos da extremidade N-terminal ou extremidade C-terminal sem perda substancial da função biológica ou perda da aptidão para ser ligada por um anticorpo específico. Por exemplo, Ron *et al.*, J. Biol. Chem., 268:2984-2988 (1993) descreveram proteínas KGF modificadas que tinham actividade de ligação de heparina mesmo se faltassem 3, 8 ou 27 resíduos de aminoácido na extremidade amino-terminal. No presente caso, uma vez que o TR4 é um membro da família de polipéptidos do receptor contendo o domínio de morte (DDCR), as supressões de aminoácidos N-terminais até ao resíduo de cisteína na posição 109 na SEQ ID N°:1 podem reter alguma actividade biológica tal como a aptidão para induzir apoptose. É expectável que os polipéptidos possuindo mais supressões N-terminais, incluindo o resíduo de cisteína na posição 109 (C-109) da SEQ ID N°:1, não retenham tais actividades biológicas porque este resíduo é conservado entre os membros da família e pode ser necessário para formar uma ponte dissulfureto para proporcionar a estabilidade estrutural que é necessária para ligação ao ligando.

No entanto, mesmo que a supressão de um ou mais aminoácidos da extremidade N-terminal de uma proteína resulte na modificação ou perda de uma ou mais funções biológicas da proteína, podem continuar retidas outras actividades funcionais (e. g., actividades biológicas, aptidão para multimerizar, aptidão para ligar um ligando de TR4 (e. g., TRAIL)). Por exemplo, a aptidão de polipéptidos de TR4 encurtados para induzir e/ou ligar-se a anticorpos que reconhecem as formas completas ou maduras do polipéptidos de TR4 será geralmente retida quando são removidos

menos do que a maior parte dos resíduos da extremidade N-terminal do polipéptido completo ou maduro. Se um polipéptido particular que carece dos resíduos N-terminais de um polipéptido completo retém tais actividades imunológicas pode ser facilmente determinado por métodos de rotina aqui descritos e, de outro modo, conhecidos na técnica. Não é improvável que um polipéptido de TR4 com um grande número de resíduos de aminoácido N-terminais suprimidos possa reter algumas actividades biológicas ou imunogénicas. De facto, péptidos constituídos por tão poucos quanto seis resíduos de aminoácido de TR4 podem frequentemente suscitar uma resposta imunológica.

Por conseguinte, são aqui descritos anticorpos que ligam polipéptidos possuindo um ou mais resíduos suprimidos da extremidade amino da sequência de aminoácidos de TR4 de SEQ ID N°:1 até ao resíduo de serina na posição número 463 e polinucleótidos que codificam tais polipéptidos. Em particular, são aqui descritos anticorpos que ligam polipéptidos compreendendo a sequência de aminoácidos dos resíduos n¹-468 de SEQ ID N°:1, em que n¹ é um número inteiro desde 2 a 463 que corresponde à posição do resíduo de aminoácido na SEQ ID N°:1.

Mais em particular, são aqui descritos anticorpos que ligam polipéptidos compreendendo ou, alternativamente, consistindo da sequência de aminoácidos dos resíduos de A-2 a E-468; P-3 a E-468; P-4 a E-468; P-5 a E-468; A-6 a E-468; R-7 a E-468; V-8 a E-468; H-9 a E-468; L-10 a E-468; G-11 a E-468; A-12 a E-468; F-13 a E-468; L-14 a E-468; A-15 a E-468; V-16 a E-468; T-17 a E-468; P-18 a E-468; N-19 a E-468; P-20 a E-468; G-21 a E-468; S-22 a E-468; A-23 a E-468; A-24 a E-468; S-25 a E-468; G-26 a E-468; T-27 a E-468; E-28 a E-468; A-29 a E-468; A-30 a E-468; A-31 a E-468; A-32 a E-468; T-33 a E-468; P-34 a E-468; S-35 a

E-468; K-36 a E-468; V-37 a E-468; W-38 a E-468; G-39 a E-468;
S-40 a E-468; S-41 a E-468; A-42 a E-468; G-43 a E-468; R-44 a
E-468; I-45 a E-468; E-46 a E-468; P-47 a E-468; R-48 a E-468;
G-49 a E-468; G-50 a E-468; G-51 a E-468; R-52 a E-468; G-53 a
E-468; A-54 a E-468; L-55 a E-468; P-56 a E-468; T-57 a E-468;
S-58 a E-468; M-59 a E-468; G-60 a E-468; Q-61 a E-468; H-62 a
E-468; G-63 a E-468; P-64 a E-468; S-65 a E-468; A-66 a E-468;
R-67 a E-468; A-68 a E-468; R-69 a E-468; A-70 a E-468; G-71 a
E-468; R-72 a E-468; A-73 a E-468; P-74 a E-468; G-75 a E-468;
P-76 a E-468; R-77 a E-468; P-78 a E-468; A-79 a E-468; R-80 a
E-468; E-81 a E-468; A-82 a E-468; S-83 a E-468; P-84 a E-468;
R-85 a E-468; L-86 a E-468; R-87 a E-468; V-88 a E-468; H-89 a
E-468; K-90 a E-468; T-91 a E-468; F-92 a E-468; K-93 a E-468;
F-94 a E-468; V-95 a E-468; V-96 a E-468; V-97 a E-468; G-98 a
E-468; V-99 a E-468; L-100 a E-468; L-101 a E-468; Q-102 a
E-468; V-103 a E-468; V-104 a E-468; P-105 a E-468; S-106 a
E-468; S-107 a E-468; A-108 a E-468; A-109 a E-468; T-110 a
E-468; I-111 a E-468; K-112 a E-468; L-113 a E-468; H-114 a
E-468; D-115 a E-468; Q-116 a E-468; S-117 a E-468; I-118 a
E-468; G-119 a E-468; T-120 a E-468; Q-121 a E-468; Q-122 a
E-468; W-123 a E-468; E-124 a E-468; H-125 a E-468; S-126 a
E-468; P-127 a E-468; L-128 a E-468; G-129 a E-468; E-130 a
E-468; L-131 a E-468; C-132 a E-468; P-133 a E-468; P-134 a
E-468; G-135 a E-468; S-136 a E-468; H-137 a E-468; R-138 a
E-468; S-139 a E-468; E-140 a E-468; R-141 a E-468; P-142 a
E-468; G-143 a E-468; A-144 a E-468; C-145 a E-468; N-146 a
E-468; R-147 a E-468; C-148 a E-468; T-149 a E-468; E-150 a
E-468; G-151 a E-468; V-152 a E-468; G-153 a E-468; Y-154 a
E-468; T-155 a E-468; N-156 a E-468; A-157 a E-468; S-158 a
E-468; N-159 a E-468; N-160 a E-468; L-161 a E-468; F-162 a
E-468; A-163 a E-468; C-164 a E-468; L-165 a E-468; P-166 a
E-468; C-167 a E-468; T-168 a E-468; A-169 a E-468; C-170 a

E-468; K-171 a E-468; S-172 a E-468; D-173 a E-468; E-174 a
 E-468; E-175 a E-468; E-176 a E-468; R-177 a E-468; S-178 a
 E-468; P-179 a E-468; C-180 a E-468; T-181 a E-468; T-182 a
 E-468; T-183 a E-468; R-184 a E-468; N-185 a E-468; T-186 a
 E-468; A-187 a E-468; C-188 a E-468; Q-189 a E-468; C-190 a
 E-468; K-191 a E-468; P-192 a E-468; G-193 a E-468; T-194 a
 E-468; F-195 a E-468; R-196 a E-468; N-197 a E-468; D-198 a
 E-468; N-199 a E-468; S-200 a E-468; A-201 a E-468; E-202 a
 E-468; M-203 a E-468; C-204 a E-468; R-205 a E-468; K-206 a
 E-468; C-207 a E-468; S-208 a E-468; T-209 a E-468; G-210 a
 E-468; C-211 a E-468; P-212 a E-468; R-213 a E-468; G-214 a
 E-468; M-215 a E-468; V-216 a E-468; K-217 a E-468; V-218 a
 E-468; K-219 a E-468; D-220 a E-468; C-221 a E-468; T-222 a
 E-468; P-223 a E-468; W-224 a E-468; S-225 a E-468; D-226 a
 E-468; I-227 a E-468; E-228 a E-468; C-229 a E-468; V-230 a
 E-468; H-231 a E-468; K-232 a E-468; E-233 a E-468; S-234 a
 E-468; G-235 a E-468; N-236 a E-468; G-237 a E-468; H-238 a
 E-468; N-239 a E-468; I-240 a E-468; W-241 a E-468; V-242 a
 E-468; I-243 a E-468; L-244 a E-468; V-245 a E-468; V-246 a
 E-468; T-247 a E-468; L-248 a E-468; V-249 a E-468; V-250 a
 E-468; P-251 a E-468; L-252 a E-468; L-253 a E-468; L-254 a
 E-468; V-255 a E-468; A-256 a E-468; V-257 a E-468; L-258 a
 E-468; I-259 a E-468; V-260 a E-468; C-261 a E-468; C-262 a
 E-468; C-263 a E-468; I-264 a E-468; G-265 a E-468; S-266 a
 E-468; G-267 a E-468; C-268 a E-468; G-269 a E-468; G-270 a
 E-468; D-271 a E-468; P-272 a E-468; K-273 a E-468; C-274 a
 E-468; M-275 a E-468; D-276 a E-468; R-277 a E-468; V-278 a
 E-468; C-279 a E-468; F-280 a E-468; W-281 a E-468; R-282 a
 E-468; L-283 a E-468; G-284 a E-468; L-285 a E-468; L-286 a
 E-468; R-287 a E-468; G-288 a E-468; P-289 a E-468; G-290 a
 E-468; A-291 a E-468; E-292 a E-468; D-293 a E-468; N-294 a
 E-468; A-295 a E-468; H-296 a E-468; N-297 a E-468; E-298 a

E-468; I-299 a E-468; L-300 a E-468; S-301 a E-468; N-302 a
 E-468; A-303 a E-468; D-304 a E-468; S-305 a E-468; L-306 a
 E-468; S-307 a E-468; T-308 a E-468; F-309 a E-468; V-310 a
 E-468; S-311 a E-468; E-312 a E-468; Q-313 a E-468; Q-314 a
 E-468; M-315 a E-468; E-316 a E-468; S-317 a E-468; Q-318 a
 E-468; E-319 a E-468; P-320 a E-468; A-321 a E-468; D-322 a
 E-468; L-323 a E-468; T-324 a E-468; G-325 a E-468; V-326 a
 E-468; T-327 a E-468; V-328 a E-468; Q-329 a E-468; S-330 a
 E-468; P-331 a E-468; G-332 a E-468; E-333 a E-468; A-334 a
 E-468; Q-335 a E-468; C-336 a E-468; L-337 a E-468; L-338 a
 E-468; G-339 a E-468; P-340 a E-468; A-341 a E-468; E-342 a
 E-468; A-343 a E-468; E-344 a E-468; G-345 a E-468; S-346 a
 E-468; Q-347 a E-468; R-348 a E-468; R-349 a E-468; R-350 a
 E-468; L-351 a E-468; L-352 a E-468; V-353 a E-468; P-354 a
 E-468; A-355 a E-468; N-356 a E-468; G-357 a E-468; A-358 a
 E-468; D-359 a E-468; P-360 a E-468; T-361 a E-468; E-362 a
 E-468; T-363 a E-468; L-364 a E-468; M-365 a E-468; L-366 a
 E-468; F-367 a E-468; F-368 a E-468; D-369 a E-468; K-370 a
 E-468; F-371 a E-468; A-372 a E-468; N-373 a E-468; I-374 a
 E-468; V-375 a E-468; P-376 a E-468; F-377 a E-468; D-378 a
 E-468; S-379 a E-468; W-380 a E-468; D-381 a E-468; Q-382 a
 E-468; L-383 a E-468; M-384 a E-468; R-385 a E-468; Q-386 a
 E-468; L-387 a E-468; D-388 a E-468; L-389 a E-468; T-390 a
 E-468; K-391 a E-468; N-392 a E-468; E-393 a E-468; I-394 a
 E-468; D-395 a E-468; V-396 a E-468; V-397 a E-468; R-398 a
 E-468; A-399 a E-468; G-400 a E-468; T-401 a E-468; A-402 a
 E-468; G-403 a E-468; P-404 a E-468; G-405 a E-468; D-406 a
 E-468; A-407 a E-468; L-408 a E-468; Y-409 a E-468; A-410 a
 E-468; M-411 a E-468; L-412 a E-468; M-413 a E-468; K-414 a
 E-468; W-415 a E-468; V-416 a E-468; N-417 a E-468; K-418 a
 E-468; T-419 a E-468; G-420 a E-468; R-421 a E-468; N-422 a
 E-468; A-423 a E-468; S-424 a E-468; I-425 a E-468; H-426 a

E-468; T-427 a E-468; L-428 a E-468; L-429 a E-468; D-430 a E-468; A-431 a E-468; L-432 a E-468; E-433 a E-468; R-434 a E-468; M-435 a E-468; E-436 a E-468; E-437 a E-468; R-438 a E-468; H-439 a E-468; A-440 a E-468; K-441 a E-468; E-442 a E-468; K-443 a E-468; I-444 a E-468; Q-445 a E-468; D-446 a E-468; L-447 a E-468; L-448 a E-468; V-449 a E-468; D-450 a E-468; S-451 a E-468; G-452 a E-468; K-453 a E-468; F-454 a E-468; I-455 a E-468; Y-456 a E-468; L-457 a E-468; E-458 a E-468; D-459 a E-468; G-460 a E-468; T-461 a E-468; G-462 a E-468; e/ou S-463 a E-468 da sequência de TR4 de SEQ ID N°:1.

Noutro caso, as supressões N-terminais do polipéptido de TR4 podem ser descritas pela fórmula geral n^2 a 238 em que n^2 é um número desde 2 a 238 que corresponde à sequência de aminoácidos identificada da SEQ ID N°:1. Em casos específicos, os anticorpos aqui descritos ligam supressões N-terminais do TR4 compreendendo ou, alternativamente, consistindo da sequência de aminoácidos de resíduos: A-2 a H-238; P-3 a H-238; P-4 a H-238; P-5 a H-238; A-6 a H-238; R-7 a H-238; V-8 a H-238; H-9 a H-238; L-10 a H-238; G-11 a H-238; A-12 a H-238; F-13 a H-238; L-14 a H-238; A-15 a H-238; V-16 a H-238; T-17 a H-238; P-18 a H-238; N-19 a H-238; P-20 a H-238; G-21 a H-238; S-22 a H-238; A-23 a H-238; A-24 a H-238; S-25 a H-238; G-26 a H-238; T-27 a H-238; E-28 a H-238; A-29 a H-238; A-30 a H-238; A-31 a H-238; A-32 a H-238; T-33 a H-238; P-34 a H-238; S-35 a H-238; K-36 a H-238; V-37 a H-238; W-38 a H-238; G-39 a H-238; S-40 a H-238; S-41 a H-238; A-42 a H-238; G-43 a H-238; R-44 a H-238; I-45 a H-238; E-46 a H-238; P-47 a H-238; R-48 a H-238; G-49 a H-238; G-50 a H-238; G-51 a H-238; R-52 a H-238; G-53 a H-238; A-54 a H-238; L-55 a H-238; P-56 a H-238; T-57 a H-238; S-58 a H-238; M-59 a H-238; G-60 a H-238; Q-61 a H-238; H-62 a H-238; G-63 a H-238; P-64 a H-238; S-65 a H-238; A-66 a H-238; R-67 a H-238; A-68 a

H-238; R-69 a H-238; A-70 a H-238; G-71 a H-238; R-72 a H-238;
A-73 a H-238; P-74 a H-238; G-75 a H-238; P-76 a H-238; R-77 a
H-238; P-78 a H-238; A-79 a H-238; R-80 a H-238; E-81 a H-238;
A-82 a H-238; S-83 a H-238; P-84 a H-238; R-85 a H-238; L-86 a
H-238; R-87 a H-238; V-88 a H-238; H-89 a H-238; K-90 a H-238;
T-91 a H-238; F-92 a H-238; K-93 a H-238; F-94 a H-238; V-95 a
H-238; V-96 a H-238; V-97 a H-238; G-98 a H-238; V-99 a H-238;
L-100 a H-238; L-101 a H-238; Q-102 a H-238; V-103 a H-238;
V-104 a H-238; P-105 a H-238; S-106 a H-238; S-107 a H-238;
A-108 a H-238; A-109 a H-238; T-110 a H-238; I-111 a H-238;
K-112 a H-238; L-113 a H-238; H-114 a H-238; D-115 a H-238;
Q-116 a H-238; S-117 a H-238; I-118 a H-238; G-119 a H-238;
T-120 a H-238; Q-121 a H-238; Q-122 a H-238; W-123 a H-238;
E-124 a H-238; H-125 a H-238; S-126 a H-238; P-127 a H-238;
L-128 a H-238; G-129 a H-238; E-130 a H-238; L-131 a H-238;
C-132 a H-238; P-133 a H-238; P-134 a H-238; G-135 a H-238;
S-136 a H-238; H-137 a H-238; R-138 a H-238; S-139 a H-238;
E-140 a H-238; R-141 a H-238; P-142 a H-238; G-143 a H-238;
A-144 a H-238; C-145 a H-238; N-146 a H-238; R-147 a H-238;
C-148 a H-238; T-149 a H-238; E-150 a H-238; G-151 a H-238;
V-152 a H-238; G-153 a H-238; Y-154 a H-238; T-155 a H-238;
N-156 a H-238; A-157 a H-238; S-158 a H-238; N-159 a H-238;
N-160 a H-238; L-161 a H-238; F-162 a H-238; A-163 a H-238;
C-164 a H-238; L-165 a H-238; P-166 a H-238; C-167 a H-238;
T-168 a H-238; A-169 a H-238; C-170 a H-238; K-171 a H-238;
S-172 a H-238; D-173 a H-238; E-174 a H-238; E-175 a H-238;
E-176 a H-238; R-177 a H-238; S-178 a H-238; P-179 a H-238;
C-180 a H-238; T-181 a H-238; T-182 a H-238; T-183 a H-238;
R-184 a H-238; N-185 a H-238; T-186 a H-238; A-187 a H-238;
C-188 a H-238; Q-189 a H-238; C-190 a H-238; K-191 a H-238;
P-192 a H-238; G-193 a H-238; T-194 a H-238; F-195 a H-238;
R-196 a H-238; N-197 a H-238; D-198 a H-238; N-199 a H-238; S-

200 a H-238; A-201 a H-238; E-202 a H-238; M-203 a H-238; C-204 a H-238; R-205 a H-238; K-206 a H-238; C-207 a H-238; S-208 a H-238; T-209 a H-238; G-210 a H-238; C-211 a H-238; P-212 a H-238; R-213 a H-238; G-214 a H-238; M-215 a H-238; V-216 a H-238; K-217 a H-238; V-218 a H-238; K-219 a H-238; D-220 a H-238; C-221 a H-238; T-222 a H-238; P-223 a H-238; W-224 a H-238; S-225 a H-238; D-226 a H-238; I-227 a H-238; E-228 a H-238; C-229 a H-238; V-230 a H-238; H-231 a H-238; K-232 a H-238; e/ou E-233 a H-238; da sequência do domínio extracelular de TR4 da SEQ ID N°:1.

Como mencionado acima, mesmo que a supressão de um ou mais aminoácidos da extremidade C-terminal de uma proteína resulte na modificação ou perda de uma ou mais funções biológicas da proteína podem continuar retidas outras actividades funcionais (e. g., actividades biológicas, aptidão para multimerizar, aptidão para ligar o ligando de DR4 (e. g., TRAIL)). Por exemplo, a aptidão do polipéptido de TR4 encurtado para induzir e/ou ligar-se a anticorpos que reconhecem as formas completas ou maduras do polipéptido de TR4 será geralmente retida quando são removidos menos do que a maior parte dos resíduos da extremidade C-terminal do polipéptido completo ou maduro. Se um polipéptido particular que carece de resíduos C-terminais de um polipéptido completo retém tais actividades imunológicas pode ser facilmente determinado por métodos de rotina aqui descritos e, de outro modo, conhecidos na técnica. Não é improvável que um polipéptido de TR4 com um grande número de resíduos de aminoácido C-terminais suprimidos possa reter algumas actividades biológicas ou imunogénicas. De facto, péptidos constituídos por tão poucos quantos seis resíduos de aminoácido de TR4 podem frequentemente suscitar uma resposta imunológica.

Por conseguinte, são aqui descritos anticorpos que ligam polipéptidos possuindo um ou mais resíduos suprimidos da extremidade carboxilo da sequência de aminoácidos da sequência polipeptídica de TR4 de SEQ ID N°:1 até ao resíduo de alanina na posição número 30, e os polinucleótidos que codificam tais polipéptidos. Em particular, são aqui descritos anticorpos que ligam polipéptidos compreendendo a sequência de aminoácidos dos resíduos 24-m¹ de SEQ ID N°:1, em que m¹ é um número inteiro desde 30 a 467 que corresponde à posição do resíduo de aminoácido na SEQ ID N°:1.

Mais em particular, são aqui descritos anticorpos que ligam polipéptidos compreendendo ou, alternativamente, consistindo da sequência de aminoácidos dos resíduos A-24 a L-467; A-24 a S-466; A-24 a V-465; A-24 a T-464; A-24 a S-463; A-24 a G-462; A-24 a T-461; A-24 a G-460; A-24 a D-459; A-24 a E-458; A-24 a L-457; A-24 a Y-456; A-24 a I-455; A-24 a F-454; A-24 a K-453; A-24 a G-452; A-24 a S-451; A-24 a D-450; A-24 a V-449; A-24 a L-448; A-24 a L-447; A-24 a D-446; A-24 a Q-445; A-24 a L-444; A-24 a K-443; A-24 a E-442; A-24 a K-441; A-24 a T-440; A-24 a H-439; A-24 a R-438; A-24 a E-437; A-24 a E-436; A-24 a M-435; A-24 a R-434; A-24 a E-433; A-24 a L-432; A-24 a T-431; A-24 a D-430; A-24 a L-429; A-24 a L-428; A-24 a T-427; A-24 a H-426; A-24 a I-425; A-24 a S-424; A-24 a T-423; A-24 a N-422; A-24 a R-421; A-24 a G-420; A-24 a T-419; A-24 a K-418; A-24 a N-417; A-24 a V-416; A-24 a W-415; A-24 a K-414; A-24 a M-413; A-24 a L-412; A-24 a M-411; A-24 a T-410; A-24 a Y-409; A-24 a L-408; A-24 a T-407; A-24 a D-406; A-24 a G-405; A-24 a P-404; A-24 a G-403; A-24 a T-402; A-24 a T-401; A-24 a G-400; A-24 a T-399; A-24 a R-398; A-24 a V-397; A-24 a V-396; A-24 a D-395; A-24 a I-394; A-24 a E-393; A-24 a N-392; A-24 a K-391; A-24 a T-390; A-24 a L-389; A-24 a D-388; A-24 a L-387; A-24 a Q-386; A-24 a R-385;

A-24 a M-384; A-24 a L-383; A-24 a Q-382; A-24 a D-381; A-24 a W-380; A-24 a S-379; A-24 a D-378; A-24 a F-377; A-24 a P-376; A-24 a V-375; A-24 a I-374; A-24 a N-373; A-24 a D-372; A-24 a F-371; A-24 a K-370; A-24 a D-369; A-24 a F-368; A-24 a F-367; A-24 a L-366; A-24 a M-365; A-24 a L-364; A-24 a T-363; A-24 a E-362; A-24 a T-361; A-24 a P-360; A-24 a D-359; A-24 a D-358; A-24 a G-357; A-24 a N-356; A-24 a D-355; A-24 a P-354; A-24 a V-353; A-24 a L-352; A-24 a L-351; A-24 a R-350; A-24 a R-349; A-24 a R-348; A-24 a Q-347; A-24 a S-346; A-24 a G-345; A-24 a E-344; A-24 a D-343; A-24 a E-342; A-24 a D-341; A-24 a P-340; A-24 a G-339; A-24 a L-338; A-24 a L-337; A-24 a C-336; A-24 a Q-335; A-24 a D-334; A-24 a E-333; A-24 a G-332; A-24 a P-331; A-24 a S-330; A-24 a Q-329; A-24 a V-328; A-24 a T-327; A-24 a V-326; A-24 a G-325; A-24 a T-324; A-24 a L-323; A-24 a D-322; A-24 a D-321; A-24 a P-320; A-24 a E-319; A-24 a Q-318; A-24 a S-317; A-24 a E-316; A-24 a M-315; A-24 a Q-314; A-24 a Q-313; A-24 a E-312; A-24 a S-311; A-24 a V-310; A-24 a F-309; A-24 a T-308; A-24 a S-307; A-24 a L-306; A-24 a S-305; A-24 a D-304; A-24 a D-303; A-24 a N-302; A-24 a S-301; A-24 a L-300; A-24 a I-299; A-24 a E-298; A-24 a N-297; A-24 a H-296; A-24 a D-295; A-24 a N-294; A-24 a D-293; A-24 a E-292; A-24 a D-291; A-24 a G-290; A-24 a P-289; A-24 a G-288; A-24 a R-287; A-24 a L-286; A-24 a L-285; A-24 a G-284; A-24 a L-283; A-24 a R-282; A-24 a W-281; A-24 a F-280; A-24 a C-279; A-24 a V-278; A-24 a R-277; A-24 a D-276; A-24 a M-275; A-24 a C-274; A-24 a K-273; A-24 a P-272; A-24 a D-271; A-24 a G-270; A-24 a G-269; A-24 a C-268; A-24 a G-267; A-24 a S-266; A-24 a G-265; A-24 a I-264; A-24 a C-263; A-24 a C-262; A-24 a C-261; A-24 a V-260; A-24 a I-259; A-24 a L-258; A-24 a V-257; A-24 a D-256; A-24 a V-255; A-24 a L-254; A-24 a L-253; A-24 a L-252; A-24 a P-251; A-24 a V-250; A-24 a V-249; A-24 a L-248; A-24 a T-247; A-24 a V-246; A-24 a V-245; A-24 a L-244; A-24 a I-243; A-24 a V-242; A-24 a W-241; A-24 a

I-240; A-24 a N-239; A-24 a H-238; A-24 a G-237; A-24 a N-236;
A-24 a G-235; A-24 a S-234; A-24 a E-233; A-24 a K-232; A-24 a
H-231; A-24 a V-230; A-24 a C-229; A-24 a E-228; A-24 a I-227;
A-24 a D-226; A-24 a S-225; A-24 a W-224; A-24 a P-223; A-24 a
T-222; A-24 a C-221; A-24 a D-220; A-24 a K-219; A-24 a V-218;
A-24 a K-217; A-24 a V-216; A-24 a M-215; A-24 a G-214; A-24 a
R-213; A-24 a P-212; A-24 a C-211; A-24 a G-210; A-24 a T-209;
A-24 a S-208; A-24 a C-207; A-24 a K-206; A-24 a R-205; A-24 a
C-204; A-24 a M-203; A-24 a E-202; A-24 à-201; A-24 a S-200;
A-24 a N-199; A-24 a D-198; A-24 a N-197; A-24 a R-196; A-24 a
F-195; A-24 a T-194; A-24 a G-193; A-24 a P-192; A-24 a K-191;
A-24 a C-190; A-24 a Q-189; A-24 a C-188; A-24 à-187; A-24 a
T-186; A-24 a N-185; A-24 a R-184; A-24 a T-183; A-24 a T-182;
A-24 a T-181; A-24 a C-180; A-24 a P-179; A-24 a S-178; A-24 a
R-177; A-24 a E-176; A-24 a E-175; A-24 a E-174; A-24 a D-173;
A-24 a S-172; A-24 a K-171; A-24 a C-170; A-24 à-169; A-24 a
T-168; A-24 a C-167; A-24 a P-166; A-24 a L-165; A-24 a C-164;
A-24 à-163; A-24 a F-162; A-24 a L-161; A-24 a N-160; A-24 a
N-159; A-24 a S-158; A-24 à-157; A-24 a N-156; A-24 a T-155;
A-24 a Y-154; A-24 a G-153; A-24 a V-152; A-24 a G-151; A-24 a
E-150; A-24 a T-149; A-24 a C-148; A-24 a R-147; A-24 a N-146;
A-24 a C-145; A-24 à-144; A-24 a G-143; A-24 a P-142; A-24 a
R-141; A-24 a E-140; A-24 a S-139; A-24 a R-138; A-24 a H-137;
A-24 a S-136; A-24 a G-135; A-24 a P-134; A-24 a P-133; A-24 a
C-132; A-24 a L-131; A-24 a E-130; A-24 a G-129; A-24 a L-128;
A-24 a P-127; A-24 a S-126; A-24 a H-125; A-24 a E-124; A-24 a
W-123; A-24 a Q-122; A-24 a Q-121; A-24 a T-120; A-24 a G-119;
A-24 a I-118; A-24 a S-117; A-24 a Q-116; A-24 a D-115; A-24 a
H-114; A-24 a L-113; A-24 a K-112; A-24 a I-111; A-24 a T-110;
A-24 à-109; A-24 à-108; A-24 a S-107; A-24 a S-106; A-24 a
P-105; A-24 a V-104; A-24 a V-103; A-24 a Q-102; A-24 a L-101;
A-24 a L-100; A-24 a V-99; A-24 a G-98; A-24 a V-97; A-24 a

V-96; A-24 a V-95; A-24 a F-94; A-24 a K-93; A-24 a F-92; A-24 a T-91; A-24 a K-90; A-24 a H-89; A-24 a V-88; A-24 a R-87; A-24 a L-86; A-24 a R-85; A-24 a P-84; A-24 a S-83; A-24 à-82; A-24 a E-81; A-24 a R-80; A-24 à-79; A-24 a P-78; A-24 a R-77; A-24 a P-76; A-24 a G-75; A-24 a P-74; A-24 à-73; A-24 a R-72; A-24 a G-71; A-24 à-70; A-24 a R-69; A-24 à-68; A-24 a R-67; A-24 à-66; A-24 a S-65; A-24 a P-64; A-24 a G-63; A-24 a H-62; A-24 a Q-61; A-24 a G-60; A-24 a M-59; A-24 a S-58; A-24 a T-57; A-24 a P-56; A-24 a L-55; A-24 à-54; A-24 a G-53; A-24 a R-52; A-24 a G-51; A-24 a G-50; A-24 a G-49; A-24 a R-48; A-24 a P-47; A-24 a E-46; A-24 a I-45; A-24 a R-44; A-24 a G-43; A-24 à-42; A-24 a S-41; A-24 a S-40; A-24 a G-39; A-24 a W-38; A-24 a V-37; A-24 a K-36; A-24 a S-35; A-24 a P-34; A-24 a T-33; A-24 à-32; A-24 à-31; e/ou A-24 à-30 da sequência de TR4 de SEQ ID N°:1.

Noutro caso, os anticorpos aqui descritos ligam supressões C-terminais do polipéptido de TR4 que podem ser descritas pela fórmula geral 24-m² em que m² é um número desde 30 a 238 que corresponde à sequência de aminoácidos identificada da SEQ ID N°:1. Em casos específicos, são aqui descritos anticorpos que ligam polipéptidos de TR4 compreendendo ou, alternativamente, consistindo da sequência de aminoácidos de resíduos: A-24 a G-237; A-24 a N-236; A-24 a G-235; A-24 a S-234; A-24 a E-233; A-24 a K-232; A-24 a H-231; A-24 a V-230; A-24 a C-229; A-24 a E-228; A-24 a I-227; A-24 a D-226; A-24 a S-225; A-24 a W-224; A-24 a P-223; A-24 a T-222; A-24 a C-221; A-24 a D-220; A-24 a K-219; A-24 a V-218; A-24 a K-217; A-24 a V-216; A-24 a M-215; A-24 a G-214; A-24 a R-213; A-24 a P-212; A-24 a C-211; A-24 a G-210; A-24 a T-209; A-24 a S-208; A-24 a C-207; A-24 a K-206; A-24 a R-205; A-24 a C-204; A-24 a M-203; A-24 a E-202; A-24 à-201; A-24 a S-200; A-24 a N-199; A-24 a D-198; A-24 a N-197; A-24 a R-196; A-24 a F-195; A-24 a T-194;

A-24 a G-193; A-24 a P-192; A-24 a K-191; A-24 a C-190; A-24 a Q-189; A-24 a C-188; A-24 à-187; A-24 a T-186; A-24 a N-185; A-24 a R-184; A-24 a T-183; A-24 a T-182; A-24 a T-181; A-24 a C-180; A-24 a P-179; A-24 a S-178; A-24 a R-177; A-24 a E-176; A-24 a E-175; A-24 a E-174; A-24 a D-173; A-24 a S-172; A-24 a K-171; A-24 a C-170; A-24 à-169; A-24 a T-168; A-24 a C-167; A-24 a P-166; A-24 a L-165; A-24 a C-164; A-24 à-163; A-24 a F-162; A-24 a L-161; A-24 a N-160; A-24 a N-159; A-24 a S-158; A-24 à-157; A-24 a N-156; A-24 a T-155; A-24 a Y-154; A-24 a G-153; A-24 a V-152; A-24 a G-151; A-24 a E-150; A-24 a T-149; A-24 a C-148; A-24 a R-147; A-24 a N-146; A-24 a C-145; A-24 à-144; A-24 a G-143; A-24 a P-142; A-24 a R-141; A-24 a E-140; A-24 a S-139; A-24 a R-138; A-24 a H-137; A-24 a S-136; A-24 a G-135; A-24 a P-134; A-24 a P-133; A-24 a C-132; A-24 a L-131; A-24 a E-130; A-24 a G-129; A-24 a L-128; A-24 a P-127; A-24 a S-126; A-24 a H-125; A-24 a E-124; A-24 a W-123; A-24 a Q-122; A-24 a Q-121; A-24 a T-120; A-24 a G-119; A-24 a I-118; A-24 a S-117; A-24 a Q-116; A-24 a D-115; A-24 a H-114; A-24 a L-113; A-24 a K-112; A-24 a I-111; A-24 a T-110; A-24 à-109; A-24 à-108; A-24 a S-107; A-24 a S-106; A-24 a P-105; A-24 a V-104; A-24 a V-103; A-24 a Q-102; A-24 a L-101; A-24 a L-100; A-24 a V-99; A-24 a G-98; A-24 a V-97; A-24 a V-96; A-24 a V-95; A-24 a F-94; A-24 a K-93; A-24 a F-92; A-24 a T-91; A-24 a K-90; A-24 a H-89; A-24 a V-88; A-24 a R-87; A-24 a L-86; A-24 a R-85; A-24 a P-84; A-24 a S-83; A-24 à-82; A-24 a E-81; A-24 a R-80; A-24 à-79; A-24 a P-78; A-24 a R-77; A-24 a P-76; A-24 a G-75; A-24 a P-74; A-24 à-73; A-24 a R-72; A-24 a G-71; A-24 à-70; A-24 a R-69; A-24 à-68; A-24 a R-67; A-24 à-66; A-24 a S-65; A-24 a P-64; A-24 a G-63; A-24 a H-62; A-24 a Q-61; A-24 a G-60; A-24 a M-59; A-24 a S-58; A-24 a T-57; A-24 a P-56; A-24 a L-55; A-24 à-54; A-24 a G-53; A-24 a R-52; A-24 a G-51; A-24 a G-50; A-24 a G-49; A-24 a R-48; A-24 a P-47; A-24 a E-46; A-24 a I-45; A-24 a

R-44; A-24 a G-43; A-24 à-42; A-24 a S-41; A-24 a S-40; A-24 a G-39; A-24 a W-38; A-24 a V-37; A-24 a K-36; A-24 a S-35; A-24 a P-34; A-24 a T-33; A-24 à-32; A-24 à-31; e/ou A-24 à-30; da sequência do domínio extracelular de TR4 da SEQ ID N°:1.

São também aqui descritos anticorpos que ligam polipéptidos possuindo um ou mais resíduos da extremidade carboxilo da sequência de aminoácidos do polipéptido de TR4 da SEQ ID N°:1, até ao C-221 da SEQ ID N°:1. Em particular, são aqui proporcionados anticorpos que ligam polipéptidos possuindo a sequência de aminoácidos dos resíduos 1-m⁹ da sequência de aminoácidos na SEQ ID N°:1, em que m⁹ é qualquer número inteiro na gama de 221-468 e o resíduo C-221 é a posição do primeiro resíduo da extremidade C-terminal do polipéptido de TR4 completo (mostrado na SEQ ID N°:1) que se julga que seja necessário para a actividade de ligação ao receptor da proteína TR4.

São também aqui descritos anticorpos que ligam polipéptidos que têm um ou mais aminoácidos suprimidos de ambas as extremidade, amino e carboxilo, de um polipéptido de TR4, os quais podem ser geralmente descritos como possuindo os resíduos n¹ - m¹ e/ou n² - m² da SEQ ID N°:1, em que n¹, n², m¹ e m² são números inteiros como descritos acima.

São também aqui descritos anticorpos que ligam um polipéptido consistindo de uma porção da sequência de aminoácidos de TR4 completo codificado pelo clone de ADNc contido no Depósito ATCC n° 97853, em que esta porção exclui desde 1 até cerca de 108 aminoácidos da extremidade amino da sequência de aminoácidos completa codificada pelo clone de ADNc contido no Depósito ATCC n° 97853, ou desde 1 até cerca de 247 aminoácidos da extremidade carboxilo, ou qualquer combinação

das supressões amino-terminais e carboxi-terminais acima, da sequência de aminoácidos completa codificada pelo clone de ADNc contido no Depósito ATCC nº 97853.

De um modo preferido, os anticorpos aqui descritos ligam fragmentos de TR4 compreendendo uma porção do domínio extracelular; *i. e.*, nos resíduos 24-238 da SEQ ID N°:1, uma vez que se prevê que qualquer porção ali contida seja solúvel.

Será reconhecido na técnica que alguma sequência de aminoácidos de TR4 pode ser modificada sem efeito significativo na estrutura ou função da proteína. Se foram consideradas tais diferenças na sequência, deve recordar-se que existirão áreas críticas na proteína que determinam a actividade. Tais áreas compreenderão geralmente os resíduos que constituam o sítio de ligação a ligando ou o domínio de morte, ou que formam estruturas terciárias que afectam estes domínios.

Assim, são também aqui descritos anticorpos que ligam variantes da proteína TR4 que exibem actividade substancial de proteína TR4 ou que incluem regiões de TR4 tais como os fragmentos de proteína discutidos abaixo. Tais mutantes incluem supressões, inserções, inversões, repetições e substituição de tipo. As linhas de orientação sobre as alterações de aminoácido com probabilidade de serem fenotipicamente silenciosas podem ser encontradas em Bowie, J.U. *et al.*, Science 247:1306-1310 (1990).

Assim, os anticorpos aqui descritos podem ligar um fragmento, derivado ou análogo do polipéptido da SEQ ID N°:1, ou que é codificado pelo ADNc no Depósito ATCC 97853. Tais fragmentos, variantes ou derivados podem ser (i) um em que pelo menos um ou mais dos resíduos de aminoácido são substituídos por

um resíduo de aminoácido conservado ou não conservado (de um modo preferido um resíduo(s) de aminoácido conservado e, de um modo mais preferido, pelo menos, um mas menos de dez resíduos de aminoácido conservados) e esse resíduo de aminoácido substituído pode ser, ou não, um resíduo codificado pelo código genético, ou (ii) um em que um ou mais dos resíduos de aminoácido inclui um grupo substituinte, ou (iii) um em que o polipéptido maduro está fundido com outro composto, tal como um composto para aumentar a semivida do polipéptido (por exemplo, polietilenoglicol), ou (iv) um em que os aminoácidos adicionais estão fundidos com o polipéptido maduro, tal como um péptido da região de fusão de Fc de IgG ou sequência líder ou secretora ou uma sequência que é utilizada para a purificação do polipéptido maduro ou uma sequência de proproteína. Tais fragmentos, derivados e análogos são considerados como estando dentro do âmbito dos especialistas na técnica a partir dos ensinamentos aqui contidos.

De particular interesse são as substituições de aminoácidos carregados por outro aminoácido carregado e por aminoácidos neutros ou carregados negativamente. Os últimos resultam em proteínas com carga positiva reduzida para melhorar as características da proteína TR4. A prevenção de agregação é altamente desejável. A agregação de proteínas não só resulta numa perda de actividade mas pode ser também problemática quando se prepara formulações farmacêuticas, porque podem ser imunogénicas. (Pinckard *et al.*, Clin Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbins *et al.*, *Diabetes* 36:838-845 (1987); Cleland *et al.* *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* 10:307-377 (1993)).

A substituição de aminoácidos pode mudar também a selectividade de ligação aos receptores da superfície celular.

Ostade *et al.*, *Nature* 361:266-268 (1993) descreve determinadas mutações que resultam na ligação selectiva de TNF-alfa a apenas um dos dois tipos de receptores de TNF conhecidos. Assim, os anticorpos aqui descritos podem ligar um receptor TR4 que contém uma ou mais substituições, supressões ou adições de aminoácidos, quer por mutações naturais ou manipulação humana.

Como indicado, as alterações são, de um modo preferido, de uma natureza menor, tais como substituições conservadoras de aminoácidos que não afectam significativamente a dobragem ou actividade da proteína (ver Quadro 3).

QUADRO 3. Substituições Conservadoras de Aminoácidos.

Aromáticos	Fenilalanina
	Triptofano
	Tirosina
Hidrófobos	Leucina
	Isoleucina
	Valina
Polares	Glutamina
	Asparagina
Básicos	Arginina
	Lisina
	Histidina
Ácidos	Ácido Aspártico
	Ácido Glutâmico

Pequenos	Alanina Serina Treonina Metionina Glicina
----------	---

Em casos específicos, o número de substituições, adições ou supressões na sequência de aminoácidos de SEQ ID N°:1 e/ou em qualquer um dos fragmentos de polipéptido aqui descritos (e. g., o domínio extracelular ou domínio intracelular) é de 75, 70, 60, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 30-20, 20-15, 20-10, 15-10, 10-1, 5-10, 1-5, 1-3 ou 1-2.

Em casos específicos, os anticorpos aqui descritos ligam polipéptidos de TR4 ou os seus fragmentos ou variantes (especialmente um fragmento compreendendo ou, alternativamente, consistindo do domínio extracelular solúvel de TR4) que contém qualquer uma ou mais das seguintes mutações conservadoras em TR4: M1 substituída com A, G, I, L, S, T ou V; A2 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; A6 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; R7 substituída com H ou K; V8 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; H9 substituída com K ou R; L10 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; G11 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; A12 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; F13 substituída com W ou Y; L14 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; A15 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; V16 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; T 17 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; N19 substituída com Q; G21 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; S22 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; A23 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; A24 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; S25 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; G26 substituída

com A, I, L, S, T, M ou V; T27 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; E28 substituído com D; A29 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; A30 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; A31 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; A32 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; T33 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; S35 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; K36 substituída com H ou R; V37 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; W38 substituído com F ou Y; G39 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; S40 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; S41 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; A42 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; G43 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; R44 substituída com H ou K; I45 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; E46 substituído com D; R48 substituída com H ou K; G49 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; G50 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; G51 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; R52 substituída com H ou K; G53 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; A54 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; L55 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; T57 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; S58 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; M59 substituída com A, G, I, L, S, T ou V; G60 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; Q61 substituída com N; H62 substituída com K ou R; G63 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; S65 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; A66 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; R67 substituída com H ou K; A68 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; R69 substituída com H ou K; A70 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; G71 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; R72 substituída com H ou K; A73 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; G75 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; R77 substituída com H ou K; A79 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; R80 substituída com H ou K; E81 substituído com D; A82 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; S83 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; R85 substituída com H ou K; L86 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; R87

substituída com H ou K; V88 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; H89 substituída com K ou R; K90 substituída com H ou R; T91 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; F92 substituída com W ou Y; K93 substituída com H ou R; F94 substituída com W ou Y; V95 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; V96 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; V97 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; G98 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; V99 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; L100 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; L101 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; Q102 substituída com N; V103 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; V104 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; S106 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; S107 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; A108 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; A109 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; T110 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; I111 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; K112 substituída com H ou R; L113 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; H114 substituída com K ou R; D115 substituído com E; Q116 substituída com N; S117 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; I118 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; G119 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; T120 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; Q121 substituída com N; Q122 substituída com N; W123 substituído com F ou Y; E124 substituído com D; H125 substituída com K ou R; S126 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; L128 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; G129 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; E130 substituído com D; L131 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; G135 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; S136 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; H137 substituída com K ou R; R138 substituída com H ou K; S139 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; E140 substituído com D; R141 substituída com H ou K; G143 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; A144 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; N146 substituída com Q; R147 substituída com H ou K; T149 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; E150

substituído com D; G151 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; V152 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; G153 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; Y154 substituída com F ou W; T155 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; N156 substituída com Q; A157 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; S158 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; N159 substituída com Q; N160 substituída com Q; L161 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; F162 substituída com W ou Y; A163 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; L165 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; T168 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; A169 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; K171 substituída com H ou R; S172 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; D173 substituído com E; E174 substituído com D; E175 substituído com D; E176 substituído com D; R177 substituída com H ou K; S178 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; T181 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; T182 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; T183 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; R184 substituída com H ou K; N185 substituída com Q; T186 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; A187 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; Q189 substituída com N; K191 substituída com H ou R; G193 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; T194 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; F195 substituída com W ou Y; R196 substituída com H ou K; N197 substituída com Q; D198 substituído com E; N199 substituída com Q; S200 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; A201 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; E202 substituído com D; M203 substituída com A, G, I, L, S, T ou V; R205 substituída com H ou K; K206 substituída com H ou R; S208 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; T209 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; G210 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; R213 substituída com H ou K; G214 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; M215 substituída com A, G, I, L, S, T ou V; V216 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; K217 substituída com H ou R; V218 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; K219 substituída

com H ou R; D220 substituído com E; T222 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; W224 substituído com F ou Y; S225 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; D226 substituído com E; I227 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; E228 substituído com D; V230 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; H231 substituída com K ou R; K232 substituída com H ou R; E233 substituído com D; S234 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; G235 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; N236 substituída com Q; G237 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; H238 substituída com K ou R; N239 substituída com Q; I240 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; W241 substituído com F ou Y; V242 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; I243 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; L244 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; V245 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; V246 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; T247 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; L248 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; V249 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; V250 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; L252 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; L253 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; L254 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; V255 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; A256 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; V257 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; L258 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; I259 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; V260 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; I264 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; G265 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; S266 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; G267 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; G269 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; G270 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; D271 substituído com E; K273 substituída com H ou R; M275 substituída com A, G, I, L, S, T ou V; D276 substituído com E; R277 substituída com H ou K; V278 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; F280 substituída com W ou Y; W281 substituído com F ou Y; R282 substituída com H ou K; L283

substituída com A, G, I, S, T, M ou V; G284 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; L285 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; L286 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; R287 substituída com H ou K; G288 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; G290 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; A291 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; E292 substituído com D; D293 substituído com E; N294 substituída com Q; A295 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; H296 substituída com K ou R; N297 substituída com Q; E298 substituído com D; I299 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; L300 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; S301 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; N302 substituída com Q; A303 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; D304 substituído com E; S305 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; L306 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; S307 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; T308 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; F309 substituída com W ou Y; V310 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; S311 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; E312 substituído com D; Q313 substituída com N; Q314 substituída com N; M315 substituída com A, G, I, L, S, T ou V; E316 substituído com D; S317 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; Q318 substituída com N; E319 substituído com D; A321 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; D322 substituído com E; L323 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; T324 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; G325 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; V326 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; T327 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; V328 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; Q329 substituída com N; S330 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; G332 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; E333 substituído com D; A334 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; Q335 substituída com N; L337 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; L338 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; G339 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; A341 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; E342 substituído

com D; A343 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; E344 substituído com D; G345 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; S346 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; Q347 substituída com N; R348 substituída com H ou K; R349 substituída com H ou K; R350 substituída com H ou K; L351 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; L352 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; V353 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; A355 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; N356 substituída com Q; G357 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; A358 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; D359 substituído com E; T361 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; E362 substituído com D; T363 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; L364 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; M365 substituída com A, G, I, L, S, T ou V; L366 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; F367 substituída com W ou Y; F368 substituída com W ou Y; D369 substituído com E; K370 substituída com H ou R; F371 substituída com W ou Y; A372 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; N373 substituída com Q; I374 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; V375 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; F377 substituída com W ou Y; D378 substituído com E; S379 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; W380 substituído com F ou Y; D381 substituído com E; Q382 substituída com N; L383 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; M384 substituída com A, G, I, L, S, T ou V; R385 substituída com H ou K; Q386 substituída com N; L387 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; D388 substituído com E; L389 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; T390 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; K391 substituída com H ou R; N392 substituída com Q; E393 substituído com D; I394 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; D395 substituído com E; V396 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; V397 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; R398 substituída com H ou K; A399 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; G400 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; T401 substituída com A, G, I, L, S, M ou V;

A402 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; G403 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; G405 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; D406 substituído com E; A407 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; L408 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; Y409 substituída com F ou W; A410 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; M411 substituída com A, G, I, L, S, T ou V; L412 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; M413 substituída com A, G, I, L, S, T ou V; K414 substituída com H ou R; W415 substituído com F ou Y; V416 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; N417 substituída com Q; K418 substituída com H ou R; T419 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; G420 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; R421 substituída com H ou K; N422 substituída com Q; A423 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; S424 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; I425 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; H426 substituída com K ou R; T427 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; L428 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; L429 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; D430 substituído com E; A431 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; L432 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; E433 substituído com D; R434 substituída com H ou K; M435 substituída com A, G, I, L, S, T ou V; E436 substituído com D; E437 substituído com D; R438 substituída com H ou K; H439 substituída com K ou R; A440 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; K441 substituída com H ou R; E442 substituído com D; K443 substituída com H ou R; I444 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; Q445 substituída com N; D446 substituído com E; L447 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; L448 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; V449 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; D450 substituído com E; S451 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; G452 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; K453 substituída com H ou R; F454 substituída com W ou Y; I455 substituída com A, G, L, S, T, M ou V; Y456 substituída com F ou W; L457 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; E458 substituído

com D; D459 substituído com E; G460 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; T461 substituída com A, G, I, L, S, M ou V; G462 substituída com A, I, L, S, T, M ou V; S463 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; A464 substituída com G, I, L, S, T, M ou V; V465 substituída com A, G, I, L, S, T ou M; S466 substituída com A, G, I, L, T, M ou V; L467 substituída com A, G, I, S, T, M ou V; e/ou E468 substituído com D da SEQ ID N°:1.

Em casos específicos, os anticorpos aqui descritos ligam polipéptidos de TR4 ou seus fragmentos ou variantes (especialmente um fragmento compreendendo ou, alternativamente, consistindo do domínio extracelular solúvel de TR4) que contém qualquer uma ou mais das seguintes mutações não conservadoras em TR4: M1 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A2 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P3 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; P4 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; P5 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; A6 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R7 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; V8 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; H9 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; L10 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G11 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A12 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; F13 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; L14 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A15 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V16 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T17 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P18 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; N19 substituída com D, E, H, K, R,

A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; P20 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; G21 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S22 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A23 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A24 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S25 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G26 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T27 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E28 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; A29 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A30 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A31 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A32 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T33 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P34 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; S35 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; K36 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; V37 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; W38 substituído com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; G39 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S40 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S41 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A42 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G43 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R44 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; I45 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E46 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; P47 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; R48 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; G49 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G50 substituída com D, E, H, K, R,

N, Q, F, W, Y, P ou C; G51 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R52 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; G53 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A54 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L55 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P56 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; T57 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S58 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; M59 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G60 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q61 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; H62 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; G63 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P64 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; S65 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A66 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R67 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; A68 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R69 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; A70 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G71 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R72 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; A73 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P74 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; G75 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P76 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; R77 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; P78 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; A79 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R80 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; E81 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M,

V, N, Q, F, W, Y, P ou C; A82 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S83 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P84 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; R85 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; L86 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R87 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; V88 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; H89 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; K90 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; T91 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; F92 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; K93 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; F94 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; V95 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V96 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V97 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G98 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V99 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L100 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L101 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q102 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; V103 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V104 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P105 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; S106 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S107 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A108 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A109 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T110 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; I111 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; K112 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P

ou C; L113 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; H114 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; D115 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q116 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; S117 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; I118 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G119 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T120 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q121 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; Q122 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; W123 substituído com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; E124 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; H125 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; S126 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P127 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; L128 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G129 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E130 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; L131 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; C132 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; P133 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; P134 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; G135 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S136 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; H137 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; R138 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; S139 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E140 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; R141 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; P142 substituída com D, E, H, K,

R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; G143 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A144 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; C145 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; N146 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; R147 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; C148 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; T149 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E150 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; G151 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V152 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G153 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; Y154 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; T155 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; N156 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; A157 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S158 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; N159 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; N160 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; L161 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; F162 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; A163 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; C164 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; L165 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P166 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; C167 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; T168 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A169 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; C170 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; K171 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; S 172

substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; D 173 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; E 174 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; E175 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; E176 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; R177 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; S178 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P179 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; C 180 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; T181 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T182 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T183 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R184 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; N185 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; T186 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A187 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; C188 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; Q 189 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; C190 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; K191 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; P 192 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; G193 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T194 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; F195 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; R196 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; N197 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; D198 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; N199 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; S200 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F,

W, Y, P ou C; A201 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E202 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; M203 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; C204 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; R205 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; K206 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; C207 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; S208 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T209 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G210 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; C211 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; P212 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; R213 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; G214 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; M215 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V216 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; K217 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; V218 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; K219 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; D220 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; C221 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; T222 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P223 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; W224 substituído com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; S225 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; D226 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; I227 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E228 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; C229 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; V230 substituída

com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; H231 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; K232 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; E233 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; S234 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G235 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; N236 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; G237 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; H238 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; N239 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; I240 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; W241 substituído com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; V242 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; I243 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L244 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V245 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V246 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T247 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L248 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V249 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V250 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P251 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; L252 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L253 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L254 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V255 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A256 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V257 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L258 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; I259 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V260 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; C261 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F,

W, Y ou P; C262 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; C263 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; I264 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G265 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S266 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G267 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; C268 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; G269 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G270 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; D271 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; P272 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; K273 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; C274 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; M275 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; D276 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; R277 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; V278 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; C279 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; F280 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; W281 substituído com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; R282 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; L283 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G284 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L285 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L286 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R287 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; G288 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P289 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; G290 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A291 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P

ou C; E292 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; D293 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; N294 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; A295 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; H296 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; N297 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; E298 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; I299 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L300 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S301 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; N302 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; A303 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; D304 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; S305 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L306 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S307 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T308 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; F309 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; V310 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S311 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E312 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q313 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; Q314 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; M315 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E316 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; S317 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q318 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; E319 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; P320 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; A321 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P

ou C; D322 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; L323 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T324 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G325 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V326 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T327 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V328 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q329 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; S330 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P331 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; G332 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E333 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; A334 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q335 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; C336 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou P; L337 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L338 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G339 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P340 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; A341 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E342 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; A343 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E344 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; G345 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S346 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q347 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; R348 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; R349 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; R350 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; L351 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L352 substituída com D, E, H,

K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V353 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P354 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; A355 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; N356 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; G357 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A358 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; D359 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; P360 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; T361 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E362 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; T363 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L364 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; M365 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L366 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; F367 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; F368 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; D369 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; K370 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; F371 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; A372 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; N373 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; I374 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V375 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P376 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; F377 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; D378 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; S379 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; W380 substituído com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; D381 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q382 substituída

com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; L383 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; M384 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R385 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q386 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; L387 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; D388 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; L389 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T390 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; K391 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; N392 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; E393 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; I394 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; D395 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; V396 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V397 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R398 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; A399 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G400 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T401 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A402 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G403 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; P404 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y ou C; G405 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; D406 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; A407 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L408 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; Y409 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; A410 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; M411 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L412 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C;

M413 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; K414 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; W415 substituído com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; V416 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; N417 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; K418 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; T419 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G420 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; R421 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; N422 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; A423 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S424 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; I425 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; H426 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; T427 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L428 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L429 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; D430 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; A431 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L432 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E433 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; R434 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; M435 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E436 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; E437 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; R438 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; H439 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; A440 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; K441 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; E442 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; K443 substituída com D, E, A, G,

I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; I444 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; Q445 substituída com D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P ou C; D446 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; L447 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L448 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V449 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; D450 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; S451 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G452 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; K453 substituída com D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; F454 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; I455 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; Y456 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P ou C; L457 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; E458 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; D459 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C; G460 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; T461 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; G462 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S463 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; A464 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; V465 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; S466 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; L467 substituída com D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P ou C; e/ou E468 substituído com H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P ou C da SEQ ID N°:1.

Os aminoácidos na proteína TR4 que são essenciais para a função podem ser identificados por métodos conhecidos na técnica, tais como mutagénese específica de um locus ou mutagénese de varrimento de alanina (Cunningham e Wells, *Science*

244:1081-1085 (1989)). O último procedimento introduz mutações simples de alanina em cada resíduo na molécula. As moléculas mutantes resultantes são depois testadas quanto à actividade biológica tal como ligação ao receptor ou *in vitro* ou actividade proliferativa *in vitro*. Os sítios que são críticos para ligação do receptor ao ligando podem ser também determinados por análise estrutural, tais como cristalização, ressonância magnética nuclear ou marcação por fotoafinidade (Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224:899-904 (1992) e de Vos *et al.* *Science* 255:306-312 (1992)). Em casos preferidos, os anticorpos aqui descritos ligam regiões de TR4 que são essenciais para a função do TR4. Noutros casos preferidos, os anticorpos aqui descritos ligam regiões de TR4 que são essenciais para a função do TR4 e inibem ou anulam a função do TR4. Noutros casos preferidos, os anticorpos aqui descritos ligam regiões de TR4 que são essenciais para a função do TR4 e melhoram a função do TR4.

Adicionalmente, pode utilizar-se a engenharia de proteínas para melhorar ou alterar as características de polipéptidos de TR4. A tecnologia de ADN recombinante conhecida dos especialistas na técnica pode ser utilizada para criar novas proteínas mutantes ou muteínas incluindo substituições, supressões, adições simples ou múltiplas de aminoácidos ou proteínas de fusão. Tais polipéptidos modificados podem exhibir, e. g., melhor actividade ou maior estabilidade. Além disso, estes podem ser purificados com rendimentos mais altos e exhibir melhor solubilidade do que o polipéptido natural correspondente, pelo menos em determinadas condições de purificação e conservação. Os anticorpos aqui descritos podem ligar tais polipéptidos de TR4 modificados.

As variantes não naturais de TR4 podem ser produzidas utilizando técnicas de mutagénese conhecidas na técnica, as quais incluem, mas não estão limitadas a mutagénese mediada por oligonucleótidos, varrimento de alanina, mutagénese por PCR, mutagénese específica de um locus (ver e. g., Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 13:4331 (1986); e Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 10:6487 (1982)), mutagénese de cassette (ver e. g., Wells *et al.*, *Gene* 34:315 (1985)), mutagénese de selecção de restrição (ver e. g., Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA* 317:415 (1986)).

Assim, são aqui descritos anticorpos que ligam derivados e análogos de TR4 que têm um ou mais resíduos de aminoácido suprimidos, adicionados ou substituídos para produzir polipéptidos de TR4 que são mais adequados para expressão, aumento de escala, etc., nas células hospedeiras escolhidas. Por exemplo, os resíduos de cisteína podem ser suprimidos ou substituídos por outro resíduo de aminoácido para eliminar as pontes dissulfureto; os sítios de glicosilação ligados a N podem ser alterados ou eliminados para conseguir, por exemplo, a expressão de um produto homogéneo que é mais facilmente recuperado e purificado dos hospedeiros de levedura que são conhecidos por hiperglicosilar sítios ligados a N. Para este objectivo, uma variedade de substituições de aminoácidos em uma ou ambas das primeira ou terceira posições de aminoácido em qualquer uma ou mais das sequências de reconhecimento de glicosilação nos polipéptidos de TR4 e/ou uma supressão de aminoácido na segunda posição de qualquer uma ou mais dessas sequências de reconhecimento impedirá a glicosilação do TR4 na sequência tripeptídica modificada (ver, e. g., Miyajimo *et al.*, *EMBO J* 5(6):1193-1197). Adicionalmente, um ou mais dos resíduos de aminoácido dos polipéptidos de TR4 (e. g., resíduos de

arginina e lisina) podem ser suprimidos ou substituídos por outro resíduo para eliminar o processamento indesejado por proteases, tais como, por exemplo, furinas ou cexinas.

Os anticorpos aqui descritos incluem também anticorpos que ligam um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo do polipéptido codificado pelo ADNc depositado (possuindo o depósito o Número de Acesso ATCC 97853) incluindo a líder; um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo do polipéptido maduro codificado pelo ADNc depositado menos a líder (*i. e.*, a proteína madura); um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo do polipéptido da SEQ ID N°:1 incluindo a líder; um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo do polipéptido da SEQ ID N°:1 menos a metionina amino-terminal; um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo do polipéptido da SEQ ID N°:1 menos a líder; um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo do domínio extracelular de TR4; um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo do domínio rico em cisteína de TR4; um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo do domínio transmembranar de TR4; um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo do domínio intracelular de TR4; um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo do domínio de morte de TR4; um polipéptido compreendendo, ou alternativamente, consistindo de polipéptidos solúveis compreendendo a totalidade ou parte dos domínios extracelular e intracelular mas que carece do domínio transmembranar; bem como polipéptidos que são pelo menos 80% idênticos, de um modo mais preferido pelo menos 90% ou 95% idênticos, de um modo ainda mais preferido pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% idênticos aos polipéptidos descritos acima (*e. g.*, o polipéptido codificado pelo clone de ADNc depositado

(possuindo o depósito o Número de Acesso ATCC 97853), o polipéptido da SEQ ID N0:1, e porções de tais polipéptidos com pelo menos 30 aminoácidos e, de um modo mais preferido, pelo menos, 50 aminoácidos.

Por um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos pelo menos, por exemplo, 95% "idêntica" a uma sequência de aminoácidos de referência de um polipéptido de TR4 pretende referir-se que a sequência de aminoácidos do polipéptido é idêntica à sequência de referência à exceção de que a sequência polipeptídica pode incluir até cinco alterações de aminoácido por cada 100 aminoácidos do aminoácido de referência do polipéptido de TR4. Por outras palavras, para obter um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos pelo menos 95% idêntica a uma sequência de aminoácidos de referência, até 5% dos resíduos de aminoácido na sequência de referência podem ser suprimidos ou substituídos por outros aminoácidos ou podem ser inseridos na sequência de referência um número de aminoácidos de até 5% dos resíduos de aminoácido totais na sequência de referência. Estas alterações da sequência de referência podem ocorrer em posições amino ou carboxi-terminais da sequência de aminoácidos de referência ou em quaisquer outras posições entre aquelas posições terminais, disseminadas individualmente entre os resíduos na sequência de referência ou em um ou mais grupos contíguos dentro da sequência de referência.

Como uma questão prática, se qualquer polipéptido particular é pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico, por exemplo, à sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID N0:1 ou à sequência de aminoácidos codificada pelos clones de ADNC depositados pode ser determinado convencionalmente utilizando

programas de computador conhecidos, tal como o programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versão 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711. Quando se utiliza o Bestfit ou qualquer outro programa de alinhamento de sequências para determinar se uma sequência particular é, por exemplo, 95% idêntica a uma sequência de referência, os parâmetros são, evidentemente, fixos de tal forma que a percentagem de identidade é calculada ao longo de todo o comprimento da sequência de aminoácidos de referência e que são deixadas lacunas em homologia de até 5% do número total de resíduos de aminoácido na sequência de referência.

Num caso específico, a identidade entre uma sequência (uma sequência da presente invenção) de referência (de consulta) e uma sequência objecto, também referida como um alinhamento de sequências global, é determinada utilizando o programa de computador FASTDB com base no algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)). Os parâmetros preferidos utilizados num alinhamento de aminoácidos com FASTDB são: Matriz=PAM 0, k-tuplo=2, Penalidade por Disparidade=1, Penalidade por Junção=20, Comprimento do Grupo de Selecção Aleatória=0, Pontuação de Corte=1, Tamanho de Janela=comprimento da sequência, Penalidade de Lacuna=5, Penalidade de Tamanho de Lacuna=0,05, Tamanho de Janela=500 ou o comprimento da sequência de aminoácidos objecto, aquela que for mais curta. De acordo com esta forma de realização, se a sequência objecto é mais curta do que a sequência de consulta devido a supressões N- ou C-terminais, e não por causa de supressões internas, é feita uma correcção manual aos resultados para ter em conta o facto de o programa FASTDB não ter em consideração truncamentos N- e C-terminais da sequência objecto quando calcula a percentagem de

identidade global. Para sequências objecto truncadas nas extremidades N- e C-terminais, relativamente à sequência de consulta, a percentagem de identidade é corrigida calculando o número de resíduos da sequência de consulta que são N- e C-terminais da sequência objecto, os quais não são condizentes/estão alinhados com um resíduo objecto correspondente, como uma percentagem das bases totais da sequência de consulta. Se um resíduo é condizente/está alinhado é determinado pelos resultados do alinhamento de sequências pelo FASTDB. Esta percentagem é depois subtraída da percentagem de identidade, calculada pelo programa FASTDB acima utilizando os parâmetros especificados, para chegar a uma percentagem final de pontuação da identidade. Esta percentagem final de pontuação da identidade é a que é utilizada para os fins desta forma de realização. Apenas os resíduos das extremidades N- e C-terminais da sequência objecto, que não são condizentes/estão alinhados com a sequência de consulta, são considerados para efeitos do ajuste manual da pontuação da percentagem de identidade. Isto é, apenas as posições dos resíduos de consulta fora dos resíduos N- e C-terminais mais afastados da sequência objecto. Por exemplo, uma sequência objecto com 90 resíduos de aminoácido é alinhada com uma sequência de consulta com 100 resíduos para determinar a percentagem de identidade. A supressão ocorre na extremidade N-terminal da sequência objecto e, por conseguinte, o alinhamento FASTDB não apresenta uma correspondência/alinhamento dos primeiros 10 resíduos na extremidade N-terminal. Os 10 resíduos não emparelhados representam 10% da sequência (número de resíduos nas extremidades N- e C-terminais não condizentes/número total de resíduos na sequência de consulta) pelo que se subtrai 10% da pontuação da percentagem de identidade calculada pelo programa FASTDB. Se os restantes 90 resíduos forem perfeitamente condizentes a percentagem de

identidade final seria 90%. Noutro exemplo, uma sequência objecto de 90 resíduos é comparada com uma sequência de consulta de 100 resíduos. Desta vez as supressões são supressões internas pelo que não existem quaisquer resíduos nas extremidades N- ou C-terminais da sequência objecto que não sejam condizentes/estejam alinhadas com a sequência de consulta. Neste caso, a percentagem de identidade calculada pelo FASTDB não é manualmente corrigida. Mais uma vez, apenas as posições de resíduos fora das extremidades N- e C-terminais da sequência objecto, como apresentados no alinhamento FASTDB, que não são condizentes/estão alinhados com a sequência de consulta são manualmente corrigidos. Não são feitas quaisquer outras correcções manuais para os efeitos desta forma de realização.

O presente pedido é também dirigido a anticorpos que ligam proteínas contendo polipéptidos pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticos à sequência polipeptídica de TR4 aqui definida como n^1-m^1 e/ou n^2-m^2 . Em formas de realização preferidas, o pedido é dirigido a anticorpos que ligam proteínas contendo polipéptidos pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticos aos polipéptidos que têm a sequência de aminoácidos das supressões N- e C-terminais de TR4 específicas aqui especificadas.

Em certos casos preferidos, os anticorpos aqui descritos ligam proteínas de fusão de TR4 como descritas acima em que as porções de TR4 da proteína de fusão são aquelas aqui descritas como n^1-m^1 e/ou n^2-m^2 .

Os anticorpos aqui descritos podem ligar Polipéptidos do Receptor de TRAIL Modificados

É especificamente considerado que os anticorpos aqui descritos podem ligar formas modificadas de proteínas de TR4 (SEQ ID N°:1).

Em casos específicos, os anticorpos aqui descritos ligam polipéptidos de TR4 (tais como aqueles descritos acima) incluindo, mas não estando limitados a polipéptidos de TR4 purificados naturalmente, polipéptidos de TR4 produzidos por procedimentos químicos sintéticos e polipéptidos de TR4 produzidos por técnicas recombinantes a partir de um hospedeiro procariótico ou eucariótico, incluindo, por exemplo, células bacterianas, de levedura, de plantas superiores, de insectos e de mamíferos utilizando, por exemplo, as composições e métodos recombinantes descritos acima. Dependendo do hospedeiro utilizado num procedimento de produção recombinante, os polipéptidos podem estar glicosilados ou não glicosilados. Além disso, os polipéptidos de TR4 pode incluir também um resíduo de metionina modificada inicial, nalguns casos em consequência de processos mediados pelo hospedeiro.

Além disso, as proteínas de TR4 que são ligadas pelo anticorpos aqui descritos podem ser quimicamente sintetizadas utilizando técnicas conhecidas na matéria (e. g., ver Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., N.I. (1983), e Hunkapiller, *et al.*, *Nature* 310:105-111 (1984)). Por exemplo, um péptido correspondente a um fragmento de um polipéptido de TR4 pode ser sintetizado utilizando um sintetizador de péptidos. Além disso, se desejado, podem ser introduzidos aminoácidos não clássicos ou análogos químicos de

aminoácidos como uma substituição ou adição na sequência polipeptídica de TR4. Os aminoácidos não clássicos incluem, mas não estão limitados aos isómeros D dos aminoácidos comuns, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -amino-isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino-butírico, γ -Abu, e-Ahx, ácido 6-amino-hexanóico, Aib, ácido 2-amino-isobutírico, ácido 3-amino-propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclo-hexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos criativos tais como β -metil-aminoácidos, Ca-metil-aminoácidos, Na-metil-aminoácidos e análogos de aminoácidos em geral. Além disso, o aminoácido pode ser D (dextrógiro) ou L (levógiro).

São também aqui descritos anticorpos que ligam polipéptidos de TR4 que são modificados de maneira diferenciada durante ou após tradução, e. g., por glicosilação, acetilação, fosforilação, amidação, derivatização com grupos protectores/bloqueadores conhecidos, dissociação proteolítica, ligação a uma molécula de anticorpo ou outro ligando celular, etc. Pode ser realizada qualquer uma de um grande número de modificações químicas por técnicas conhecidas, incluindo mas não estando limitadas a, dissociação química específica por brometo de cianogénio, tripsina, quimotripsina, papaína, protease V8, NaBH_4 , acetilação, formilação, oxidação, redução, síntese metabólica na presença de tunicamicina; etc.

Modificações pós-tradução adicionais aos polipéptidos de TR4 incluem, por exemplo, e. g., cadeias de hidratos de carbono N-ligadas ou O-ligadas, processamento de extremidades N-terminais ou C-terminais), ligação de unidades químicas ao esqueleto de aminoácidos, modificações químicas de cadeias de

hidratos de carbono N-ligadas ou O-ligadas, e adição ou supressão de um resíduo de metionina N-terminal em consequência de expressão em célula hospedeira procariótica. Os polipéptidos podem ser também modificados com uma etiqueta detectável, tais como uma etiqueta enzimática, fluorescente, isotópica ou de afinidade para permitir a detecção e isolamento da proteína.

São também aqui descritos anticorpos que ligam derivados modificados quimicamente de polipéptidos de TR4, os quais podem proporcionar vantagens adicionais, tais como maior solubilidade, estabilidade e tempo circulante do polipéptido, ou menor imunogenicidade (ver Patente U. S. nº 4179337). As unidades químicas para derivatização podem ser seleccionadas de polímeros solúveis em água tais como polietilenoglicol, copolímeros de etilenoglicol/propilenoglicol, carboximetilcelulose, dextrano, poli(álcool vinílico) e semelhantes. Os polipéptidos podem ser modificados em posições aleatórias dentro da molécula, ou em posições predeterminadas dentro da molécula e podem incluir um, dois, três ou mais unidades químicas ligadas.

O polímero pode ser de qualquer peso molecular, e pode ser ramificado ou não ramificado. Para o polietilenoglicol, o peso molecular preferido está entre cerca de 1 kDa e cerca de 100 kDa (a expressão "cerca de" indica que nas preparações de polietilenoglicol, algumas moléculas pesarão mais, algumas menos, do que o peso molecular especificado) para facilidade de manuseamento e fabrico. Podem ser utilizados outros tamanhos, dependendo do perfil terapêutico desejado (e. g., a duração de libertação prolongada desejada, os efeitos, se é que algum, na actividade biológica, a facilidade de manuseamento, o grau ou ausência de antigenicidade e outros efeitos conhecidos do polietilenoglicol numa proteína terapêutica ou análogo). Por

exemplo, o polietilenoglicol pode ter um peso molecular médio de cerca de 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 10500, 11000, 11500, 12000, 12500, 13000, 13500, 14000, 14500, 15000, 15500, 16000, 16500, 17000, 17500, 18000, 18500, 19000, 19500, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000 ou 100000 kDa.

Como assinalado acima, o polietilenoglicol pode ter uma estrutura ramificada. Polietileno glicóis ramificados são descritos, por exemplo, na Patente U.S. nº 5 643 575; Morpurgo *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56:59-72 (1996); Vorobjev *et al.*, *Nucleosides Nucleotides* 18:2745-2750 (1999); e Caliceti *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 10:638-646 (1999).

As moléculas de polietilenoglicol (ou outras unidades químicas) devem ser ligadas à proteína tendo em consideração os efeitos nos domínios funcionais ou antigénicos da proteína. Existe um número de métodos de fixação disponíveis para os especialistas na técnica, e. g., documento EP 0401384 (acoplamento de PEG a G-CSF), ver também Malik *et al.*, *Exp. Hematol.* 20:1028-1035 (1992) (descrevem a peguilação de GM-CSF utilizando cloreto de tresilo). Por exemplo, o polietilenoglicol pode ser ligado covalentemente através de resíduos de aminoácido via um grupo reactivo, tais como um grupo amino ou carboxilo livre. Os grupos reactivos são aqueles aos quais pode ser ligada uma molécula de polietilenoglicol activada. Os resíduos de aminoácido possuindo um grupo amino livre podem incluir os resíduos de lisina e os resíduos de aminoácido N-terminais; aqueles que têm um grupo carboxilo livre podem incluir resíduos de ácido aspártico, resíduos de ácido glutâmico e o resíduo de

aminoácido C-terminal. Podem ser também utilizados grupos sulfidriilo como um grupo reactivo para fixar as moléculas de polietilenoglicol. Para o jectivos terapêuticos é preferida a fixação a um grupo amino, tais como a fixação à extremidade N-terminal ou ao grupo lisina.

Como sugerido acima, o polietilenoglicol pode ser ligado às proteínas via ligação a qualquer um de um número de resíduos de aminoácido. Por exemplo, o polietilenoglicol pode ser ligado às proteínas via ligações covalentes a resíduos de lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou cisteína. Podem ser utilizadas uma ou mais químicas de reacção para ligar o polietilenoglicol a resíduos de aminoácido específicos (e. g., lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou cisteína) da proteína ou a mais do que um tipo de resíduos de aminoácido (e. g., lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutâmico, cisteína e as sas combinações) da proteína.

Podem ser especificamente desejadas proteínas quimicamente modificadas na extremidade N-terminal. Utilizando polietilenoglicol como uma ilustração da presente composição, pode-se seleccionar de uma variedade de moléculas de polietilenoglicol (pelo peso molecular, ramificação, etc.), a proporção de moléculas de polietilenoglicol relativamente às moléculas de proteína (ou péptido) na mistura reaccional, o tipo de reacção de peguilação a ser realizada, e o método de obtenção da proteína peguilada na extremidade N-terminal, seleccionada. O método de obtenção da preparação peguilada na extremidade N-terminal (i. e., separando esta unidade de outras unidades monopeguiladas, se for necessário) pode ser por purificação do material peguilado na extremidade N-terminal a partir de uma população de moléculas de proteína peguiladas. A modificação

selectiva de proteínas quimicamente modificadas na extremidade N-terminal pode ser conseguida por alquilação redutiva que explora a reactividade diferencial dos diferentes tipos de grupos amino primários (lisina versus N-terminal) disponíveis para derivatização numa proteína particular. Nas condições reaccionais apropriadas é conseguida uma derivatização substancialmente selectiva da proteína na extremidade N-terminal com um polímero contendo grupos carbonilo.

Como indicado acima, a peguilação das proteínas pode ser conseguida por qualquer número de meios. Por exemplo, o polietilenoglicol pode ser ligado à proteína directamente ou por uma unidade de ligação intermediária. Sistemas sem unidades de ligação para ligar polietilenoglicol a proteínas são descritos em Delgado *et al.*, *Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys.* 9:249-304 (1992); Francis *et al.*, *Intern. J. of Hematol.* 68:1-18 (1998); Patente U.S. nº 4002531; Patente U.S. nº 5349052; documento WO 95/06058; e documento WO 98/32466.

Um sistema para ligar directamente polietilenoglicol a resíduos de aminoácido de proteínas sem uma unidade de ligação intermediária utiliza MPEG tresilado, o qual é produzido pela modificação de monometoxi-polietilenoglicol (MPEG) utilizando cloreto de tresilo ($\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$). Após reacção da proteína com MPEG tresilado, o polietilenoglicol fica directamente ligado aos grupos amina da proteína. Assim, são aqui descritos conjugados de proteína-polietilenoglicol produzidos fazendo reagir as proteínas da invenção com uma molécula de polietilenoglicol possuindo um grupo 2,2,2-trifluoroetanossulfonilo.

O polietilenoglicol pode ser também ligado a proteínas utilizando um número de unidades de ligação intermediárias

diferentes. Por exemplo, a Patente U.S. nº 5612460 divulga unidades de ligação de uretano para ligar polietilenoglicol a proteínas. Os conjugados de proteína-polietilenoglicol em que o polietilenoglicol está ligado à proteína por uma unidade de ligação podem ser também produzidos por reacção de proteínas com compostos, tais como MPEG-succinimidilsuccinato, MPEG activado com 1,1'-carbonildiimidazole, MPEG-2,4,5-triclorofenilcarbonato, MPEG-p-nitrofenolcarbonato e vários derivados de MPEG-succinato. Um número adicional de derivados de polietilenoglicol e de químicas de reacção para ligar polietilenoglicol a proteínas são descritos no documento WO 98/32466. Os produtos proteicos peguilados produzidos utilizando as químicas de reacção aqui mostradas estão incluídos no âmbito da invenção.

O número de unidades de polietilenoglicol ligadas a cada polipéptido de TR4 (*i. e.*, o grau de substituição) pode também variar. Por exemplo, as proteínas peguiladas da invenção podem estar ligadas, em média, a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20 ou mais moléculas de polietilenoglicol. Analogamente, o grau médio de substituição dentro de gamas tais como 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19 ou 18-20 unidades de polietilenoglicol por molécula de proteína. Os métodos para determinar o grau de substituição são discutidos, por exemplo, em Delgado *et al.*, *Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys.* 9:249-304 (1992).

Como mencionado, os anticorpos aqui descritos podem ligar polipéptidos de TR4 que são modificados por processos naturais, tal como processamento pós-tradução, ou por técnicas de modificação química que são bem conhecidas na técnica. Entender-se-á que o mesmo tipo de modificação pode estar

presente no mesmo grau ou em graus variáveis em vários sítios de um dado polipéptido de TR4. Os polipéptidos de TR4 podem ser ramificados, por exemplo, em consequência de ubiquitinação, e podem ser cíclicos, com ou sem ramificação. Os polipéptidos de TR4 cíclicos, ramificados e cíclicos ramificados podem resultar de processos naturais de pós-tradução ou podem ser preparados por métodos de síntese. As modificações incluem acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma unidade heme, ligação covalente de um nucleótido ou derivado de nucleótido, ligação covalente de um lípido ou derivado de lípido, ligação covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligação dissulfureto, desmetilação, formação de reticulações covalentes, formação de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de âncoras GPI, hidroxilação, iodação, metilação, miristoilação, oxidação, peguilação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, adição de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferência tal como arginilação e ubiquitinação. (ver, por exemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nova Iorque, pg. 1-12 (1983); Seifter et al., *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990); Rattan et al., *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992)).

Anticorpos anti-TR4

São aqui descritos anticorpos (e. g., anticorpos compreendendo duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas

em conjunto por pontes dissulfureto) que ligam imunoespecificamente TR4 (SEQ ID N°:1) ou os seus fragmentos ou variantes, em que a sequência de aminoácidos da cadeia pesada e a sequência de aminoácidos da cadeia leve são as mesmas que as sequências de aminoácidos de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve expressas por um ou mais scFvs ou linhas de células referidas no Quadro 1. São também aqui descritos anticorpos (consistindo, cada, de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas em conjunto por pontes dissulfureto para formar um anticorpo) que ligam imunoespecificamente TR4 ou os seus fragmentos ou variantes, em que a sequência de aminoácidos da cadeia pesada ou a sequência de aminoácidos da cadeia leve são a mesma que a sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada ou de uma cadeia leve expressa por um ou mais scFvs ou linhas de células referidas no Quadro 1. A ligação imuno específica a polipéptidos de TR4 pode ser determinada por imunoensaios conhecidos na técnica ou aqui descritos para analisar a ligação específica anticorpo-antígeno. As moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos ou variantes destes anticorpos que se ligam imunoespecificamente a TR4 são também abrangidas pela invenção, assim como o são as moléculas de ácido nucleico que codificam estas moléculas, fragmentos e/ou variantes de anticorpos (e. g., SEQ ID N°:54-65).

São também aqui descritos anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um TR4 ou um seu fragmento ou variante, compreendem um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de qualquer uma das cadeias pesadas expressas por, pelo menos, um dos scFvs ou linhas de células referidas no Quadro 1 e/ou qualquer uma das cadeias leves expressas por, pelo menos, um dos scFvs ou linhas de células referidas no Quadro 1.

Numa forma de realização da presente invenção, os anticorpos que se ligam imuno especificamente a TR4 ou um seu fragmento, compreendem (a) a sequência de aminoácidos do domínio VH da SEQ ID N°:43 ou a sequência de aminoácidos do domínio VH expresso pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570 e (b) a sequência de aminoácidos do domínio VL da SEQ ID N°:43 ou a sequência de aminoácidos do domínio VL expresso pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570. São também aqui descritos anticorpos compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer um dos domínios VH de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1 e/ou qualquer um dos domínios VL de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1; a sequência de aminoácidos de um domínio VH e um domínio VL de um único scFv referido no Quadro 1; e a sequência de aminoácidos de um domínio VH e um domínio VL de scFvs diferentes referidos no Quadro 1. As moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos ou variantes de anticorpo dos domínios VH e/ou VL de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1 que se ligam imuno especificamente a um TR4 são também aqui descritas, assim como o são as moléculas de ácido nucleico que codificam estes domínios, moléculas, fragmentos e/ou variantes de VH e VL.

A presente invenção proporciona também anticorpos que se ligam imuno especificamente a TR4, em que os referidos anticorpos compreendem, ou alternativamente consistem de, (a) a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VH da SEQ ID N°:43 ou a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VH expressas pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570 e (b) a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VL da SEQ ID N°:43 ou a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VL expressas pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570. São também aqui descritos anticorpos compreendendo ou consistindo de um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos de

qualquer uma, duas, três ou mais das CDR de VH contidas num domínio VH de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1. Em particular, são aqui descritos anticorpos que ligam imuno especificamente um receptor de TRAIL, compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de uma CDR1 de VH contida num domínio VH de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1. Noutro caso, os anticorpos que ligam imuno especificamente TR4, compreendem, ou alternativamente consistem de, um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de uma CDR2 de VH contida num domínio VH de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1. Num caso preferido, os anticorpos que ligam imuno especificamente TR4, compreendem, ou alternativamente consistem de um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de uma CDR3 de VH contida num domínio VH de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1. As moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo destes anticorpos, ou os seus fragmentos de anticorpo ou variantes, que se ligam imuno especificamente a TR4 ou um fragmento de TR4 ou variante do mesmo são também aqui descritas, assim como o são as moléculas de ácido nucleico que codificam estes anticorpos, moléculas, fragmentos e/ou variantes (e. g., SEQ ID N°:54-65).

São também aqui descritos anticorpos que se ligam imuno especificamente a um polipéptido, ou fragmento de polipéptido ou variante de TR4, em que os referidos anticorpos compreendem, ou alternativamente consistem de, um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma, duas, três ou mais das CDR de VL contidas num domínio VL de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1. Em particular, são aqui descritos anticorpos que ligam imuno especificamente TR4, compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de uma CDR1 de VL contida num domínio

VL de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1. Noutro caso, os anticorpos que ligam imuno especificamente TR4, compreendem, ou alternativamente consistem de, um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de uma CDR2 de VL contida num domínio VL de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1. Num caso preferido, os anticorpos que ligam imuno especificamente TR4, compreendem, ou alternativamente consistem de um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de uma CDR3 de VL contida num domínio VL de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1. As moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo destes anticorpos, ou os seus fragmentos de anticorpo ou variantes que se ligam imuno especificamente a TR4 ou um fragmento de TR4 ou variante do mesmo são também aqui descritas, assim como o são as moléculas de ácido nucleico que codificam estes anticorpos, moléculas, fragmentos e/ou variantes (e. g., SEQ ID N°:54-65).

São também aqui descritos anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos ou variantes de anticorpo) que se ligam imuno especificamente ao polipéptido de TR4 ou um fragmento ou variante de um TR4, em que os referidos anticorpos compreendem, ou alternativamente consistem de, uma, duas, três ou mais CDR de VH e uma, duas, três ou mais CDR de VL, como contidas num domínio VH ou domínio VL de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1. Em particular, são aqui descritos anticorpos que se ligam imuno especificamente a um polipéptido ou fragmento de polipéptido ou variante de TR4, em que os referidos anticorpos compreendem, ou alternativamente consistem de, uma CDR1 de VH e uma CDR1 de VL, uma CDR1 de VH e uma CDR2 de VL, uma CDR1 de VH e uma CDR3 de VL, uma CDR2 de VH e uma CDR1 de VL, CDR2 de VH e CDR2 de VL, uma CDR2 de VH e uma CDR3 de VL, uma CDR3 de VH e uma CDR1 de VH, uma CDR3 de VH e uma CDR2 de VL, uma CDR3 de VH e uma CDR3 de VL, ou qualquer

combinação das mesmas, das CDR de VH e CDR de VL contidas num domínio VH ou domínio VL de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1. Num caso preferido, uma ou mais destas combinações são do mesmo scFv como divulgado no Quadro 1. As moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos ou variantes destes anticorpos, que se ligam imuno especificamente a TR4 são também aqui descritas, assim como o são as moléculas de ácido nucleico que codificam estes anticorpos, moléculas, fragmentos ou variantes (e. g., SEQ ID N°:54-65).

Moléculas de Ácido Nucleico que Codificam Anticorpos Anti-TR4

A presente invenção proporciona também moléculas de ácido nucleico, geralmente isoladas, que codificam um anticorpo da invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo). Numa forma de realização específica, as moléculas de ácido nucleico que codificam um anticorpo da invenção compreende, ou alternativamente consistem da SEQ ID N°:55 ou um seu fragmento.

É aqui descrita uma molécula de ácido nucleico que codifica um anticorpo (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo ou variantes), compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um domínio VH possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer um dos domínios VH de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1 e um domínio VL possuindo uma sequência de aminoácidos do domínio VL de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1. Noutro caso, uma molécula de ácido nucleico descrito aqui codifica um anticorpo (incluindo moléculas

compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo ou variantes), compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um domínio VH possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer um dos domínios VH de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1 ou um domínio VL possuindo uma sequência de aminoácidos de um domínio VL de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1.

São também aqui descritos anticorpos que compreendem, ou alternativamente consistem de, variantes (incluindo derivados) das moléculas de anticorpo (e. g., os domínios VH e/ou domínios VL) aqui descritas, anticorpos esses que se ligam imuno especificamente a TR4 ou o seu fragmento ou variante. As técnicas correntes conhecidas dos especialistas na técnica podem ser utilizadas para introduzir mutações na sequência de nucleótidos que codifica uma molécula da invenção, incluindo, por exemplo, mutagénese específica de um locus e mutagénese mediada por PCR, as quais resultam em substituições de aminoácidos. De um modo preferido, as variantes (incluindo derivados) codificam menos de 50 substituições de aminoácidos, menos de 40 substituições de aminoácidos, menos de 30 substituições de aminoácidos, menos de 25 substituições de aminoácidos, menos de 20 substituições de aminoácidos, menos de 15 substituições de aminoácidos, menos de 10 substituições de aminoácidos, menos de 5 substituições de aminoácidos, menos de 4 substituições de aminoácidos, menos de 3 substituições de aminoácidos, ou menos de 2 substituições de aminoácidos relativamente ao domínio VH, CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, domínio VL, CDR1 de VL, CDR2 de VL, ou CDR3 de VL de referência. Uma "substituição conservadora de aminoácido" é uma em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido possuindo uma cadeia lateral com uma carga semelhante. As

famílias de resíduos de aminoácido possuindo cadeias laterais com cargas semelhantes foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (e. g., lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (e. g., ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (e. g., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais apolares (e. g., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais ramificadas em posição beta (e. g., treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (e. g., tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Alternativamente, podem ser introduzidas mutações de maneira aleatória ao longo da totalidade ou parte da sequência de codificação, tal como por mutagénese de saturação e os mutantes resultantes podem ser rastreados quanto à actividade biológica para identificar mutantes que retêm actividade (e. g., a aptidão para ligar TR4).

Por exemplo, pode introduzir-se mutações apenas em regiões estruturais ou apenas em regiões CDR de uma molécula de anticorpo. As mutações introduzidas podem ser silenciosas ou mutações de sentido invertido neutras, i. e., com nenhum, ou pouco, efeito na aptidão do anticorpo para ligar o antígeno. Estes tipos de mutações podem ser úteis para otimizar a utilização de codão, ou melhorar a produção de um anticorpo de hibridoma. Alternativamente, as mutações de sentido invertido não neutras podem alterar a aptidão do anticorpo para ligar o antígeno. É provável que a localização da maioria das mutações silenciosas e de sentido invertido neutras seja nas regiões estruturais, enquanto é provável que a localização da maioria das mutações de sentido invertido não neutras seja na CDR, embora isto não seja um requisito absoluto. Um especialista na

técnica será capaz de conceber e testar moléculas mutantes com propriedades desejadas, tais como sem alteração na actividade de ligação ao antigénio ou alteração na actividade de ligação (e.g, melhoria da actividade de ligação ao antigénio ou alteração da especificidade do anticorpo). Após mutagénese, a proteína codificada pode ser rotineiramente expressa e a actividade funcional e/ou biológica da proteína codificada, (e. g., aptidão para ligar imuno especificamente TR4) pode ser determinada utilizando técnicas aqui descritas ou modificando rotineiramente técnicas conhecidas na matéria.

É também aqui descrito um anticorpo (incluindo uma molécula compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um fragmento de anticorpo ou variante do mesmo), que liga imuno especificamente TR4 ou um seu fragmento ou variante, que compreende ou, alternativamente, consiste de uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de nucleótidos que hibridiza com uma sequência de nucleótidos que é complementar àquela que codifica um dos domínios VH ou VL de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1. sob condições estridentes, e. g., hibridização com ADN ligado a um filtro em cloreto de sódio/citrato de sódio 6X (SSC) a cerca de 45 °C, seguida de uma ou mais lavagens em SSC 0,2X/0,1% de SDS a cerca de 50-65 °C, sob condições extremamente estridentes, e. g., hibridização com ácido nucleico ligado a um filtro em SSC 6x a cerca de 45 °C seguida de uma ou mais lavagens em SSC 0,1x/0,2% de SDS a cerca de 68 °C, ou sob outras condições de hibridização estridentes que são conhecidas dos especialistas na técnica (ver, por exemplo, Ausubel, F.M. et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. e John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque nas páginas 6.3.1-6.3.6 e

2.10.3). As moléculas de ácido nucleico que codificam estes anticorpos são também aqui descritas.

É bem conhecido na técnica que os polipéptidos, ou seus fragmentos ou variantes, com sequências de aminoácidos semelhantes têm frequentemente estruturas semelhantes e muitas das mesmas actividades biológicas. Assim, num caso, um anticorpo (incluindo uma molécula compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um fragmento de anticorpo ou variante do mesmo), que se liga imuno especificamente a TR4 ou fragmentos ou variantes de TR4, compreende ou, alternativamente, consiste de um domínio VH possuindo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% idêntica à sequência de aminoácidos de um domínio VH de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1.

Noutro caso, um anticorpo (incluindo uma molécula compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um fragmento de anticorpo ou variante do mesmo), que se liga imuno especificamente a TR4 ou um fragmento ou variante de TR4, compreende ou, alternativamente, consiste de um domínio VL possuindo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99% idêntica à sequência de aminoácidos de um domínio VL de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1.

Métodos de Produção de Anticorpos

Os anticorpos de acordo com a invenção são, de um modo preferido, preparados utilizando uma biblioteca de apresentação de scFv em fagos. As tecnologias utilizadas para conseguir a mesmo são divulgadas nas patentes, pedidos e referências aqui divulgados.

Nos métodos de apresentação em fago, os domínios funcionais do anticorpo são apresentados na superfície de partículas de fago que têm as sequências polinucleotídicas que os codificam. Em particular, as sequências de ADN que codificam os domínios VH e VL são amplificadas a partir de bibliotecas de ADNc animal (e. g., bibliotecas de ADNc humano ou murídeo de tecidos linfóides) ou bibliotecas de ADNc sintético. O ADN que codifica os domínios VH e VL são ligados em conjunto por uma unidade de ligação de scFv por PCR e clonados num vector de fagomídeo (e. g., pCANTAB 6 ou pComb 3 HSS). O vector é electroporado em *E. coli* e a *E. coli* é infectada com fago auxiliar. O fago utilizado nestes métodos é tipicamente um fago filamentosos incluindo fd e M13 e os domínios VH e VL são geralmente fundidos de maneira recombinante com o gene III ou gene VIII do fago. O fago que expressa um domínio de ligação a antigénio que se liga a um antigénio de interesse (i. e., um polipéptido receptor de TRAIL ou um seu fragmento) pode ser seleccionado ou identificado com o antigénio, e. g., utilizando antigénio marcado ou antigénio ligado ou capturado numa superfície ou leito sólido. Os exemplos de métodos de apresentação em fago que podem ser utilizados para preparar os anticorpos da presente invenção incluem, mas não estão limitados àqueles divulgados em Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur.*

J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, Gene 187 9-18 (1997); Burton *et al.*, Advances in Immunology 57:191-280(1994); pedido PCT nº PCT/GB91/O1 134; publicações PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18719; WO 93/1 1236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO97/13844; e Patente U.S. nº 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516717; 5780225; 5658727; 5735743 e 5969108.

Para algumas utilizações, tal como para maturação por afinidade *in vitro* de um anticorpo da invenção, pode ser útil expressar o domínios VH e VL de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1 como anticorpos de cadeia simples ou fragmentos Fab numa biblioteca de apresentação em fagos. Por exemplo, os ADNC que codificam os domínios VH e VL dos scFvs referidos no Quadro 1 podem ser expressos em todas as combinações possíveis utilizando uma biblioteca de apresentação em fagos, que permite a selecção de combinações VH/VL que ligam os polipéptidos de TR4 com características de ligação preferidas, tais como afinidade melhorada ou velocidades de dissociação melhoradas. Além disso, os segmentos VH e VL - as regiões CDR dos domínios VH e VL dos scFvs referidos no Quadro 1, em particular, podem ser mutados *in vitro*. A expressão dos domínios VH e VL com CDR "mutantes" numa biblioteca de apresentação em fagos permite a selecção de combinações VH/VL que ligam polipéptidos de TR4 com características de ligação preferidas, tais como afinidade melhorada ou velocidades de dissociação melhoradas.

Métodos Adicionais de Produção de Anticorpos

Os anticorpos da invenção (incluindo fragmentos de anticorpo) podem ser produzidos por qualquer método conhecido na

técnica. Por exemplo, entender-se-á que os anticorpos de acordo com a presente invenção podem ser expressos em linhas de células diferentes de linhas de células de hibridoma. As sequências que codificam os ADNc ou clones genómicos para os anticorpos particulares podem ser utilizadas, por exemplo, para a transformação de células hospedeiras de mamífero ou não mamífero adequadas, ou para produzir bibliotecas de apresentação em fagos. Adicionalmente, os anticorpos polipeptídicos da invenção podem ser quimicamente sintetizados ou produzidos através da utilização de sistemas de expressão recombinantes.

Uma maneira para produzir os anticorpos da invenção seria clonar os domínios VH e/ou VL dos scFvs referidos no Quadro 1. Para isolar os domínios VH e VL de bactérias transfectadas com um vector contendo o scFv podem ser utilizados iniciadores de PCR complementares às sequências de nucleótidos de VH ou VL (ver Exemplo 5), para amplificar as sequências de VH e VL. Os produtos de PCR podem ser depois clonados utilizando vectores, por exemplo, que têm um sítio de clonagem de produto de PCR consistindo de uma saliência de um único nucleótido T 5' e 3', que é complementar ao único nucleótido de adenina saliente adicionado nas extremidades 5' e 3' dos produtos de PCR por muitas ADN-polimerases utilizadas para reacções de PCR. Os domínios VH e VL podem ser depois sequenciados utilizando métodos convencionais conhecidos na técnica. Alternativamente, os domínios VH e VL podem ser amplificados utilizando iniciadores específicos para o vector concebidos para amplificar todo o scFv, (i. e. o domínio VH, unidade de ligação e domínio VL.)

Os genes de VH e VL clonados podem ser colocados em um ou mais vectores de expressão adequados. A título de exemplo não

limitativo, os iniciadores de PCR que incluem sequências de nucleótidos de VH ou VL, um sítio de restrição e uma sequência flanqueadora para proteger o sítio de restrição podem ser utilizados para amplificar as sequências de VH ou VL. Utilizando técnicas de clonagem conhecidas dos especialistas na técnica, os domínios VH amplificados por PCR podem ser clonados em vectores que expressam a região constante de imunoglobulina apropriada, e. g., a região constante de IgG1 ou IgG4 humana para os domínios VH, e as regiões constantes kappa ou lambda humanas para os domínios VL kappa e lambda, respectivamente. De um modo preferido, os vectores para expressar os domínios VH ou VL compreendem um promotor adequado para coordenar a expressão das cadeias pesada e leve no sistema de expressão escolhido, um sinal de secreção, um sítio de clonagem para o domínio variável de imunoglobulina, domínios constantes de imunoglobulina e um marcador de selecção, tal como neomicina. O domínios VH e VL podem ser também clonados num único vector que expressa as regiões constantes necessárias. Os vectores de conversão da cadeia pesada e os vectores de conversão da cadeia leve são depois co-transfectados em linhas de células para produzir linhas de células estáveis ou transitórias que expressam anticorpos inteiros, e. g., IgG, utilizando técnicas conhecidas dos especialistas na técnica (ver, por exemplo, Guo *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 82:925-31 (1997), e Ames *et al.*, J. Immunol. Methods 184:177-86 (1995)).

A invenção proporciona polinucleótidos compreendendo ou, alternativamente, consistindo de uma sequência de nucleótidos que codifica um anticorpo da invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo). São também aqui descritos polinucleótidos que hibridizam em alta estringência, ou

alternativamente, em condições de hibridização de estringência intermédia ou inferior, e. g., como definidas *supra*, com polinucleótidos complementares aos ácidos nucleicos que têm uma sequência polinucleotídica que codifica um anticorpo da invenção ou um seu fragmento.

Os polinucleótidos podem ser obtidos, e a sequência de nucleótidos dos polinucleótidos determinada, por qualquer método conhecido na técnica. Se as suas sequências de aminoácidos dos domínios VH, domínios VL e CDR forem conhecidas, as sequências de nucleótidos que codificam estes anticorpos podem ser determinadas utilizando métodos bem conhecidos na técnica, i. e., os códons de nucleótidos que se sabe que codificam os aminoácidos particulares são preparados de maneira a produzir um ácido nucleico que codifica o anticorpo da invenção. Um tal polinucleótido que codifica o anticorpo pode ser preparado a partir de oligonucleótidos sintetizados quimicamente (e. g., como descrito em Kutmeier *et al.*, BioTechniques 17:242 (1994)), o que, resumidamente, envolve a síntese de oligonucleótidos sobrepostos contendo porções da sequência que codifica o anticorpo, emparelhamento e ligação daqueles oligonucleótidos, e em seguida amplificação dos oligonucleótidos ligados por PCR.

Alternativamente, um polinucleótido que codifica um anticorpo (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) pode ser produzido a partir de ácido nucleico de uma fonte adequada. Se um clone que contém um ácido nucleico que codifica um anticorpo particular não estiver disponível, mas for conhecida a sequência da molécula de anticorpo, um ácido nucleico que codifica a imunoglobulina pode ser sintetizado quimicamente ou obtido a partir de uma fonte adequada (e. g.,

uma biblioteca de ADNc de anticorpos, ou uma biblioteca de ADNc produzido, ou ácido nucleico, de um modo preferido, ARN poli A+, isolado a partir de qualquer tecido ou células que expressam o anticorpo, tais como células de hibridoma ou Linhas de células B transformadas com o vírus de Epstein Barr que expressam um anticorpo da invenção) através de amplificação por PCR utilizando iniciadores sintéticos hibridizáveis com as extremidades 3' e 5' da sequência ou através de clonagem utilizando uma sonda oligonucleotídica específica para a sequência genética particular a identificar, e. g., um clone de ADNc de uma biblioteca de ADNc que codifica o anticorpo. Os ácidos nucleicos amplificados produzidos por PCR podem ser depois clonados em vetores de clonagem replicáveis utilizando qualquer método bem conhecido na técnica.

Uma vez determinada a sequência de nucleótidos do anticorpo (incluindo as moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo), a sequência de nucleótidos do anticorpo pode ser manipulada utilizando métodos bem conhecidos na técnica para a manipulação de sequências de nucleótidos, e. g., técnicas de ADN recombinante, mutagénesse específica de um locus, PCR, etc. (ver, por exemplo, as técnicas descrito em Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NI e Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NI), para produzir anticorpos possuindo uma sequência de aminoácidos diferente, por exemplo para criar substituições, supressões, e/ou inserções de aminoácidos.

Num caso específico, os domínios VH e VL de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1, ou os seus fragmentos ou variantes,

são inseridos em regiões estruturais utilizando técnicas de ADN recombinante conhecidas na técnica. Num caso específico, uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais das CDR dos domínios VH e/ou VL de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1, ou os seus fragmentos ou variantes, é inserida dentro das regiões estruturais utilizando técnicas de ADN recombinante conhecidas na técnica. As regiões estruturais podem ser naturais ou regiões estruturais consenso e, de um modo preferido, regiões estruturais humanas (ver, e. g., Chotia *et al.*, J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998) para uma lista de regiões estruturais humanas). De um modo preferido, os polinucleótidos produzidos pela combinação das regiões estruturais e CDR codificam um anticorpo (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos de anticorpo ou os seus variantes) que se liga especificamente a um receptor de TRAIL. De um modo preferido, como discutido *supra*, os polinucleótidos que codificam variantes de anticorpos ou fragmentos de anticorpo possuindo uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser preparados dentro das regiões estruturais e, de um modo preferido, as substituições de aminoácidos não alteram significativamente a ligação do anticorpo ao seu antígeno. Adicionalmente, tais métodos podem ser utilizados para preparar substituições ou supressões de aminoácidos de um ou mais resíduos de cisteína da região variável que participam numa ligação dissulfureto intracadeia para produzir moléculas de anticorpo ou fragmentos ou variantes de anticorpo, que carecem de uma ou mais ligações dissulfureto intracadeia. Outras alterações ao polinucleótido estão abrangidas pela presente invenção e caem dentro do conhecimento corrente da técnica.

A aptidão para clonar e reconstruir loci humanos com tamanhos de megabases em YAC e para introduzi-los na linha

germinal de ratinhos proporciona uma abordagem poderosa para elucidar as componentes funcionais de loci muito grandes ou grosseiramente mapeados, bem como para produzir modelos úteis de doenças humanas. Além disso, a utilização dessa tecnologia para a substituição de loci de ratinho pelos seus equivalentes humanos poderia proporcionar conhecimentos únicos sobre a expressão e regulação de produtos de genes humanos durante o desenvolvimento, a sua comunicação com outros sistemas e o seu envolvimento na indução e progressão de doença.

Uma aplicação prática importante de uma tal estratégia é a "humanização" do sistema imunitário humoral do ratinho. A introdução de loci de imunoglobulina (Ig) humana em ratinhos, nos quais os genes de Ig endógena foram inactivados oferece a oportunidade de estudar os mecanismos subjacentes à expressão e montagem programa de anticorpos, bem como sobre o seu papel no desenvolvimento de células B. Além disso, uma tal estratégia poderia proporcionar uma fonte ideal para a produção de anticorpos monoclonais totalmente humanos (Mab), um marco importante para satisfazer a promessa de terapia de anticorpos em doenças humanas.

Espera-se que os anticorpos totalmente humanos minimizem as respostas imunogénicas e alérgicas intrínsecas para os Anticorpos monoclonais de ratinho ou derivados de ratinho e, desse modo, aumentem a eficácia e segurança dos anticorpos administrados. Espera-se que a utilização de anticorpos totalmente humanos proporcione uma vantagem substancial no tratamento de doenças humanas crónicas e recorrentes, tal como o cancro, as quais requerem administrações repetidas de anticorpo.

Uma abordagem neste sentido consistiu em manipular estirpes de ratinhos deficientes na produção de anticorpos de ratinho com fragmentos grandes dos loci de Ig humana na expectativa de que esses ratinhos produzissem um grande repertório de anticorpos humanos na ausência de anticorpos de ratinho. Os fragmentos grandes de Ig humana conservariam a grande diversidade de genes variáveis, bem como a regulação apropriada da produção e expressão de anticorpos. Ao explorar a maquinaria do ratinho para a diversificação e selecção de anticorpos e a ausência de tolerância imunológica a proteínas humanas, o repertório de anticorpos humanos reproduzidos nestas estirpes de ratinho deveria produzir anticorpos de alta afinidade contra qualquer antígeno de interesse, incluindo antígenos humanos. Utilizando a tecnologia de hibridoma poderiam ser facilmente produzidos e seleccionados anticorpos monoclonais humanos específicos para o antígeno com a especificidade desejada.

Esta estratégia geral foi demonstrada com respeito à geração das primeiras estirpes de XenoMouse™ como publicada em 1994. Ver Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994). As estirpes de XenoMouse™ foram manipuladas com cromossomas artificiais de levedura (YAC) contendo fragmentos de configuração da linha germinal com 245 kb e 10190 kb de tamanho do locus da cadeia pesada humana e do locus kappa da cadeia leve, respectivamente, os quais continham sequências das regiões variável e constante essenciais. Id. Os YAC contendo Ig humana demonstraram ser compatíveis com o sistema de ratinho para o rearranjo e expressão de anticorpos e foram capazes de substituir os genes de Ig de ratinho inactivados. Isto foi demonstrado pela sua aptidão para induzir o desenvolvimento de células B, para produzir um repertório humano de tipo adulto de anticorpos totalmente humanos e para produzir anticorpos

monoclonais humanos específicos para o antígeno. Estes resultados sugeriram também que a introdução de porções maiores dos loci de Ig humana contendo um maior número de genes V, elementos reguladores adicionais e regiões constantes de Ig humana poderia repetir substancialmente o repertório completo que é característico da resposta humoral humana à infecção e imunização. O trabalho de Green et al. foi recentemente alargado à introdução de mais do que aproximadamente 80% do repertório de anticorpos humanos através da introdução de fragmentos de YAC de configuração da linha germinal com megabases de tamanho, dos loci da cadeia pesada e dos loci kappa da cadeia leve humanos, respectivamente, para produzir ratinhos XenoMouse™. Ver Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green e Jakobovits *J Exp. Med.* 188:483-495 (1998), Green, *Journal of Immunological Methods* 231:11-23 (1999) e Pedido de Patente U.S. com o nº de Série 08/759 620, apresentado em 3 de Dezembro de 1996.

Esta abordagem é adicionalmente discutida e delineada nos Pedidos de Patente U.S. com os nº de Série 07/466008, apresentado em 12 de Janeiro de 1990, 07/710515, apresentado em 8 de Novembro de 1990, 07/919297, apresentado em 24 de Julho de 1992, 07/922649, apresentado em 30 de Julho 1992, 08/031801, apresentado em 15 de Março de 1993, 08/112848, apresentado em 27 de Agosto de 1993, 08/234145, apresentado em 28 de Abril de 1994, 08/376279, apresentado em 20 de Janeiro de 1995, 08/430938, 27 de Abril de 1995, 0-8/464584, apresentado em 5 de Junho de 1995, 08/464582, apresentado em 5 de Junho de 1995, 08/471 191, apresentado em 5 de Junho de 1995, 08/462837, apresentado em 5 de Junho de 1995, 08/486 853, apresentado em 5 de Junho de 1995, 08/486857, apresentado em 5 de Junho de 1995, 08/486859, apresentado em 5 de Junho de 1995, 08/462513, apresentado em 5 de Junho de 1995, 08/724752, apresentado em 2

de Outubro de 1996 e 08/759620, apresentado em 3 de Dezembro de 1996. Ver também Mendez *et al.* Nature Genetics 15:146-156 (1997) e Green e Jakobovits *J Exp. Med.* 188:483-495 (1998). Ver também Patente Europeia nº EP 0471151 B1, concessão publicada em 12 de Junho de 1996, Pedido de Patente Internacional nº WO 94/02602, publicado em 3 de Fevereiro de 1994, Pedido de Patente Internacional nº WO 96/34096, publicado em 31 de Outubro de 1996 e documento WO 98/24893, publicado em 11 de Junho de 1998.

As respostas de anticorpos humanos anti-ratinho (HAMA) levou a indústria a preparar anticorpos quiméricos ou humanizados de outro modo. Embora os anticorpos quiméricos possuam uma região constante humana e uma região variável murídea, prevê-se que sejam observadas certas respostas de anticorpos humanos anti-quiméricos (HACA), particularmente em utilizações crónicas ou multidoses do anticorpo. Assim, seria desejável proporcionar anticorpos totalmente humanos contra polipéptidos de TR4 para anular as preocupações e/ou efeitos das respostas HAMA ou HACA.

Os anticorpos monoclonais específicos para os polipéptidos de TR4 podem ser preparados utilizando tecnologia de hibridoma. (Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975); Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling *et al.*, em: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.I., pp. 571-681 (1981)). Resumidamente, ratinhos XenoMouse™ podem ser imunizados com polipéptidos de TR4. Após imunização, os esplenócitos desses ratinhos foram extraídos e fundidos com uma linha de células de mieloma adequada. De acordo com a presente invenção pode ser utilizada qualquer linha de células de mieloma adequada; contudo, é preferível utilizar a mieloma linha de células parental (SP20),

disponível da ATCC. Após fusão, as células de hibridoma resultantes são mantidas selectivamente em meio HAT e, em seguida, clonadas por diluição limitante como descrito por Wands *et al.* (Gastroenterology 80:225-232 (1981)). As células de hibridoma obtidas através de uma tal selecção são em seguida analisadas para identificar clones que segregam anticorpos capazes de ligar os polipéptidos de TR4.

Para algumas utilizações, incluindo utilização *in vivo* de anticorpos em humanos e ensaios de detecção *in vitro*, pode ser preferível utilizar anticorpos humanos ou quiméricos. Os anticorpos totalmente humanos são particularmente desejáveis para o tratamento terapêutico de doentes humanos. Ver também, Patentes U.S. nº 4444887 e 4716111; e publicações PCT WO 98/46645, WO 98/50435, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/35735 e WO 91/10741. Numa forma de realização específica, os anticorpos da presente invenção compreendem um ou mais domínios VH e VL da invenção e regiões constantes de outra molécula de imunoglobulina, de um modo preferido, uma molécula de imunoglobulina humana. Numa forma de realização específica, os anticorpos da presente invenção compreendem uma ou mais CDR correspondentes aos domínios VH e VL da invenção e regiões estruturais de outra molécula de imunoglobulina, de um modo preferido, uma molécula de imunoglobulina humana. É também aqui descrito um anticorpo que compreende uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais CDR de VL ou CDR de VH correspondentes a um ou mais dos domínios VH ou VL de um ou mais scFvs referidos no Quadro 1, ou os seus fragmentos ou variantes, e regiões estruturais (e, opcionalmente uma ou mais CDR não derivadas dos anticorpos expressos pelos scFvs referidos no Quadro 1) de uma molécula de imunoglobulina humana. É também aqui descrito um anticorpo que compreende uma CDR3 de VH, CDR3 de VL ou ambas,

correspondentes ao mesmo scFv, ou a scFvs diferentes seleccionados dos scFvs referidos no Quadro 1, ou os seus fragmentos ou variantes, e regiões estruturais de uma imunoglobulina humana.

Um anticorpo quimérico é uma molécula em que porções diferentes do anticorpo são derivadas de moléculas de imunoglobulina diferentes, possuindo esses anticorpos uma região variável derivada de um anticorpo humano e uma região constante de imunoglobulina não humana (e. g., murídeo) ou vice-versa. Os métodos para produzir os anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica. Ver e. g., Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi *et al.*, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125:191-202 (1989); Patentes U.S. nº 5807715; 4816567; e 4816397. Os anticorpos quiméricos compreendendo uma ou mais CDR de espécie humana e regiões estruturais de uma molécula de imunoglobulina não humana (e. g., regiões estruturais de uma molécula de imunoglobulina murídea, canina ou felina) (ou vice versa) podem ser produzidos utilizando uma variedade de técnicas conhecidas na matéria incluindo, por exemplo, enxerto de CDR (documento EP 239400; publicação PCT WO 91/09967; Patentes U.S. nº 5225539; 5530101; e 5585089), recobrimento ou revestimento (EP 592106; EP 519596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska *et al.*, *PNAS* 91:969-973 (1994)) e transferência de cadeia (Patente U.S. nº 5565352). Num caso preferido, os anticorpos quiméricos compreendem uma CDR3 humana possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das CDR3 de VH ou CDR3 de VL de um domínio VH ou VL de um ou mais dos scFvs referidos no Quadro 1, ou uma sua variante, e regiões estruturais não humanas ou regiões estruturais humanas diferentes daquelas das regiões estruturais no scFv correspondente divulgado no

Quadro 1. Frequentemente, os resíduos estruturais nas regiões estruturais serão substituídos pelo resíduo correspondente do anticorpo dador de CDR para alterar, de um modo preferido, melhorar, a ligação ao antigénio. Estas substituições estruturais são identificadas por métodos bem conhecidos na técnica, e. g., por modelação das interações dos resíduos das CDR e estruturais para identificar resíduos estruturais importantes para ligação ao antigénio e por comparação das sequências para identificar resíduos estruturais invulgares em posições particulares. (ver, e. g., Queen et al., Patente U.S. nº 5585089; Riechmann et al., *Nature* 352:323 (1988).)

Os intracorpos são anticorpos, frequentemente scFvs, que são expressos a partir de uma molécula de ácido nucleico recombinante e manipulados para serem retidos intracelularmente (e. g., retidos no citoplasma, retículo endoplasmático ou periplasma). Os intracorpos podem ser utilizados, por exemplo, para eliminar a função de uma proteína à qual o intracorpo se liga. A expressão de intracorpos pode ser também regulada através da utilização de promotores indutíveis no vector de expressão do ácido nucleico compreendendo o intracorpo. Os intracorpos da invenção podem ser produzidos utilizando métodos conhecidos na técnica, tais como aqueles divulgados e revistos em Chen et al., *Hum. Gene Ther.* 5:595-601 (1994); Marasco, W.A., *Gene Ther.* 4:11-15 (1997); Rondon e Marasco, *Annu. Rev. Microbiol.* 51:257-283 (1997); Proba et al., *J. Mol. Biol.* 275:245-253 (1998); Cohen et al., *Oncogene* 17:2445-2456 (1998); Ohage e Steipe, *J. Mol. Biol.* 291:1119-1128 (1999); Ohage et al., *J. Mol. Biol.* 291:1129-1134 (1999); Wirtz e Steipe, *Protein Sci.* 8:2245-2250 (1999); Zhu et al., *J. Immunol. Methods* 231:207-222 (1999); e referências ali citadas.

A expressão recombinante de um anticorpo da invenção (incluindo fragmentos de anticorpo do mesmo (e. g., uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo da invenção), requer a construção de um vector(es) de expressão contendo um polinucleótido que codifica o anticorpo. Uma vez obtido um polinucleótido que codifica uma molécula de anticorpo (e. g., um anticorpo inteiro, uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou a sua porção (contendo, de um modo preferido, mas não necessariamente, o domínio variável da cadeia pesada ou leve)) da invenção, o(s) vector(es) para a produção da molécula de anticorpo podem ser produzidos por tecnologia de ADN recombinante utilizando técnicas bem conhecidas na técnica. Assim, são aqui descritos métodos para preparar uma proteína por expressão de um polinucleótido contendo uma sequência de nucleótidos que codifica um anticorpo. Métodos que são bem conhecidos dos especialistas na técnica podem ser utilizados para construir vectores de expressão contendo sequências de codificação de anticorpo e sinais de controlo da transcrição e tradução apropriados. Estes métodos incluem, por exemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*. Assim, a invenção proporciona vectores replicáveis compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica uma molécula de anticorpo da invenção (e. g., um anticorpo inteiro, uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, um domínio variável da cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou uma porção do mesmo, ou uma CDR da cadeia pesada ou leve, um Fv de cadeia simples ou seus fragmentos), operacionalmente ligado a um promotor. Tais vectores podem incluir a sequência de nucleótidos que codifica a região constante da molécula de anticorpo (ver, e. g., Publicação PCT WO 86/05807; Publicação PCT WO 89/01036; e Patente U.S. nº 5122464) e o domínio variável do anticorpo pode ser clonado num tal vector para expressão da

cadeia pesada completa, da cadeia leve completa ou de ambas, as cadeias pesada e leve completas.

O vector ou vectores de expressão são transferidos para uma célula hospedeira por técnicas convencionais e as células transfectadas são em seguida cultivadas por técnicas convencionais para produzir um anticorpo da invenção. Assim, a invenção inclui células hospedeiras contendo polinucleótido(s) que codifica(m) um anticorpo da invenção (e. g., anticorpo inteiro, um cadeia pesada ou leve do mesmo, ou porção do mesmo, ou um anticorpo de cadeia simples, ou um seu fragmento), operacionalmente ligado a um promotor heterólogo. Em formas de realização preferidas, para a expressão de moléculas de anticorpo inteiras, os vectores que codificam ambas as cadeias pesada e leve podem ser co-expressados na célula hospedeira para expressão da molécula de imunoglobulina completa, como detalhado abaixo.

Pode utilizar-se uma variedade de sistemas de hospedeiro-vector de expressão para expressar as moléculas de anticorpo da invenção. Tais sistemas de expressão em hospedeiro representam veículos através dos quais as sequências de codificação de interesse podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células que, quando transformadas ou transfectadas com as sequências de codificação de nucleótidos apropriadas, podem expressar uma molécula de anticorpo da invenção *in situ*. Estas incluem, mas não estão limitados a, partículas de bacteriófagos manipulados para expressar os seus fragmentos de anticorpo ou variantes (anticorpos de cadeia simples), microrganismos, tal como bactérias (e. g., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas com ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expressão de ADN de plasmídeo ou ADN de cosmídeo

contendo sequências de codificação de anticorpo; levedura (e. g., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada com vetores de expressão de levedura recombinantes contendo sequências de codificação de anticorpo; sistemas de células de insectos infectadas com vetores de expressão de vírus recombinantes (e. g., baculovírus) contendo sequências de codificação de anticorpo; sistemas de células vegetais infectadas com vetores de expressão de vírus recombinantes (e. g., vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformas com vetores de expressão de plasmídeo recombinantes (e. g., plasmídeo Ti) contendo sequências de codificação de anticorpo; ou sistemas de células de mamífero (e. g., células COS, CHO, BHK, 293, 3T3, NS0) que têm construções de expressão recombinantes contendo promotores derivado do genoma de células de mamífero (e. g., promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (e. g., o promotor tardio de adenovírus; o promotor 7,5K do vírus vaccinia). De um modo preferido, as células bacterianas, tal como *Escherichia coli* e, de um modo mais preferido, células eucarióticas, especialmente para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante inteiro, são utilizadas para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante. Por exemplo, as células de mamífero tais como as células de ovário de hamster chinês (CHO), em conjunto com um vector tal como o elemento promotor do gene precoce intermediário principal do citomegalovírus humano, é um sistema de expressão eficaz para anticorpos (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990); Bebbington et al., Bio/Techniques 10:169 (1992); Keen e Hale, Cytotechnology 18:207 (1996)).

Nos sistemas bacterianos, um número de vetores de expressão pode ser vantajosamente seleccionado dependendo da

utilização pretendida para a molécula de anticorpo a ser expressa. Por exemplo, quando se pretende produzir uma grande quantidade dessa proteína para a preparação de composições farmacêuticas de uma molécula de anticorpo, podem ser desejáveis vectores que coordenam a expressão de níveis altos de produtos de proteína de fusão que são facilmente purificados. Tais vectores incluem, mas não estão limitados ao vector de expressão pUR278 de *E. coli* (Ruther *et al.*, EMBO 1. 2:1791 (1983)), no qual a sequência de codificação do anticorpo pode ser ligada individualmente no vector em grelha com a região de codificação de lac Z de modo que seja produzida uma proteína de fusão; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)); e semelhantes. Os vectores pGEX podem ser também utilizados para expressar polipéptidos estranhos como proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST). Em geral, tais proteínas de fusão são solúveis e podem ser facilmente purificadas de células lisadas por adsorção e ligação a esferas de agarose glutathione da matriz, seguidas de eluição na presença de glutathione livre. Os vectores pGEX são concebidos para incluir trombina ou sítios de dissociação da protease do factor Xa de modo que o produto genético alvo clonado possa ser libertado a partir da unidade de GST.

Num sistema de insecto, pode utilizar-se o vírus da poliedrose nuclear *Autographa californica* (AcNPV) como um vector para expressar genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. As sequências de codificação de anticorpo podem ser clonadas individualmente em regiões não essenciais (por exemplo, o gene de poliedrina) do vírus e colocadas sob o controlo de um promotor de AcNPV (por exemplo, o promotor de poliedrina).

Nas células hospedeiras de mamífero pode utilizar-se um número de sistemas de expressão baseados em vírus. Nos casos em que é utilizado um adenovírus como um vector de expressão, a sequência de codificação do anticorpo de interesse pode ser ligada a um complexo de controlo da transcrição/tradução de adenovírus, e. g., o promotor tardio e a sequência líder tripartida. Este gene quimérico pode ser depois inserido no genoma do adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção numa região não essencial do genoma viral (e. g., região E1 ou E3) resultará num vírus recombinante que é viável e capaz de expressar a molécula de anticorpo em hospedeiros infectados (e. g., ver Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 81:355-359 (1984)). Podem ser também necessários sinais de iniciação específicos para a tradução eficiente das sequências de codificação de anticorpo inseridas. Estes sinais incluem o codão de início ATG e sequências adjacentes. Além disso, o codão de início tem de estar em fase com a grelha de leitura da sequência de codificação desejada para garantir a tradução de toda a inserção. Estes sinais de controlo da tradução exógenos e codões de início podem ser de uma variedade de origens, tanto naturais como sintéticas. A eficiência de expressão pode ser melhorada pela inclusão de elementos intensificadores da transcrição apropriados, sequências de terminação da transcrição, etc. (ver, e. g., Bittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)).

Além disso, pode escolher-se uma estirpe de célula hospedeira que modula a expressão das sequências inseridas, ou modifica e processa o produto de gene do modo específico desejado. Tais modificações (e. g., glicosilação) e processamento (e. g., dissociação) dos produtos proteicos podem

ser importantes para a função da proteína. Diferentes células hospedeiras têm mecanismos característicos e específicos para o processamento e modificação pós-tradução de proteínas e produtos de genes. Podem ser escolhidas linhas de células ou sistemas hospedeiros apropriados para garantir a modificação e processamento correctos da proteína estranha expressada. Para este objectivo, podem ser utilizadas células hospedeiras eucarióticas que possuem a maquinaria celular para processamento apropriado do transcrito primário, glicosilação e fosforilação do produto de gene. Tais células hospedeiras de mamífero incluem, mas não estão limitados a, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, NSO, MDCK, 293, 3T3, W138 e, em particular, linhas de células de cancro da mama tais como, por exemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 e T47D, e linhas de células da glândula mamária normais, tais como, por exemplo, CRL7030 e HsS78Bst.

Para a produção de alto rendimento e longa duração é preferida a expressão estável. Por exemplo, podem ser criadas por engenharia linhas de células que expressam de maneira estável o anticorpo. Em vez de utilizar vectores de expressão que contêm origens de replicação virais, as células hospedeiras podem ser transformadas com ADN controlado pelos elementos de controlo da expressão apropriados (e. g., promotor, intensificador, sequências, sequências de terminação da transcrição, sítios de poliadenilação, etc.), e um marcador seleccionável. Após a introdução do ADN estranho, as células manipuladas podem ser deixadas crescer durante 1-2 dias num meio enriquecido e, em seguida, são trocadas para um meio selectivo. O marcador seleccionável no plasmídeo recombinante confere resistência à selecção e permite que as células integrem de maneira estável o plasmídeo nos seus cromossomas e cresçam para formar focos, os quais, por sua vez, podem ser clonados e

expandidos em linhas de células. Este método pode ser vantajosamente utilizado para manipular linhas de células que expressam a molécula de anticorpo. Tais linhas de células manipuladas podem ser particularmente úteis no rastreio e avaliação de composições que interagem directa ou indirectamente com a molécula de anticorpo.

Pode utilizar-se um número de sistemas de selecção, incluindo mas não estando limitados à timidina-cinase do vírus simplex da herpes (Wigler *et al.*, Cell 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosil-transferase (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 48:202 (1992)) e pode utilizar-se genes de adenina fosforibosil-transferase (Lowy *et al.*, Cell 22:8 17 (1980)) em células tk-, hgprt- ou aprt-, respectivamente. De igual modo, pode utilizar-se também a resistência a antimetabolito como a base de selecção para os seguintes genes: *dhfr*, o qual confere resistência a metotrexato (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. EUA 77:357 (1980); O'Lebre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 78:1527 (1981)); *gpt*, o qual confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 78:2072 (1981)); *neo*, o qual confere resistência ao aminoglicósido G-418 (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu e Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); e Morgan e Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); TIB TECH 11(5):155-2 15 (Maio, 1993)); e *hygro*, o qual confere resistência a higromicina (Santerre *et al.*, Gene 30:147 (1984)). Os métodos geralmente conhecidos na técnica da tecnologia de ADN recombinante podem ser rotineiramente aplicados para seleccionar o clone recombinante desejado e tais métodos são descritos, por exemplo, em Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NI

(1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); e nos Capítulos 12 e 13, Dracopoli et al. (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NI (1994); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981).

Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem ser aumentados por amplificação vectorial (para uma revisão, ver Bebbington e Hentschel, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells" em *ADN Cloning*, Vol.3. (Academic Press, Nova Iorque, 1987)). Quando um marcador no sistema vectorial que expressa o anticorpo é amplificável, o aumento do nível de inibidor presente na cultura de células hospedeiras aumentará o número de cópias do gene marcador. Uma vez que a região amplificada está associada à sequência de codificação do anticorpo, a produção do anticorpo também aumentará (Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.* 3:257 (1983)).

Os vectores que utilizam glutamina-sintase (GS) ou DHFR como marcadores seleccionáveis podem ser amplificados na presença dos fármacos metionina sulfoximina ou metotrexato, respectivamente. Uma vantagem dos vectores baseados em glutamina-sintase é a disponibilidade de linhas celulares (e. g., a linha de células de mieloma murídeo, NS0) que são negativas para a glutamina-sintase. Os sistemas de expressão de glutamina-sintase podem também actuar em células que expressam glutamina-sintase (e. g. células de Ovário de Hamster Chinês (CHO)), proporcionando um inibidor adicional para prevenir o funcionamento do gene endógeno. Um sistema de expressão de glutamina-sintase e seus componentes são detalhados nas publicações PCT: W087/04462; W086/05807; W089/01036; W089/10404;

e WO91/06657. Além disso, os vectores de expressão de glutamina-sintase que podem ser utilizados de acordo com a presente invenção estão comercialmente disponíveis de fornecedores, incluindo, por exemplo Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH). A expressão e produção de anticorpos monoclonais utilizando um sistema de expressão de GS em células de mieloma murídeo é descrita em Bebbington *et al.*, *Bio/technology* 10:169(1992) e em Biblia e Robinson *Biotechnol. Prog.* 11:1 (1995).

A célula hospedeira pode ser co-transfectada com dois vectores de expressão da invenção, o primeiro vector codifica um polipéptido derivado da cadeia pesada e o segundo vector codifica um polipéptido derivado da cadeia leve. Os dois vectores podem conter marcadores seleccionáveis idênticos que permitem uma expressão idêntica dos polipéptidos das cadeias pesada e leve. Alternativamente, pode utilizar-se um único vector que codifica, e é capaz de expressar, ambos os polipéptidos das cadeias pesada e leve. Nestas situações, a cadeia leve é, de um modo preferido colocada antes da cadeia pesada para evitar um excesso de cadeia pesada livre tóxica (Proudfoot, *Nature* 322:52 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 77:2 197 (1980)). As sequências de codificação para as cadeias pesada e leve podem compreender ADNc ou ADN genómico.

Uma vez sintetizada quimicamente ou expressa de maneira recombinante uma molécula de anticorpo da invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo), ela pode ser purificada por qualquer método conhecido na técnica para a purificação de uma molécula de imunoglobulina ou, mais geralmente, uma molécula proteica, tais como, por exemplo, por cromatografia (e. g., troca iónica, afinidade, particularmente por afinidade para o

antigénio específico após Proteína A e cromatografia em coluna de permeação), centrifugação, solubilidade diferencial ou por qualquer outra técnica corrente para a purificação de proteínas. Além disso, os anticorpos da presente invenção podem ser fundidos com sequências polipeptídicas heterólogas aqui descritas ou, de outro modo, conhecidas na técnica, para facilitar a purificação.

Caracterização de Anticorpos anti-TR4

Os anticorpos da presente invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) também podem ser descritos ou especificados em termos da sua ligação aos polipéptidos de TR4 ou fragmentos ou variantes de polipéptidos de TR4. Em formas de realização específicas, os anticorpos da invenção ligam os polipéptidos de TR4, ou seus fragmentos ou variantes, com uma constante de dissociação ou K_D inferior ou igual a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M ou 10^{-5} M. De um modo mais preferido, os anticorpos da invenção ligam polipéptidos de TR4 ou aos seus fragmentos ou variantes com uma constante de dissociação ou K_D inferior ou igual a 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M ou 10^{-8} M. De um modo ainda mais preferido, os anticorpos da invenção ligam polipéptidos de TR4 ou seus fragmentos ou variantes com uma constante de dissociação ou K_D inferior ou igual a 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M ou 10^{-15} M. A invenção abrange anticorpos que ligam os polipéptidos de TR4 com uma constante de dissociação ou K_D que está dentro de qualquer uma

das gamas que estão entre cada um dos valores individuais especificados.

Em formas de realização específicas, os anticorpos da invenção ligam polipéptidos de TR4 ou os seus fragmentos ou variantes com uma velocidade de dissociação (k_{off}) inferior ou igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-3} s^{-1} . De um modo mais preferido, os anticorpos da invenção ligam os polipéptidos de TR4 ou os seus fragmentos ou variantes com um velocidade de dissociação (k_{off}) inferior ou igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, ou 10^{-5} s^{-1} $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-7} s^{-1} . A invenção abrange anticorpos que ligam os polipéptidos de TR4 com uma velocidade de dissociação (k_{off}) que está dentro de qualquer uma das gamas que estão entre cada um dos valores individuais especificados.

Noutras formas de realização, os anticorpos da invenção ligam polipéptidos de TR4 ou os seus fragmentos ou variantes com uma velocidade de associação (k_{on}) maior ou igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. De um modo mais preferido, os anticorpos da invenção ligam os polipéptidos de TR4 ou seus fragmentos ou variantes com uma velocidade de associação (k_{on}) maior ou igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A invenção abrange anticorpos que ligam os polipéptidos de TR4 com uma velocidade de associação (k_{on}) que está dentro de qualquer uma das gamas que está entre cada um dos valores individuais especificados.

Os anticorpos da invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) ligam-se imunoesspecificamente a um

polipéptido ou fragmento de polipéptido ou variante de polipéptidos de TR4 humano (SEQ ID N°:1). Noutra forma de realização, os anticorpos da invenção ligam-se imuno especificamente a um polipéptido ou fragmento de polipéptido ou variante de polipéptidos de TR4 símio. Ainda noutra forma de realização, os anticorpos da invenção ligam-se imuno especificamente a um polipéptido ou fragmento de polipéptido ou variante de polipéptidos de TR4 murídeo. Numa forma de realização, os anticorpos da invenção ligam-se imuno especificamente a polipéptidos de TR4 humano e símio. Noutra forma de realização, os anticorpos da invenção ligam-se imuno especificamente a polipéptidos de TR4 humano e polipéptidos de TR4 murídeo. De um modo mais preferido, os anticorpos da invenção ligam-se, de um modo preferido, a polipéptidos de TR4 humano em comparação com os polipéptidos de TR4 murídeo.

Em formas de realização preferidas, os anticorpos da presente invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo), ligam-se imuno especificamente a polipéptidos de TR4 e não reagem de modo cruzado com quaisquer outros antigénios. Em formas de realização preferidas, os anticorpos da invenção ligam-se imuno especificamente a polipéptidos de TR4 (e. g., SEQ ID N°:1 ou os seus fragmentos ou variantes) e não reagem de modo cruzado com um ou mais membros adicionais dos polipéptidos da Factor de Necrose Tumoral da Família de Receptores do Factor de Necrose Tumoral (e. g., TR1, TR5, TR10 BCMA, TACI, CD30, CD27, OX40, 4-1BB, CD40, NGFR, TNFR1, TNFR2, Fas e NGFR).

Numa forma de realização preferida, os anticorpos da invenção ligam de um modo preferido o TR4 (SEQ ID N°:1) ou os seus fragmentos e variantes relativamente à sua aptidão para

ligar TR1, TR5, TR7 ou TR10 (SEQ ID N°:2-5) ou os seus fragmentos ou variantes. Noutras formas de realização preferidas, os anticorpos da invenção ligam-se, de um modo preferido, a TR4 e TR7 (SEQ ID N°:1 e 3), ou seus fragmentos e variantes relativamente à sua aptidão para ligar TR1, TR5 ou TR10 (SEQ ID N°:5, 2 e 4) ou seus fragmentos ou variantes. Noutras formas de realização preferidas, os anticorpos da invenção ligam TR1, TR4, TR5, TR7 e TR10 (SEQ ID N°:5, 1, 2, 3 e 4). A aptidão de um anticorpo para ligar de um modo preferido um antígeno em comparação com um outro antígeno pode ser determinada utilizando qualquer método conhecido na técnica.

A título de exemplo não limitativo, pode considerar-se que um anticorpo liga de um modo preferido um primeiro antígeno, se ele liga o referido primeiro antígeno com uma constante de dissociação (K_D) que é inferior à K_D do anticorpo para o segundo antígeno. Noutra forma de realização não limitativa, pode considerar-se que um anticorpo liga, de um modo preferido, um primeiro antígeno, se ele liga o referido primeiro antígeno com uma afinidade (*i. e.*, K_D) que é pelo menos uma ordem de grandeza inferior à K_D do anticorpo para o segundo antígeno. Noutra forma de realização não limitativa, pode considerar-se que um anticorpo liga, de um modo preferido, um primeiro antígeno, se ele liga o referido primeiro antígeno com uma afinidade (*i. e.*, K_D) que é pelo menos duas ordens de grandeza inferior à K_D do anticorpo para o segundo antígeno.

Noutro forma de realização não limitativa, pode considerar-se que um anticorpo liga, de um modo preferido, um primeiro antígeno, se este liga o referido primeiro antígeno com uma velocidade de dissociação (k_{off}) que é inferior à k_{off} do anticorpo para o segundo antígeno. Noutra forma de realização não

limitativa, pode considerar-se que um anticorpo liga, de um modo preferido, um primeiro antigénio, se este liga o referido primeiro antigénio com uma k_{off} que é pelo menos uma ordem de grandeza inferior à k_{off} do anticorpo para o segundo antigénio. Noutra forma de realização não limitativa, pode considerar-se que um anticorpo liga, de um modo preferido, um primeiro antigénio, se este liga o referido primeiro antigénio com uma k_{off} que é pelo menos duas ordens de grandeza inferiores à k_{off} do anticorpo para o segundo antigénio.

A invenção abrange também anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que têm uma ou mais das mesmas características biológicas que um ou mais dos anticorpos aqui descritos. Por "características biológicas" refere-se as actividades ou propriedades *in vitro* ou *in vivo* dos anticorpos, tais como, por exemplo, a aptidão para ligar aos polipéptidos de TR4 (e. g., receptores de TRAIL embutidos na membrana), a aptidão para estimular a actividade biológica mediada por TR4 (e. g., para estimular a apoptose de células que expressam TR4, ver Exemplo 4); a aptidão para bloquear substancialmente o ligando de TR4 (e. g. TRAIL (SEQ ID N°:66), também conhecido como AIM-1, Pedido Internacional n° WO 97/35899 e Pedido de Patente U.S. 5771223), ou um seu fragmento, variante ou proteína de fusão, por ligação ao receptor de TRAIL, ver Exemplo 3; ou a aptidão para regular positivamente a expressão de TR4 na superfície de células. Outras actividades biológicas que os anticorpos contra os polipéptidos de TR4 aqui descritos, podem ter, incluem, mas não estão limitados a, aptidão para inibir a actividade biológica mediada por TR4 (e. g., para inibir a apoptose de células que expressam TR4) ou a aptidão para regular negativamente a expressão de TR4 na superfície de células.

Opcionalmente, os anticorpos da invenção ligar-se-ão ao mesmo epítopo que pelo menos um dos anticorpos especificamente aqui referidos. Essa ligação ao epítopo pode ser rotineiramente determinada utilizando ensaios conhecidos na técnica.

A presente invenção proporciona também anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo ou variantes), que estimulam actividades biológicas mediadas por TR4. Numa forma de realização, um anticorpo que estimula actividades biológicas mediadas por TR4 compreende, ou alternativamente consiste de um domínio VH e/ou VL de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1, ou o seu fragmento ou variante. Numa forma de realização específica, um anticorpo que estimula actividades biológicas mediadas por TR4 compreende, ou alternativamente consiste de um domínio VH e VL de qualquer um dos scFvs referidos no Quadro 1, ou o seu fragmento ou variante. As moléculas de ácido nucleico que codificam estes anticorpos estão também abrangidas pela invenção.

A presente invenção proporciona também anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo ou variantes), que estimulam a apoptose de células que expressam TR4 (ver Exemplo 4). É aqui descrito um anticorpo que estimula a apoptose de células que expressam TR4 e que compreende, ou alternativamente consiste de um domínio VH e/ou VL de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1, ou o seu fragmento ou variante. É também aqui descrito um anticorpo que estimula a apoptose de células que expressam TR4 e que compreende, ou alternativamente consiste de um domínio VH e VL de qualquer um dos scFvs referidos no Quadro 1, ou o seu fragmento ou variante. As moléculas de ácido

nucleico que codificam estes anticorpos são também aqui descritas.

Em formas de realização preferidas, a presente invenção proporciona também anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que estimulam a apoptose de células que expressam TR4 igualmente bem na presença ou ausência de reagentes de reticulação de anticorpo, tal como, por exemplo, células reagentes anti-Fc de Ig (ver, por exemplo, Exemplo 4). Numa forma de realização específica, os anticorpos da presente invenção estimulam a apoptose de células HeLa, igualmente bem na presença ou ausência de um reagente de reticulação de anticorpo anti-Fc de Ig. Noutra forma de realização específica, os anticorpos da presente invenção estimulam a apoptose de células HeLa, igualmente bem na presença ou ausência de um reagente de reticulação de anticorpo anti-Fc de Ig na presença de 2 microgramas/mililitro de ciclo-heximida. Noutra forma de realização, os anticorpos da presente invenção estimulam a apoptose de células SW480, igualmente bem na presença ou ausência de um reagente de reticulação de anticorpo anti-Fc de Ig. Noutra forma de realização específica, os anticorpos da presente invenção estimulam a apoptose de células SW480, igualmente bem na presença ou ausência de um reagente de reticulação de anticorpo anti-Fc de Ig na presença de 2 microgramas/mililitro de ciclo-heximida.

Noutras formas de realização preferidas, a presente invenção proporciona também anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo), que estimulam a apoptose de células que expressam TR4, pelo menos, tão bem quanto uma concentração

igual (em termos de, por exemplo, nanogramas/mililitro) de polipéptido TRAIL (incluindo fragmentos, variantes ou proteínas de fusão do polipéptido TRAIL) estimula a apoptose de células que expressam TR4 (ver, por exemplo, Exemplo 4). Numa forma de realização específica, os anticorpos da invenção estimulam a apoptose de células que expressam TR4 melhor do que uma concentração igual (em termos de, por exemplo, nanogramas/mililitro) de polipéptido TRAIL (incluindo fragmentos, variantes ou proteínas de fusão do polipéptido TRAIL) estimula a apoptose de células que expressam TR4. Numa forma de realização específica, os anticorpos da invenção estimulam a apoptose de células HeLa melhor do que uma concentração igual (em termos de, por exemplo, nanogramas/mililitro) de polipéptido TRAIL (incluindo fragmentos, variantes ou proteínas de fusão do polipéptido TRAIL) estimula a apoptose de células que expressam TR4. Noutra forma de realização específica, os anticorpos da presente invenção estimulam a apoptose de células HeLa melhor do que uma concentração igual (em termos de, por exemplo, nanogramas/mililitro) de polipéptido TRAIL (incluindo fragmentos, variantes ou proteínas de fusão do polipéptido TRAIL) estimula a apoptose de células que expressam TR4 na presença de 2 microgramas/mililitro de ciclo-heximida.

Noutras formas de realização preferidas, a presente invenção proporciona também anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos ses fragmentos de anticorpo), que estimulam mais a apoptose de células que expressam TR4 quando administrados em associação com um fármaco quimioterapêutico, do que o fármaco quimioterapêutico ou os anticorpos sozinhos estimulam a apoptose das células que expressam o receptor. Em formas de realização específicas, os

anticorpos da presente invenção, estimulam mais a apoptose de células que expressam TR4 quando administrados em associação com Topotecano, do que o Topotecano ou os anticorpos sozinhos estimulam a apoptose das células que expressam o receptor. Em formas de realização específicas, os anticorpos da presente invenção, estimulam mais apoptose de células que expressam TR4 quando administrados em associação com ciclo-heximida, do que a ciclo-heximida ou os anticorpos sozinhos estimulam a apoptose de células que expressam o receptor.

A presente invenção proporciona também anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo), que bloqueiam ou inibem a ligação de TRAIL a um polipéptido de TR4 (ver Exemplo 3). É aqui descrito um anticorpo que bloqueia ou inibe a ligação de TRAIL a TR4 e que compreende, ou alternativamente consiste de um domínio VH e/ou VL de, pelo menos, um dos scFvs referidos no Quadro 1, ou o seu fragmento ou variante. É também aqui descrito um anticorpo que bloqueia ou inibe a ligação de TRAIL a TR4 e que compreende, ou alternativamente consiste de um domínio VH e VL de qualquer um dos scFvs referidos no Quadro 1, ou o seu fragmento ou variante. As moléculas de ácido nucleico que codificam estes anticorpos, são também aqui descritas.

São também aqui descritas proteínas de fusão compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um anticorpo (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de fragmentos de anticorpo ou os seus variantes) que se liga imuno-especificamente a TR4 e um polipéptido heterólogo. De um modo preferido, o polipéptido heterólogo ao qual o anticorpo está fundido é útil para o funcionamento ou é útil para visar as células que expressam TR4. São também aqui descritos anticorpos

biespecíficos nos quais um sítio de ligação do anticorpo é específico para TR4 e o segundo sítio de ligação do anticorpo é específico para um polipéptido heterólogo, tais como TR7 ou um antígeno específico do tumor. Num caso alternativo, o polipéptido heterólogo ao qual o anticorpo está fundido é útil para direccionar o anticorpo para uma célula tumoral. Num caso, uma proteína de fusão aqui descrita compreende ou, alternativamente, consiste de um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de qualquer um ou mais dos domínios VH de um anticorpo da invenção ou a sequência de aminoácidos de qualquer um ou mais dos domínios VL de um anticorpo da invenção ou seus fragmentos ou variantes, e uma sequência polipeptídica heteróloga. Noutro caso, uma proteína de fusão aqui descrita compreende ou, alternativamente, consiste de um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de qualquer uma, duas, três ou mais das CDR de VH de um anticorpo da invenção, ou a sequência de aminoácidos de qualquer uma, duas, três ou mais das CDR de VL de um anticorpo da invenção, ou seus fragmentos ou variantes, e uma sequência polipeptídica heteróloga. Num caso preferido, a proteína de fusão compreende ou, alternativamente, consiste de um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de uma CDR3 de VH de um anticorpo da invenção, ou o seu fragmento ou variante, e uma sequência polipeptídica heteróloga, proteína de fusão essa que se liga imuno especificamente a TR4. Noutro caso, uma proteína de fusão compreende, ou alternativamente consiste de um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de, pelo menos, um domínio VH de um anticorpo da invenção e a sequência de aminoácidos de, pelo menos, um domínio VL de um anticorpo da invenção ou os seus fragmentos ou variantes e uma sequência polipeptídica heteróloga. De um modo preferido, os domínios VH e VL da proteína de fusão correspondem a um único anticorpo (ou

fragmento scFv ou Fab) da invenção. Ainda noutro caso, uma proteína de fusão aqui descrita compreende, ou alternativamente consiste de um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de qualquer uma, duas, três ou mais das CDR de VH de um anticorpo da invenção e a sequência de aminoácidos de qualquer uma, duas, três ou mais das CDR de VL de um anticorpo da invenção, ou seus fragmentos ou variantes, e um sequência polipeptídica heteróloga. De um modo preferido, as duas, três, quatro, cinco, seis ou mais das CDR(s) de VH ou CDR(s) de VL correspondem a um único anticorpo (ou fragmento scFv ou Fab) da invenção. As moléculas de ácido nucleico que codificam estas proteínas de fusão são também aqui descritas.

Os anticorpos da presente invenção (incluindo os seus fragmentos de anticorpo) podem ser caracterizados de uma variedade de formas. Em particular, os anticorpos e os seus fragmentos da invenção podem ser analisados quanto à aptidão para se ligarem imuno-especificamente a TR4 ou um seu fragmento ou variante de TR4, utilizando técnicas aqui descritas ou modificando rotineiramente técnicas conhecidas na matéria. Os ensaios em relação à aptidão dos anticorpos da invenção para ligarem imuno-especificamente TR4 ou um fragmento ou variante de TR4, podem ser realizados em solução (e. g., Houghten, *Bio/Techniques* 13:412-421(1992)), em esferas (e. g., Lam, *Nature* 354:82-84 (1991)), em chips (e. g., Fodor, *Nature* 364:555-556 (1993)), em bactérias (e. g., Patente U.S. nº 5223409), em esporos (e. g., Patentes nº 5571698; 5403484; e 5223409), em plasmídeos (e. g., Cull et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89:1865-1869 (1992)) ou em fago (e. g., Scott e Smith, *Science* 249:386-390 (1990); Devlin, *Science* 249:404-406 (1990); Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 87:7178-7182 (1990); e Felici, *J. Mol. Biol.* 222:301-310 (1991)). Os anticorpos que

foram identificados como ligando-se imuno-especificamente a TR4 ou um fragmento ou variante de TR4 podem ser depois analisados quanto à sua especificidade e afinidade para o TR4 ou um fragmento ou variante de TR4, utilizando ou modificando rotineiramente técnicas aqui descritas ou, de outro modo, conhecidas na técnica.

Os anticorpos da invenção podem ser analisados quanto à ligação imuno-específica a polipéptidos de TR4 e reactividade cruzada com outros antígenos por qualquer método conhecido na técnica. Os imunoenaios que podem ser utilizados para analisar a ligação imuno-específica e reactividade cruzada incluem, mas não estão limitados a, sistemas de ensaio competitivo e não competitivo utilizando técnicas, tais como análise BIAcore (ver, e. g., Exemplo 2), análise por FACS (classificação celular activada por fluorescência), imunofluorescência, imunocitoquímica, radioimunoenaios, ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), imunoenaios em "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, transferências de Western, reacções com precipitina, reacções de precipitina de difusão em gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaios imunorradiométricos, imunoenaios fluorescentes e imunoenaios de proteína A, para nomear apenas alguns. Tais ensaios são rotina e bem conhecidos na técnica (ver, e. g., Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque). Os imunoenaios ilustrativos são descritos resumidamente abaixo (mas não o são a título de limitação).

Os ELISA compreendem a preparação do antígeno, revestimento dos poços de uma placa microtítulo de 96 poços com o antígeno, eliminação por lavagem do antígeno que não se

ligou aos poços, adição do anticorpo de interesse conjugado com um composto detectável tal como um substrato enzimático (e. g., peroxidase de rábano silvestre ou fosfatase alcalina) aos poços e incubação durante um intervalo de tempo, eliminação por lavagem dos anticorpos não ligados ou dos anticorpos ligados de maneira não imuno-específica, e detecção da presença dos anticorpos especificamente ligados ao antígeno que reveste o poço. Nos ELISA, o anticorpo de interesse não tem de estar conjugado com um composto detectável; em vez disso, pode ser adicionado ao poço um segundo anticorpo (que reconhece o anticorpo de interesse) conjugado com um composto detectável. Alternativamente, o antígeno não tem de estar directamente revestido no poço; em vez disso, as placas de ELISA podem ser revestidas com um anticorpo anti-Fc de Ig e o antígeno, na forma de uma proteína de fusão receptor de TRAIL-Fc, pode ser ligado ao anti-Fc de Ig revestido na placa. Isto pode ser desejável para manter a proteína do antígeno (e. g., os polipéptidos de TR4) numa conformação mais nativa do que pode ter quando é directamente revestido numa placa. Noutra alternativa, em vez de revestir o poço com antígeno, pode revestir-se o poço com anticorpo. Neste caso, a molécula detectável poderia ser o antígeno conjugado com um composto detectável tal como um substrato enzimático (e. g., peroxidase de rábano silvestre ou fosfatase alcalina). Um especialista na técnica estará bem informado sobre os parâmetros que podem ser modificados para aumentar o sinal detectado, bem como de outras variações dos ELISA conhecidas na técnica. Para uma discussão mais detalhada sobre ELISA ver, e. g., Ausubel *et al.*, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque em 11.2.1.

A afinidade de ligação de um anticorpo (incluindo um scFv ou outra molécula compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo ou variantes) a um antígeno e a velocidade de dissociação de uma interacção anticorpo-antígeno pode ser determinada por ensaios de ligação competitiva. Um exemplo de um ensaio de ligação competitiva é um radioimunoensaio compreendendo a incubação do antígeno marcado (e. g., antígeno marcado com ^3H ou ^{125}I), ou o seu fragmento ou variante com o anticorpo de interesse na presença de quantidades crescentes de antígeno não marcado, e a detecção do anticorpo ligado ao antígeno marcado. A afinidade do anticorpo da presente invenção para o TR4 e as velocidades de dissociação podem ser determinadas a partir dos dados por análise gráfica de Scatchard. A competição com um segundo anticorpo pode ser também determinada utilizando radioimunoensaios. Neste caso, um polipéptido de TR4 é incubado com um anticorpo da presente invenção conjugado com um composto marcado (e. g., composto marcado com ^3H ou ^{125}I) na presença de quantidades crescentes de um segundo anticorpo anti-TR4 não marcado. Este tipo de ensaio competitivo entre dois anticorpos, pode ser também utilizado para determinar se dois anticorpos ligam epítomos iguais ou diferentes.

Numa forma de realização preferida, é utilizada análise cinética BIAcore para determinar as ligação velocidades de associação e dissociação dos anticorpos (incluindo os seus fragmentos de anticorpo ou variantes) a um receptor de TRAIL, ou fragmentos de um receptor de TRAIL. A análise cinética BIAcore compreende a análise da associação e dissociação de anticorpos a chips com receptores de TRAIL imobilizados na sua superfície como descrito em pormenor no Exemplo 2.

Os protocolos de imunoprecipitação compreendem geralmente sujeitar uma população de células a lise num tampão de lise tal como tampão RIPA (1% de NP-40 ou Triton X-100, 1% de desoxicolato de sódio, 0,1% de SDS, NaCl 0,15 M, fosfato de sódio 0,01 M a pH 7,2, 1% de Trasilol) suplementado com inibidores de proteína-fosfatase e/ou protease (e. g., EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sódio), adicionar o anticorpo de interesse ao lisado celular, incubar durante um intervalo de tempo (e. g., 1 a 4 horas) a 40 graus C, adicionar as esferas de sepharose de proteína A e/ou proteína G ao lisado celular, incubar durante cerca de uma hora ou mais a 40 graus C, lavar as esferas em tampão de lise e ressuspender as esferas em tampão de SDS/amostra. A aptidão do anticorpo de interesse para imunoprecipitar um antígeno particular pode ser avaliada, e. g., por análise de transferência de Western. Um especialista na técnica estará bem informado sobre os parâmetros que podem ser modificados para aumentar a ligação do anticorpo a um antígeno e diminuir o fundo (e. g., pré-limpendo o lisado celular com esferas de sepharose). Para uma discussão mais detalhada sobre os protocolos de imunoprecipitação ver, e. g., Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque em 10.16.1.

A análise de transferência de Western compreende geralmente a preparação de amostras de proteína, a electroforese das amostras de proteína num gel de poliacrilamida (e. g., 8%-20% SDS-PAGE dependendo do peso molecular do antígeno), transferir a amostra de proteína do gel de poliacrilamida para uma membrana tal como nitrocelulose, PVDF ou nylon, bloquear a membrana em solução de bloqueio (e. g., PBS com 3% de BSA ou leite desnatado), lavar a membrana em tampão de lavagem (e. g.,

PBS-Tween 20), bloquear a membrana com anticorpo primário (o anticorpo de interesse) diluído em tampão de bloqueio, lavar a membrana em tampão de lavagem, bloquear a membrana com um anticorpo secundário (o qual reconhece o anticorpo primário, e. g., um anticorpo anti-humano) conjugado com um substrato enzimático (e. g., peroxidase de rábano silvestre ou fosfatase alcalina) ou molécula radioactiva (e. g., ^{32}P ou ^{125}I) diluído em tampão de bloqueio, lavar a membrana em tampão de lavagem, e detectar a presença do antigénio. Um especialista na técnica estará bem informado sobre os parâmetros que podem ser modificados para aumentar o sinal detectado e para reduzir o ruído de fundo. Para uma discussão mais detalhada sobre os protocolos de transferência de Western ver, e. g., Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque em 10.8.1.

Conjugados de Anticorpo

São aqui descritos anticorpos (incluindo os seus fragmentos de anticorpo ou variantes), fundidos de modo recombinante ou conjugados quimicamente (incluindo conjugações covalentes e não covalentes) com um polipéptido heterólogo (ou porção do mesmo, de um modo preferido pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90 ou pelo menos 100 aminoácidos do polipéptido) para produzir proteínas de fusão. A fusão não tem de ser necessariamente directa, mas pode ocorrer através de sequências de ligação. Por exemplo, os anticorpos da invenção podem ser utilizados para direccionar polipéptidos heterólogos para tipos de células particulares (e. g., células cancerosas), *in vitro* ou *in vivo*, fundindo ou conjugando os polipéptidos

heterólogos com anticorpos da invenção que são específicos para antígenos particulares da superfície celular ou que ligam antígenos que ligam receptores particulares da superfície celular. Os anticorpos da invenção podem ser também fundidos com albumina (incluindo mas não estando limitada a albumina de soro humano recombinante (ver, e. g., Patente U.S. nº 5876969, publicada em 2 de Março de 1999, Patente EP 0413622 e Patente U.S. nº 5766883, publicada em 16 de Junho de 1998), resultando em polipéptidos quiméricos. Num caso preferido, os polipéptidos e/ou anticorpos da presente invenção (incluindo os seus fragmentos) são fundidos com a forma madura da albumina de soro humano (*i. e.*, aminoácidos 1 - 585 da albumina de soro humano como é apresentada nas Figuras 1 e 2 da Patente EP 0322094). Noutro caso preferido, os polipéptidos e/ou anticorpos da presente invenção (incluindo os seus fragmentos) são fundidos com fragmentos de polipéptido compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos resíduos de aminoácido 1-z da albumina de soro humano, em que z é um número inteiro desde 369 a 419, como descrito na Patente U.S. 5766883. Os polipéptidos e/ou anticorpos da presente invenção (incluindo fragmentos dos mesmos) podem ser fundidos com a extremidade N- ou C-terminal da proteína heteróloga (e. g., polipéptido Fc de imunoglobulina ou polipéptido de albumina de soro humano). São aqui descritos polinucleótidos que codificam proteínas de fusão. Tais proteínas de fusão podem, por exemplo, facilitar a purificação e podem aumentar a semivida *in vivo*. Os anticorpos fundidos ou conjugados com polipéptidos heterólogos podem ser também utilizados em imunoensaios *in vitro* e métodos de purificação utilizando métodos conhecidos na técnica. Ver e. g., Harbor *et al.*, *supra*, e publicação PCT WO 93/2 1232; documento EP 439095; Naramura *et al.*, Immunol. Lett. 39:91-99 (1994);

Patente U.S. 5474981; Gillies *et al.*, PNAS 89:1428-1432 (1992); Fell *et al.*, J. Immunol. 146:2446-2452 (1991).

São também aqui descritas composições compreendendo ou, alternativamente, consistindo de polipéptidos heterólogos fundidos ou conjugados com fragmentos de anticorpo. Por exemplo, os polipéptidos heterólogos podem ser fundidos ou conjugados com um fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)₂ ou uma sua porção. Os métodos para fundir ou conjugar polipéptidos com porções de anticorpo são conhecidos na técnica. Ver, *e. g.*, Patentes U.S. nº 5356603; 5622929; 5359046; 5349053; 5447851; 5112946; documento EP 307434; documento EP 367166; publicações PCT WO 96/04388; WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 88: 10535-10539 (1991); Zheng *et al.*, J. Immunol. 154:5590-5600 (1995); e Vil *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 89:11357-11341 (1992).

Outras proteínas de fusão podem ser geradas através das técnicas de recombinação aleatória de genes, recombinação aleatória de motivos, recombinação aleatória de exões e/ou recombinação aleatória de codões (colectivamente referidos como "recombinação aleatória de ADN"). A recombinação aleatória de ADN pode ser utilizada para modular as actividades de anticorpos (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo ou variantes), tais métodos podem ser utilizados para produzir anticorpos com actividade alterada (*e. g.*, anticorpos com maiores afinidades e menores velocidades de dissociação). Ver, em geral, Patentes U.S. nº 5605793; 5811238; 5830721; 5834252; e 5837458, e Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-35 (1997); Harayama, Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998); Hansson, *et al.*, J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999); e Lorenzo e Blasco, Biotechniques

24(2):308-13 (1998). Num caso, os polinucleótidos que codificam os anticorpos da invenção podem ser alterados submetendo-os a mutagênese aleatória por PCR propensa a erro, inserção aleatória de nucleótidos ou outros métodos antes da recombinação. Noutro caso, uma ou mais porções de um polinucleótido que codifica um anticorpo cujas porções ligam-se imuno-especificamente a TR4 podem ser recombinadas com um ou mais componentes, motivos, secções, partes, domínios, fragmentos, etc. de uma ou mais moléculas heterólogas.

Além do mais, os anticorpos da presente invenção (incluindo fragmentos de anticorpo dos mesmos) podem ser fundidos com sequências marcadoras, tal como polipéptidos para facilitar a purificação. Em formas de realização preferidas, a sequência de aminoácidos marcadora é um polipéptido de hexa-histidina, tal como a etiqueta proporcionada num vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre outras, muitas das quais estão comercialmente disponíveis. Como descrito em Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86:821-824 (1989), por exemplo, a hexa-histidina proporciona uma purificação conveniente da proteína de fusão. Outras etiquetas peptídicas úteis para purificação incluem, mas não estão limitados à etiqueta de hemaglutinina "HA", a qual corresponde a um epítopo derivado da proteína hemaglutinina da gripe (Wilson *et al.*, Cell 37:767 (1984)) e a etiqueta FLAG[®] (Stratagene, La Jolla, CA).

A presente invenção abrange ainda anticorpos (incluindo os seus fragmentos de anticorpo) conjugados com um agente de diagnóstico ou terapêutico. Os anticorpos podem ser utilizados como diagnóstico, por exemplo, para seguir ou prognosticar o desenvolvimento ou progressão de um tumor como parte de um procedimento de avaliação clínica, *e. g.*, para determinar a

eficácia de um dado regime de tratamento. A detecção pode ser facilitada acoplando o anticorpo a uma substância detectável. Os exemplos de substâncias detectáveis incluem, mas não estão limitadas a várias enzimas, grupos protéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioactivos, metais emissores de positrões utilizando várias tomografias por emissão de positrões e iões metálicos paramagnéticos não radioactivos. A substância detectável pode ser acoplada ou conjugada directamente com o anticorpo ou indirectamente através de um intermediário (tal como, por exemplo, uma unidade de ligação conhecida na técnica) utilizando técnicas conhecidas na matéria. Ver, por exemplo, Patente U.S. nº 4741900 para iões metálicos que podem ser conjugados com anticorpos para serem utilizados como agentes de diagnóstico de acordo com a presente invenção. Os exemplos de enzimas adequadas incluem, mas não estão limitados a, peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou acetilcolinesterase; os exemplos de complexos de grupos protéticos adequados incluem, mas não estão limitados a, estreptavidina/biotina e avidina/biotina; os exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem, mas não estão limitados a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui, mas não está limitado a, luminol; os exemplos de materiais bioluminescentes incluem, mas não estão limitados a, luciferase, luciferina e aequorina; e os exemplos de materiais radioactivos adequados incluem, mas não estão limitados a, iodo (^{121}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), enxofre (^{35}S), trítio (^3H), índio (^{111}In , ^{112}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, $^{115\text{m}}\text{In}$), tecnécio (^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), tálio (^{201}Tl), gálio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paládio (^{103}Pd),

molibdénio (^{99}Mo), xénon (^{135}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh e ^{97}Ru .

Além disso, um anticorpo da invenção (incluindo um scFv ou outra molécula compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) pode ser acoplado ou conjugado com uma unidade terapêutica tal como uma citotoxina, e. g., um agente citostático ou citocida, um agente terapêutico ou um ião metálico radioactivo, e. g., emissores alfa tais como, por exemplo, ^{213}Bi , ou outros radioisótopos, tais como, por exemplo, ^{103}Pd , ^{135}Xe , ^{131}I , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , ^{90}Y , ^{117}Sn , ^{186}Re , ^{188}Re e ^{166}Ho . Em formas de realização específicas, um anticorpo ou o seu fragmento é ligado a quelantes macrocíclicos que quelam iões radiometálicos, incluindo mas não estando limitados a, ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{166}Ho e ^{153}Sm , a polipéptidos. Em formas de realização específicas, o quelante macrocíclico é ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA). Noutras formas de realização específicas, o DOTA é ligado a um anticorpo da invenção ou fragmento do mesmo através de uma molécula de ligação. Os exemplos de moléculas de ligação úteis para conjugar o DOTA com um polipéptido são geralmente conhecidas na técnica - ver, por exemplo, DeNardo *et al.*, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90, 1998; Peterson *et al.*, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7, 1999; e Zimmerman *et al.*, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, 1999.

Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial para as células. Os exemplos incluem, mas não estão limitados a, paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina,

daunorrubicina, di-hidroxi-antracina-9,10-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, timidina-cinase, endonuclease, RNase, e puromicina e os seus fragmentos, variantes ou homólogos. Os agentes terapêuticos incluem, mas não estão limitados a, antimetabolitos (e. g., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, descarbazina), agentes alquilantes (e. g., mecloretamina, tioepa, clorambucil, melfalano, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cisdiclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (e. g., daunorrubicina (antigamente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (e. g., dactinomicina (antigamente actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes antimitóticos (e. g., vincristina e vinblastina).

Pode utilizar-se técnicas conhecidas na matéria para marcar os anticorpos da invenção. Tais técnicas incluem, mas não estão limitados à utilização de agentes de conjugação bifuncionais (ver e. g., Patentes U.S. nº 5756065; 5714711; 5696239; 5652371; 5505931; 5489425; 5435990; 5428139; 5342604; 5274119; 4994560; e 5808003) e reacções de acoplamento directo (e. g., reacção de Bolton-Hunter e Cloramina-T).

Os anticorpos da invenção que estão conjugados podem ser utilizados para modificar uma dada resposta biológica, em que o agente terapêutico ou unidade de fármaco não é para ser interpretado como estando limitado aos agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a unidade de fármaco pode ser uma proteína ou polipéptido possuindo uma actividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, mas não estão limitadas

a, por exemplo, uma toxina, tais como abrina, ricina A, alfa toxina, exotoxina de pseudomonas ou toxina da difteria, saporina, momordina, gelonina, proteína antiviral de erva-tintureira, alfasarcina e toxina da cólera; uma proteína tal como factor de necrose tumoral, interferão alfa, interferão beta, factor de crescimento de tecido nervoso, factor de crescimento derivado de plaquetas, activador de plasminogénio tecidular, um agente apoptótico, e. g., TNF-alfa, TNF-beta, AIM I (ver, Publicação Internacional nº WO 97/35899), AIM II (ver, Publicação Internacional nº WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi et al., Int. Immunol., 6:1567-1574 (1994)), VEGI (ver, Publicação Internacional nº WO 99/23105), um agente trombótico ou um agente antiangiogénico, e. g., angiostatina ou endostatina; ou modificadores da resposta biológica, tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor de estimulação de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), factor de estimulação de colónias de granulócitos (G-CSF) ou outros factores de crescimento.

Os anticorpos da invenção (incluindo fragmentos de anticorpo dos mesmos) podem ser também ligados a suportes sólidos, os quais são particularmente úteis para imunoensaios ou purificação do antigénio alvo. Tais suportes sólidos incluem, mas não estão limitados a, vidro, celulose, poliacrilamida, nylon, poliestireno, poli(cloreto de vinilo) ou polipropileno.

As técnicas para conjugar uma unidade terapêutica com os anticorpos são bem conhecidas, ver, e. g., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom

et al., "Antibodies For Drug Delivery", em *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982).

Alternativamente, um anticorpo da invenção pode ser conjugado com um segundo anticorpo para formar um heteroconjugado de anticorpo como descrito por Segal na Patente U.S. nº 4676980.

Um anticorpo da invenção (incluindo outras moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo de um fragmento de anticorpo do mesmo), com ou sem uma unidade terapêutica conjugada com o mesmo, pode ser utilizado como um agente terapêutico, administrado sozinho ou em associação com factor(es) citotóxico(s) e/ou citocina(s).

Utilizações dos Anticorpos da Invenção

Não limitando as aplicações, os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados, por exemplo, para purificar, detectar e direccionar os polipéptidos, incluindo em métodos de diagnóstico e terapêuticos *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, os

anticorpos têm aplicação em imunoensaios para medir qualitativa e quantitativamente os níveis de polipéptidos de TR4 em amostras biológicas. Ver, e. g., Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988).

Imunofenotipagem

Os anticorpos da invenção podem ser utilizados para imunofenotipagem de linhas de células e amostras biológicas (ver, por exemplo, Exemplo 4). O produto de tradução do gene de TR4 pode ser útil como um marcador específico de células ou, mais especificamente, como um marcador celular que é expresso de modo diferenciado nas várias fases de diferenciação e/ou maturação de tipos de células particulares, particularmente de tumores e células cancerígenas. Os anticorpos monoclonais dirigidos contra um epítopo específico, ou associação de epítopos, permitirão rastrear populações celulares que expressam o marcador. Podem ser utilizadas várias técnicas que utilizam anticorpos monoclonais para rastrear populações celulares que expressam o(s) marcador(es), e incluem separação magnética utilizando esferas magnéticas revestidas com anticorpo, "incubação" com anticorpo ligado a uma matriz sólida (*i. e.*, placa) e citometria de fluxo (ver, e. g., Patente U.S. 5985660; e Morrison et al., *Cell*, 96:737-49 (1999)).

Estas técnicas permitem rastrear populações particulares de células, tais como as que podem ser encontradas em malignidades hematológicas (*i. e.* doença residual mínima (MRD) em doentes leucémicos agudos) e células "não próprias" em transplantes para prevenir a Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (GVHD). Alternativamente, estas técnicas permitem rastrear células

pluripotenciais e progenitoras hematopoiéticas capazes de sofrer proliferação e/ou diferenciação, como podem ser encontradas no sangue do cordão umbilical humano.

Mapeamento de Epítopo

A presente invenção proporciona anticorpos (incluindo fragmentos de anticorpo dos mesmos) que podem ser utilizados para identificar epítomos de um polipéptido de TR4. Em particular, os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados para identificar epítomos de um polipéptido de TR4 humano (e. g., SEQ ID N°:1) ou um polipéptido de TR4 expresso em células humanas; um TR4 murídeo ou um polipéptido de TR4 expresso em células muríneas; um receptor polipeptídico TR4 de rato ou um polipéptido de TR4 expresso em células de rato; ou um polipéptido de TR4 de macaco ou um polipéptido de TR4 expresso em células de macaco, utilizando técnicas aqui descritas ou, de outro modo, conhecidas na técnica. Os fragmentos que actuam como epítomos podem ser produzidos por quaisquer meios convencionais. (ver, e. g., Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 82:5131-5135 (1985), descrito em mais detalhe na Patente U.S. nº 4711211.) Os epítomos identificados dos anticorpos da presente invenção podem ser, por exemplo, utilizados como candidatos de vacinas, i. e., para imunizar um indivíduo para desencadear anticorpos contra as formas naturais de polipéptidos de TR4.

Utilizações dos Anticorpos em Diagnóstico

Os anticorpos marcados da invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus

fragmentos de anticorpo ou variantes) que se ligam especificamente a um polipéptido de TR4 podem ser utilizados para efeitos de diagnóstico para detectar, diagnosticar, prognosticar ou seguir doenças e/ou distúrbios. Em formas de realização específicas, os anticorpos marcados da invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo ou variantes) que se ligam especificamente a um polipéptido de TR4 podem ser utilizados para efeitos de diagnóstico para detectar, diagnosticar, prognosticar ou seguir doenças e/ou distúrbios associados à expressão e/ou actividade aberrante de TR4.

A invenção proporciona a detecção da expressão de um polipéptido de TR4 compreendendo: (a) analisar a expressão de um polipéptido de TR4 numa amostra biológica de um indivíduo utilizando um ou mais anticorpos da invenção que se ligam imuno especificamente a TR4; e (b) comparar o nível do polipéptido de TR4 na amostra biológica com um nível padrão do polipéptido de TR4, (e. g., o nível em amostras biológicas normais).

É também aqui descrita a detecção da expressão aberrante de um polipéptido de TR4 por um método compreendendo: (a) analisar a expressão de um polipéptido de TR4 numa amostra biológica de um indivíduo utilizando um ou mais anticorpos da invenção que se ligam imuno especificamente a TR4; e (b) comparar o nível de um polipéptido de TR4 na amostra biológica com um nível padrão de um polipéptido de TR4, e. g., em amostras biológicas normais, de acordo com o que um aumento ou diminuição no nível analisado de um polipéptido de TR4 em comparação com o nível padrão de um polipéptido de TR4 é indicativo de expressão aberrante.

Por "amostra biológica" pretende referir-se quaisquer fluidos e/ou células obtidos a partir de um indivíduo, fluido corporal, tecido corporal, células corporais, linha de células, cultura de tecido ou outra fonte que possa conter uma proteína polipeptídica ou ARNm de TR4. Os fluidos corporais incluem, mas não estão limitados a, soros, plasma, urina, líquido sinovial, líquido espinal, saliva e mucosa. As amostras de tecidos podem ser retiradas de praticamente qualquer tecido no corpo. As amostras de tecido podem ser também obtidas a partir de material de autópsia. Os métodos para obter biopsias de tecido e fluidos corporais de mamíferos são bem conhecidos na técnica. Sempre que a amostra biológica é para incluir ARNm, um biopsia de tecido é a fonte preferida.

Os anticorpos da invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que se ligam especificamente a um polipéptido de TR4 podem ser utilizados para efeitos de diagnóstico para detectar, diagnosticar, prognosticar ou seguir cancro e outros distúrbios hiperproliferativos, e/ou doenças ou estados associados com as mesmas. É aqui descrita a detecção da expressão aberrante do polipéptido de TR4 por um método compreendendo: (a) analisar a expressão do polipéptido de TR4 numa amostra biológica de um indivíduo utilizando um ou mais anticorpos da invenção que se ligam imunoespecificamente a um polipéptido de TR4; e (b) comparar o nível de um polipéptido de TR4 com um nível padrão do polipéptido de TR4, e. g., em amostras biológicas normais, de acordo com o que um aumento ou diminuição no nível analisado de polipéptido de TR4 em comparação com o nível padrão do polipéptido de TR4 é indicativo de um cancro e/ou um distúrbio hiperproliferativo.

Foi demonstrado que, nalguns casos, o TRAIL mata selectivamente as células tumorais (ver, por exemplo, Oncogene 19:3363-71 (2000)). Isto pode ser uma consequência da expressão diferencial dos receptores de TRAIL em células normais e cancerosas. Assim, em formas de realização específicas, um aumento no nível analisado de um polipéptido de TR4 é indicativo de um cancro e/ou um distúrbio hiperproliferativo.

Outros relatórios sugerem que uma diminuição da expressão de TR4 pelas células tumorais pode ser um mecanismo através do qual as células tumorais escapam ao sistema imunitário (ver, por exemplo, Int. J. Oncol. 16:917-25 (2000)). Assim, noutras formas de realização específicas, uma diminuição no nível analisado do polipéptido de TR4 é indicativo de um cancro e/ou um distúrbio hiperproliferativo.

É aqui descrita a detecção e diagnóstico de uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4 num animal, de um modo preferido, um mamífero e, de um modo muito preferido, um humano. Num caso, o diagnóstico descrito compreende: a) administrar (por exemplo, por via parentérica, subcutânea ou intraperitoneal) a um indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo marcado da invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que se liga imuno especificamente a um polipéptido de TR4; b) aguardar durante um intervalo de tempo após a administração para permitir que o anticorpo marcado se concentre, de um modo preferido, em sítios do indivíduo onde é expresso o polipéptido de TR4 (e para que as moléculas marcadas não ligadas sejam eliminadas até ao nível de base); c) determinar o nível de base; e d) detectar o anticorpo marcado no indivíduo, de tal forma que a detecção do anticorpo marcado ou o

seu fragmento acima do nível de base e acima ou abaixo do nível observado numa pessoa sem a doença ou distúrbio, indica que o indivíduo tem uma doença ou distúrbio particular associado à expressão aberrante do polipéptido de TR4. O nível de base pode ser determinado por vários métodos incluindo, comparar a quantidade de molécula marcada detectada com um valor padrão previamente determinado para um sistema particular.

Será compreendido na técnica que o tamanho do indivíduo e o sistema de imagiologia utilizado determinará a quantidade de unidade de imagiologia necessária para produzir imagens de diagnóstico. No caso de uma unidade de radioisótopo, para um indivíduo humano, a quantidade de radioactividade injectada variará normalmente desde cerca de 5 a 20 milicuries de ⁹⁹Tc. O anticorpo marcado acumular-se-á depois de um modo preferido no local das células que contêm a proteína específica. A imagiologia de tumores *in vivo* é descrita em S.W. Burchiel *et al.*, "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments". (Capítulo 13 em *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer*, S.W. Burchiel e B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)).

Dependendo de várias variáveis, incluindo o tipo de etiqueta utilizada e o modo de administração, o intervalo de tempo após administração para permitir que a molécula marcada se concentre, de um modo preferido, em sítios do indivíduo e para que as moléculas marcadas não ligadas sejam eliminadas até ao nível de base é de 6 a 48 horas ou 6 a 24 horas ou 6 a 12 horas. Noutro caso, o intervalo de tempo após administração é de 5 a 20 dias ou 5 a 10 dias.

Num caso, o acompanhamento da doença ou distúrbio é realizado repetindo o método de diagnóstico da doença ou distúrbio, por exemplo, um mês após o diagnóstico inicial, seis meses após o diagnóstico inicial, um ano após o diagnóstico inicial, etc.

A presença da molécula marcada pode ser detectada no doente utilizando métodos conhecidos na técnica para varrimento *in vivo*. Estes métodos dependem do tipo de etiqueta utilizada. O especialista será capaz de determinar o método apropriado para detectar uma etiqueta particular. Os métodos e dispositivos que podem ser utilizados nos métodos de diagnóstico incluem, mas não está limitado a, tomografia computadorizada (CT), varrimento de todo o corpo tal como tomografia de emissão de positrões (PET), imagiologia de ressonância magnética (MRI) e sonografia.

Num caso específico, a molécula é marcada com um radioisótopo e é detectada no doente utilizando um instrumento cirúrgico sensível a radiação (Thurston *et al.*, Patente U.S. nº 5441050). Noutro caso, a molécula é marcada com um composto fluorescente e é detectada no doente utilizando um instrumento de varrimento sensível a fluorescência. Noutro caso, a molécula é marcada com um metal emissor de positrões e é detectada no doente utilizando tomografia de emissão de positrões. Ainda noutro caso, a molécula é marcada com uma etiqueta paramagnética e é detectada num doente utilizando imagiologia de ressonância magnética (MRI).

Utilizações Terapêuticas de Anticorpos

Um ou mais anticorpos da presente invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que se ligam imunoespecificamente a TR4 podem ser utilizados localmente ou sistemicamente no corpo como um agente terapêutico. A presente invenção é ainda dirigida a anticorpos ou os seus fragmentos para serem utilizados em terapias baseadas em anticorpos, as quais envolvem a administração dos anticorpos da invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) a um animal, de um modo preferido, um mamífero e, de um modo muito preferido, um humano, para prevenir ou tratar uma ou mais das doenças, distúrbios ou estados divulgados. Os compostos terapêuticos da invenção incluem, mas não estão limitados a, anticorpos da invenção e ácidos nucleicos que codificam anticorpos (e anticorpos anti-idiotípicos) da invenção como aqui descritos. Numa forma de realização, os anticorpos da invenção podem ser utilizados para tratar, melhorar ou prevenir doenças, distúrbios ou estados, incluindo, mas não estando limitados a, qualquer uma ou mais das doenças, distúrbios ou estados aqui descritos. O tratamento e/ou prevenção de doenças, distúrbios ou condições inclui, mas não está limitado ao alívio de sintomas associados àquelas doenças, distúrbios ou condições. Os anticorpos da invenção podem ser proporcionados em composições farmacêuticamente aceitáveis como conhecidas na técnica ou como aqui descritas. Em certas formas de realização, as propriedades dos anticorpos da presente invenção, como detalhadas nos Exemplos abaixo, tornam os anticorpos melhores agentes terapêuticos do que os anticorpos de ligação a TR4 anteriormente descritos.

Utilizações Terapêuticas de Anticorpos para o Tratamento de Cancros

Em formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam o TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar, prevenir ou melhorar cancro. Em formas de realização específicas, os anticorpos da invenção são utilizados para inibir a progressão ou metástase de cancros e outros distúrbios relacionados. Os cancros e distúrbios relacionados, incluem, mas não estão limitados a, cancro do cólon, cancro cervical, leucemia (incluindo leucemias agudas (e. g., leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluindo mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica e eritroleucemia)) e leucemias crónicas (e. g., leucemia mielocítica (granulocítica) crónica e leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (e. g., doença de Hodgkin e doença de não-Hodgkin), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, doença da cadeia pesada e tumores sólidos incluindo, mas não estando limitados a, sarcomas e carcinomas, tais como fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliossarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, cancro pancreático, cancro da mama, cancro do ovário, cancro da próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma das glândulas sudoríparas, carcinoma das glândulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma das células renais, hepatoma, carcinoma das vias biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor

de Wilm, tumor testicular, carcinoma do pulmão, carcinoma das células pequenas do pulmão, carcinoma da bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma.

Em formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar, prevenir ou melhorar cancro renal.

Em formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar, prevenir ou melhorar melanoma.

Em formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar, prevenir ou melhorar cancros do fígado, tal como hepatomas.

Em formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar, prevenir ou melhorar cancros do sistema nervoso central, tais como meduloblastoma, neuroblastoma e glioblastoma.

De acordo com a presente invenção foi demonstrada a expressão do receptor de TRAIL TR4 em tecido de carcinoma do pulmão, tecido de carcinoma da bexiga e tecido de carcinoma do ovário. Adicionalmente, foi demonstrado, de acordo com a

presente invenção que o receptor de TRAIL TR4 é expresso em tecido tumoral primário da mama, cólon, pulmão e estômago. (ver Exemplo 9). Assim, em formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar cancro do pulmão. Noutras formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar cancro da bexiga. Noutras formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar cancro do ovário. Noutras formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar cancro da mama. Noutras formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar cancro do cólon e/ou cancro colorrectal. Noutras formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar cancro do estômago.

Noutras formas de realização extremamente preferidas, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar, prevenir ou melhorar cancro renal, melanoma, cancro pancreático e cancros do fígado, tal como hepatomas.

Noutra forma de realização, os anticorpos da invenção que ligam TR4 e estimulam a apoptose de células que expressam TR4 são utilizados para tratar doenças e/ou distúrbios associados a

sobrevivência celular aumentada, ou à inibição da apoptose, incluindo cancros (tais como linfomas foliculares, carcinomas com mutações de p53 e tumores dependentes de hormonas, incluindo, mas não estando limitados a cancro do cólon, tumores cardíacos, cancro pancreático, melanoma, retinoblastoma, glioblastoma, cancro do pulmão, cancro intestinal, cancro testicular, cancro do estômago, neuroblastoma, mixoma, mioma, linfoma, endotelioma, osteoblastoma, osteoclastoma, osteossarcoma, condrossarcoma, adenoma, cancro da mama, cancro da próstata, sarcoma de Kaposi e cancro do ovário); distúrbios auto-imunes (tais como esclerose múltipla, síndrome de Sjogren, tiroidite de Hashimoto, cirrose biliar, doença de Behcet, doença de Crohn, polimiosite, lúpus eritematoso disseminado e glomerulonefrite relacionada com imune artrite reumatóide) e infecções virais (tais como vírus do herpes, vírus da varíola e adenovírus), doença de informação do enxerto contra o hospedeiro, rejeição aguda de enxerto e rejeição crónica de enxerto. Em formas de realização preferidas, os anticorpos e composições de anticorpo da invenção são utilizados para inibir o crescimento, progressão e/ou metástase de cancros, em particular aqueles listados acima. Em formas de realização preferidas, os anticorpos e composições de anticorpos da invenção não são hepatotóxicos *in vitro* ou *in vivo*.

Utilizações Terapêuticas Adicionais dos Anticorpos

Noutra forma de realização, a invenção proporciona o anticorpo ou o seu fragmento da invenção para ser utilizado num método de inibição do crescimento ou de morte de células que expressam TR4, compreendendo ou, alternativamente, consistindo o método da administração, a um animal em que é desejada essa

inibição do crescimento ou morte de células que expressam TR4, do anticorpo ou os seus fragmentos ou do anticorpo em associação com outros compostos terapêuticos, tal como agentes quimioterapêuticos numa quantidade eficaz para inibir o crescimento ou a morte de células que expressam TR4.

É também aqui descrito um método para melhorar a apoptose induzida por um ligando da família de TNF (especialmente TRAIL (SEQ ID N°:66)), o qual envolve a administração, a uma célula que expressa um polipéptido de TR4, de uma quantidade eficaz de um anticorpo da invenção, de um modo preferido, um anticorpo anti-TR4 agonista, capaz de induzir ou aumentar a sinalização mediada por TR4. De um modo preferido, a sinalização mediada por TR4 é aumentada ou induzida por um anticorpo da invenção para tratar uma doença em que é exibida uma apoptose reduzida ou expressão reduzida de citocinas e moléculas de adesão.

É também aqui descrito um método para inibir a apoptose induzida por um ligando da família de TNF (especialmente TRAIL (SEQ ID N°:66)), o qual envolve a administração, a uma célula que expressa um polipéptido de TR4, de uma quantidade eficaz de um anticorpo aqui descrito, de um modo preferido, um anticorpo anti-TR4 antagonista, capaz de diminuir a sinalização mediada por TR4. De um modo preferido, a sinalização mediada por TR4 é diminuída para tratar uma doença em que é exibida apoptose ou expressão de NFκB.

Por "agonista" de TR4 pretende referir-se compostos naturais e sintéticos capazes de melhorar ou potenciar a apoptose mediada pelo receptor de TRAIL. Por "antagonista" de TR4 pretende referir-se compostos naturais e sintéticos capazes de inibir a apoptose mediada pelo receptor de TRAIL. Se qualquer

"agonista" ou "antagonista" candidato pode melhorar ou inibir, respectivamente, a apoptose pode ser determinado utilizando ensaios de resposta celular ligando/receptor da família de TNF conhecidos na técnica, incluindo aqueles descritos em mais pormenor abaixo.

Os anticorpos da invenção podem ser utilizados para tratar, melhorar ou prevenir doenças, distúrbios ou estados associados à expressão e/ou actividade aberrante de TR4 ou ligando de TR4, incluindo, mas não estando limitados a, qualquer uma ou mais das doenças, distúrbios ou estados aqui descritos. O tratamento e/ou prevenção de doenças, distúrbios ou estados associados à expressão e/ou actividade aberrante de TR4 ou expressão e/ou actividade aberrante do ligando de TR4 inclui, mas não estão limitados ao alívio de sintomas associados àquelas doenças, distúrbios ou estados. Os anticorpos da invenção podem ser proporcionados em composições farmacologicamente aceitáveis como conhecidas na técnica ou como aqui descritas.

Além disso, os anticorpos da presente invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que activam as actividades biológicas mediadas pelo receptor de TRAIL (e. g., a indução de apoptose no receptor de TRAIL expressando células) podem ser administrados a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio aqui descrito, particularmente cancro e outros distúrbios hiperproliferativos. Estes anticorpos podem potenciar ou activar todas ou um subconjunto das actividades biológicas de receptor de TRAIL, por exemplo, induzir uma alteração conformacional no receptor de TRAIL. Numa forma de realização específica, um anticorpo da presente invenção que aumenta a actividade de TR4 em pelo menos 5%, pelo menos 10%,

pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99%, pelo menos duas vezes, pelo menos três vezes, pelo menos quatro vezes, pelo menos cinco vezes, pelo menos dez vezes, pelo menos vinte vezes, pelo menos cinquenta vezes ou pelo menos cem vezes relativa à actividade de TR4 na ausência do anticorpo é administrado a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio. Noutra forma de realização, uma associação de anticorpos, uma associação de fragmentos de anticorpo, ou uma associação de anticorpos e fragmentos de anticorpo que aumentam a actividade de TR4 em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99%, pelo menos duas vezes, pelo menos três vezes, pelo menos quatro vezes, pelo menos cinco vezes, pelo menos dez vezes, pelo menos vinte vezes, pelo menos cinquenta vezes ou pelo menos um cem vezes relativamente à actividade de TR4 na ausência dos referidos anticorpos e/ou fragmentos de anticorpo, é administrada a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio.

Além disso, os anticorpos da presente invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que activam as actividades biológicas mediadas por TR4 (e. g., a indução de apoptose em células que expressam TR4) podem ser administrados a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio

associado à expressão aberrante de TR4, ausência de função de TR4, expressão aberrante do ligando de TR4 ou ausência de função de ligando de TR4. Estes anticorpos podem potenciar ou activar todas ou um subconjunto das actividades biológicas de receptor de TRAIL, por exemplo, induzindo uma alteração conformacional no receptor de TRAIL. Numa forma de realização específica, um anticorpo da presente invenção que aumenta a actividade de TR4 em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99%, pelo menos duas vezes, pelo menos três vezes, pelo menos quatro vezes, pelo menos cinco vezes, pelo menos dez vezes, pelo menos vinte vezes, pelo menos cinquenta vezes ou pelo menos cem vezes relativamente à actividade de TR4 na ausência do anticorpo é administrado a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4, ausência de função de TR4, expressão aberrante do ligando de TR4 ou ausência de função de ligando de TR4. Noutra forma de realização, uma associação de anticorpos, uma associação de fragmentos de anticorpo, ou uma associação de anticorpos e fragmentos de anticorpo que aumenta a actividade de TR4 em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99%, pelo menos duas vezes, pelo menos três vezes, pelo menos quatro vezes, pelo menos cinco vezes, pelo menos dez vezes, pelo menos vinte vezes, pelo menos cinquenta vezes, ou pelo menos cem vezes relativamente à actividade de TR4 na ausência dos referidos

anticorpos e/ou fragmentos de anticorpo, é administrada a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4 ou ausência de função de TR4 ou expressão aberrante do ligando de TR4 ou ausência de função de ligando de TR4.

Os anticorpos da presente invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que actuam como agonistas de um receptor de TRAIL, de um modo preferido da transdução de sinal de TR4, podem ser administrados a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4, ausência de função de TR4, expressão aberrante do ligando de TR4 ou ausência de função de ligando de TR4. Por exemplo, os anticorpos da invenção que imitam a acção da ligação de TRAIL a TR4, na totalidade ou em parte, agonistas de TR4, podem ser administrados a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4, ausência de função de TR4, expressão aberrante do ligando de TR4 ou ausência de função de ligando de TR4. Como um exemplo alternativo, os anticorpos aqui descritos que rompem ou impedem a interacção entre TR4 e o seu ligando ou inibem, reduzem ou impedem a transdução de sinal através de TR4, podem ser administrados a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4, ausência de função de TR4, expressão aberrante do ligando de TR4 ou ausência de função de ligando de TR4. Os anticorpos aqui descritos que não impedem o TR4 de ligar o seu ligando mas que inibem ou regulam negativamente a transdução de sinal de TR4 podem ser administrados a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4, ausência de função de TR4, expressão

aberrante do ligando de TR4 ou ausência de função de ligando de TR4. A aptidão de um anticorpo da invenção para melhorar, inibir, regular positivamente ou regular negativamente a transdução de sinal de TR4 pode ser determinada por técnicas aqui descritas ou, de outro modo, conhecidas na técnica. Por exemplo, a activação do receptor induzida por TRAIL e a activação de moléculas de sinalização podem ser determinadas detectando a associação de proteínas adaptadoras, tais como FADD e TRADD ao TR4, por imunoprecipitação seguida de análise por transferência de Western (por exemplo, como aqui descrito).

Além disso, os anticorpos da presente invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) que activam as actividades biológicas mediadas por TR4 (e. g., a indução de apoptose em células que expressam TR4) podem ser administrados a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4, ausência de função de TR4, expressão aberrante do ligando de TR4 ou ausência de função de ligando de TR4. Estes anticorpos podem potenciar ou activar todas ou um subconjunto das actividades biológicas do receptor de TRAIL, por exemplo, induzir uma alteração conformacional no receptor de TRAIL. Numa forma de realização específica, um anticorpo da presente invenção que aumenta a actividade de TR4 em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99%, pelo menos duas vezes, pelo menos três vezes, pelo menos quatro vezes, pelo menos cinco vezes, pelo menos dez vezes, pelo menos vinte vezes, pelo menos cinquenta vezes ou pelo menos cem

vezes relativamente à actividade de TR4 na ausência do anticorpo é administrado a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4, ausência de função de TR4, expressão aberrante do ligando de TR4 ou ausência de função de ligando de TR4. Noutra forma de realização, uma associação de anticorpos, uma associação de fragmentos de anticorpo, ou uma associação de anticorpos e fragmentos de anticorpo que aumentam a actividade de TR4 em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99%, pelo menos duas vezes, pelo menos três vezes, pelo menos quatro vezes, pelo menos cinco vezes, pelo menos dez vezes, pelo menos vinte vezes, pelo menos cinquenta vezes ou pelo menos cem vezes relativamente à actividade de TR4 na ausência dos referidos anticorpos e/ou fragmentos de anticorpo é administrada a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4 ou ausência de função de TR4 ou expressão aberrante do ligando de TR4 ou ausência de função de ligando de TR4.

Num caso específico, um anticorpo descrito aqui (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo ou variantes) que inibe ou regula negativamente, na totalidade ou em parte, a actividade de TR4 (e. g., estimulação da apoptose) em pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20%, ou pelo menos 10% relativamente à

actividade de TR4 na ausência do anticorpo é administrado a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4, função excessiva de TR4, expressão aberrante do ligando de TR4 ou função excessiva do ligando de TR4. Noutro caso, uma associação de anticorpos, uma associação de fragmentos de anticorpo, uma associação de variantes de anticorpo, ou uma associação de anticorpos, fragmentos de anticorpo e/ou variantes que inibe ou regula negativamente a actividade de TR4 em pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 65%, pelo menos 60%, pelo menos 55%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20%, ou pelo menos 10% relativamente à actividade de TR4 na ausência dos referidos anticorpos, fragmentos de anticorpo e/ou variantes de anticorpo, é administrada a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado à expressão aberrante de TR4, função excessiva de TR4, expressão aberrante do ligando de TR4 ou função excessiva do ligando de TR4.

Num caso, as composições terapêuticas ou farmacêuticas aqui descritas são administradas a um animal para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou distúrbio associado a apoptose aumentada incluindo, mas não estando limitado a, SIDA, distúrbios neurodegenerativos (tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, Esclerose lateral amiotrófica, Retinite pigmentosa, Degenerescência cerebelosa), síndromes mielodisplásicas (tal como anemia aplástica), lesão isquémica (tais como as provocadas por enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral e lesão por reperfusão), doença hepática induzida por toxina (tal como a provocada por álcool), choque séptico, caquexia e anorexia. Noutro caso, as composições terapêuticas ou farmacêuticas aqui

descritas são administradas a um animal para tratar, prevenir ou melhorar a insuficiência de medula óssea, por exemplo, anemia aplástica e síndrome mielodisplásica.

As composições terapêuticas ou farmacêuticas aqui descritas, podem ser também administradas para tratar, prevenir ou melhorar a rejeição de órgão ou a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) e/ou estados associados com aquelas. A rejeição de órgão ocorre por destruição do tecido transplantado pelas células imunitárias do hospedeiro através de uma resposta imunológica. Analogamente, uma resposta imunológica está também envolvida na GVHD, mas, neste caso, as células imunitárias transplantadas estanhas destroem os tecidos do hospedeiro. A morte celular induzida pelas funções efectoras das células imunitárias é a morte apoptótica. Assim, a administração dos anticorpos aqui descritos (e. g., aqueles que inibem a apoptose) pode ser uma terapia eficaz na prevenção da rejeição de órgão ou GVHD.

Noutra forma de realização, as composições terapêuticas ou farmacêuticas aqui descritas são administradas a um animal para tratar, prevenir ou melhorar doenças infecciosas. As doenças infecciosas incluem doenças associadas a infecções por leveduras, fúngicas, virais e bacterianas. Os vírus associados a infecções virais que podem ser tratadas ou prevenidas de acordo com esta invenção incluem, mas não estão limitados a, retrovírus (e. g., vírus linfotrópicos das células T humanas (HTLV) tipos I e II e vírus da imunodeficiência humana (HIV)), vírus do herpes (e. g., vírus simplex do herpes (HSV) tipos I e II, vírus Epstein-Barr, HHV6-HHV8 e citomegalovírus), arenavírus (e. g., vírus da febre de Lassa), paramixovírus (e. g., vírus Morbillivirus, vírus sincicial respiratório humano, papeira e

pneumovírus), adenovírus, bunivírus (e. g., hantavírus), coronavírus, filovírus (e. g., vírus do Ebola), flavivírus (e. g., vírus da hepatite C (HCV), vírus da febre amarela e vírus da encefalite Japonesa), hepadnavírus (e. g., vírus da hepatite B (HBV)), ortomixovírus (e. g., vírus da gripe A, B e C), papovavírus (e. g., papilomavírus), picornavírus (e. g., rinovírus, enterovírus e vírus da hepatite A), poxvírus, reovírus (e. g., rotavírus), togavírus (e. g., vírus da rubéola), rabdovírus (e. g., vírus da raiva). Os agentes patogénicos microbianos associados às infecções bacterianas incluem, mas não estão limitados a, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* (*Vibrio*) *fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema carateum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia* spp. e *Helicobacter pylori*.

Noutro caso, os anticorpos e composições de anticorpos aqui descritos são utilizados para tratar, prevenir ou melhorar doenças associadas a apoptose aumentada incluindo, mas não

estando limitadas a, SIDA, distúrbios neurodegenerativos (tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, Esclerose lateral amiotrófica, Retinite pigmentosa, Degenerescência cerebelosa), tumor cerebral ou doença associada a priões); distúrbios auto-imunes (tais como, esclerose múltipla, Artrite Reumatóide, síndrome de Sjogren, tiroidite de Hashimoto, cirrose biliar, doença de Behcet, doença de Crohn, polimiosite, lúpus eritematoso disseminado e glomerulonefrite e artrite reumatóide relacionado com imune) síndromes mielodisplásicas (tal como anemia aplástica), doença do enxerto contra o hospedeiro, lesão isquêmica (tal como as provocadas por enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral e lesão por reperfusão), lesão no fígado (e. g., hepatite relacionada com lesão no fígado, lesão por isquemia/reperfusão, colestose (lesão das vias biliares) e cancro do fígado); doença hepática induzida por toxina (tal como a provocada por álcool), choque séptico, caquexia e anorexia. Em casos preferidos, os anticorpos antagonistas anti-TR4 que impedem o TRAIL de ligar-se aos receptores de TRAIL, aos quais estão ligados os anticorpos, mas não transduzem o sinal biológico que resulta em apoptose) são utilizados para tratar as doenças e distúrbios listados acima.

Muitas das patologias associadas ao HIV são mediadas por apoptose, incluindo a nefropatia induzida pelo HIV e a encefalite de HIV. Assim, em casos preferidos adicionais, os anticorpos, de um modo preferido, anticorpos antagonistas anti-TR4, aqui descritos são utilizados para tratar a SIDA e patologias associadas à SIDA. É também aqui descrita a utilização de anticorpos para reduzir a morte de células T mediada por TRAIL em doentes infectados pelo HIV.

Em casos adicionais, os anticorpos aqui descritos, particularmente os anticorpos antagonistas anti-TR4, são administrados em associação com outros inibidores da apoptose de células T. Por exemplo, a apoptose mediada por Fas foi implicada na perda de células T em indivíduos com HIV (Katsikis *et al.*, J. Exp. Med. 181:2029-2036, 1995). Assim, um doente susceptível a morte de células T mediada pelo ligando de Fas e mediada por TRAIL pode ser tratado com um agente que bloqueia as interacções TRAIL/TR4 e um agente que bloqueia as interacções ligando de Fas/Fas. Os agentes adequados para bloquear a ligação do ligando de Fas a Fas incluem, mas não estão limitados a, polipéptidos de Fas solúveis; formas multiméricas de polipéptidos de Fas solúveis (e. g., dímeros de sFas/Fc); anticorpos anti-Fas que ligam o Fas sem transduzir o sinal biológico que resulta em apoptose; anticorpos anti-ligando de Fas que bloqueia a ligação do ligando de Fas a Fas; e muteínas do ligando de Fas que liga o Fas mas não transduzem o sinal biológico que resulta em apoptose. De um modo preferido, os anticorpos utilizados de acordo com este método são anticorpos monoclonais. Os exemplos de agentes adequados para bloquear as interacções ligando de Fas/Fas, incluindo anticorpos monoclonais anti-Fas de bloqueio, são descritos no Pedido internacional com o número de publicação WO 95/10540.

Os agentes adequados, que também bloqueiam a ligação de TRAIL a um TR4 que podem ser administrados com os anticorpos da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, polipéptidos de TR4 solúveis (e. g., uma forma solúvel de OPG, TR5 (Pedido internacional com o número de publicação WO 98/30693); uma forma solúvel de TR4 (Número de publicação internacional WO 98/32856); TR7/DR5 (Pedido internacional com o número de publicação WO 98/41629); e TR10 (Pedido internacional

com o número de publicação WO 98/54202)); formas multiméricas de polipéptidos de TR4 solúveis; e anticorpos contra TR4 que ligam o TR4 sem transduzir o sinal biológico que resulta em apoptose, anticorpos anti-TRAIL que bloqueiam a ligação de TRAIL a um ou mais receptores de TRAIL, e muteínas de TRAIL que ligam os receptores de TRAIL mas não transduzem o sinal biológico que resulta em apoptose.

Na rejeição de um aloenxerto, o sistema imunitário do animal destinatário não foi previamente condicionado a responder porque o sistema imunitário na maioria das vezes é apenas condicionado por antígenos ambientais. Os tecidos de outros membros da mesma espécie não foram apresentados do mesmo modo que foram apresentados, por exemplo, os vírus e bactérias. No caso de rejeição de aloenxerto, são concebidos regimes imunossuppressores para prevenir o sistema imunitário de atingir a fase efectora. No entanto, o perfil imune da rejeição de xenoenxerto pode assemelhar-se mais à recorrência de doença do que à rejeição de aloenxerto. No caso da recorrência de doença, o sistema imunitário já foi activado, como evidenciado pela destruição da células ilhéus nativas. Por conseguinte, na recorrência de doença o sistema imunitário já está na fase efectora. Os anticorpos da presente invenção (e. g., anticorpos agonistas da invenção) são capazes de suprimir a resposta imunológica a aloenxertos e xenoenxertos porque os linfócitos activados e diferenciados em células efectoras expressarão os polipéptidos de TR4 e, desse modo, são susceptíveis a compostos que melhoram a apoptose. Assim, a presente invenção proporciona ainda um método para produzir tecidos privilegiados em termos imunes. Os anticorpos antagonistas aqui descritos podem ser ainda utilizados no tratamento de Doença Inflamatória do Intestino.

Os anticorpos e composições de anticorpos da invenção podem ser úteis para o tratamento de doenças inflamatórias, tais como artrite reumatóide, osteoartrite, psoríase, septicemia e doença inflamatória do intestino.

Além disso, devido à expressão de polipéptidos de TR4 nos linfoblastos, os anticorpos e composições de anticorpos da invenção podem ser utilizados para tratar esta forma de cancro. Além disso, os anticorpos e composições de anticorpos da invenção podem ser utilizados para tratar várias formas de inflamação crónicas e agudas, tais como artrite reumatóide, osteoartrite, psoríase, septicemia e doença inflamatória do intestino.

Numa forma de realização, os anticorpos e composições de anticorpos da invenção podem ser utilizados para tratar distúrbios cardiovasculares, incluindo doença arterial periférica, tal como isquemia de membro.

Os distúrbios cardiovasculares incluem anomalias cardiovasculares, tais como fístula artério-arterial, fístula arteriovenosa, malformações arteriovenosas cerebrais, defeitos congénitos do coração, atresia pulmonar e Síndrome de Cimitarra. Os defeitos congénitos do coração incluem coarctação aórtica, coração triauricular, anomalias do vaso coronário, coração cruzado, dextrocardia, canal arterial persistente, anomalia de Ebstein, complexo de Eisenmenger, síndrome de hipoplasia do coração esquerdo, levocardia, tetralogia de Fallot, transposição dos grandes vasos, ventrículo direito com dupla saída, atresia da tricúspide, canal arterial persistente e defeitos do septo do coração, tais como defeito septal aortopulmonar, defeitos do

amortecedor endocárdico, Síndrome de Lutembacher, trilogia de Fallot, defeitos do septo ventricular.

Os distúrbios cardiovasculares incluem também doença cardíaca, tais como arritmias, doença cardíaca carcinóide, alto débito cardíaco, baixo débito cardíaco, tamponamento cardíaco, endocardite (incluindo bacteriana), aneurisma cardíaco, paragem cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, cardiomiopatia congestiva, dispneia paroxística, edema cardíaco, hipertrofia cardíaca, cardiomiopatia congestiva, hipertrofia ventricular esquerda, hipertrofia ventricular direita, ruptura cardíaca pós-enfarte, ruptura septal ventricular, doenças da válvula do coração, doenças do miocárdio, isquemia do miocárdio, derrame pericárdico, pericardite (incluindo constrictiva e tuberculosa), pneumopericárdio, síndrome pós-pericardiotomia, doença cardíaca pulmonar, doença cardíaca reumática, disfunção ventricular, hiperemia, complicações cardiovasculares na gravidez, Síndrome de Cimitarra, sífilis cardiovascular e tuberculose cardiovascular.

As arritmias incluem arritmia sinusal, fibrilação auricular, soro auricular, bradicardia, extra-sístoles, Síndrome de Adams-Stokes, bloqueio do ramo direito, bloqueio sinoauricular, síndrome de QT longo, para-sístoles, Síndrome de Lown-Ganong-Levine, síndrome de pré-excitação de tipo Mahaim, síndrome de Wolff-Parkinson-White, síndrome do seio doente, taquicardias e fibrilação ventricular. As taquicardias incluem taquicardia paroxística, taquicardia supraventricular, ritmo idioventricular acelerado, taquicardia por reentrada nodal atrioventricular, taquicardia auricular ectópica, taquicardia juncional ectópica, taquicardia por reentrada nodal

sinoauricular, taquicardia sinusal, Torsades de Pointes e taquicardia ventricular.

As doenças da válvula do coração incluem insuficiência da válvula aórtica, estenose da válvula aórtica, murmúrios, prolapso da válvula aórtica, prolapso da válvula mitral, prolapso da válvula tricúspide, insuficiência da válvula mitral, estenose da válvula mitral, atresia pulmonar, insuficiência da válvula pulmonar, estenose da válvula pulmonar, atresia tricúspide, insuficiência da válvula tricúspide e estenose da válvula tricúspide.

As doenças do miocárdio incluem cardiomiopatia alcoólica, cardiomiopatia congestiva, cardiomiopatia hipertrófica, estenose subvalvular aórtica, estenose subvalvular pulmonar, cardiomiopatia restritiva, cardiomiopatia de Chagas, fibroelastose cardíaca, fibrose endomiocárdica, Síndrome de Kearns, lesão por reperfusão do miocárdio e miocardite.

As isquemias do miocárdio incluem doença coronária, tais como angina de peito, aneurisma coronário, arteriosclerose coronária, trombose coronária, vasospasmo coronário, enfarte do miocárdio e atordoamento do miocárdio.

As doenças cardiovasculares incluem também doenças vasculares, tais como aneurismas, angiodisplasia, angiotomatose, angiotomatose bacilar, Doença de Hippel-Lindau, Síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber, Síndrome de Sturge-Weber, edema angioneurótico, doenças aórticas, arterite de Takayasu, aortite, Síndrome de Leriche, doenças oclusivas arteriais, arterite, enarterite, poliarterite nodosa, distúrbios cerebrovasculares, angiopatias diabéticas, retinopatia diabética, embolias,

trombose, eritromelalgia, hemorróides, doença veno-oclusiva hepática, hipertensão, hipotensão, isquemia, doenças vasculares periféricas, flebite, doença veno-oclusiva pulmonar, doença de Raynaud, síndrome de CREST, oclusão da veia retiniana, síndrome de Cimitarra, síndrome da veia cava superior, telangiectasia, ataxia telangiectasia, telangiectasia hemorrágica hereditária, varicocèle, varizes, úlcera varicosa, vasculite e insuficiência venosa.

Os aneurismas incluem aneurismas intramurais, falsos aneurismas, aneurismas infectados, aneurismas com ruptura, aneurismas aórticos, aneurismas cerebrais, aneurismas coronários, aneurismas cardíacos e aneurismas ilíacos.

As doenças oclusivas arteriais incluem arteriosclerose, claudicação intermitente, estenose da carótida, displasias fibromusculares, oclusão vascular mesentérica, doença de Moyamoya, obstrução da artéria renal, oclusão da artéria retiniana e tromboangeíte obliterante.

Os distúrbios cerebrovasculares incluem doenças da artéria carótida, angiopatia amilóide cerebral, aneurisma cerebral, anoxia cerebral, arteriosclerose cerebral, malformação arteriovenosa cerebral, doenças da artéria cerebral, embolia e trombose cerebral, trombose da carótida, trombose sinusal, síndrome de Wallenberg, hemorragia cerebral, hematoma epidural, hematoma subdural, hemorragia subaracnoideia, enfarte cerebral, isquemia cerebral (incluindo transitória), síndrome subclaviana, leucomalácia periventricular, dor de cabeça vascular, cefaleia em salvas, enxaqueca e insuficiência vertebrobasilar.

As embolias incluem embolias aéreas, embolias do líquido amniótico, embolias de colesterol, síndrome do dedo do pé azul, embolias gordas, embolias pulmonares e tromboembolias. As tromboses incluem trombose coronária, trombose da veia hepática, oclusão da veia retiniana, trombose da artéria carótida, trombose sinusal, síndrome de Wallenberg e tromboflebite.

A isquemia inclui isquemia cerebral, colite isquémica, síndromes do compartimento, síndrome do compartimento anterior, isquemia do miocárdio, lesões de reperfusão e isquemia de membro periférico. A vasculite inclui aortite, arterite, Síndrome de Behcet, síndrome de Churg-Strauss, síndrome do gânglio linfático mucocutâneo, tromboangeíte obliterante, vasculite de hipersensibilidade, púrpura de Schoenlein-Henoch, vasculite cutânea alérgica e granulomatose de Wegener.

Num caso, os anticorpos e composições de anticorpos aqui descritos são utilizados para tratar microangiopatias trombóticas. Um distúrbio desse tipo é púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) (Kwaan, H.C., *Semin. Hematol.* 24:71 (1987); Thompson *et al.*, *Blood* 80:1890 (1992)). Têm sido relatadas taxas de mortalidade associadas a TTP crescentes pelos Centros de Controlo de Doenças Dos E.U.A. (Torok *et al.*, *Am. J. Hematol.* 50:84 (1995)). O plasma de doentes que sofrem de TTP (incluindo doentes com HIV+ e HIV-) induz a apoptose de células endoteliais humanas de origem microvascular dérmica, mas não com origem em grandes vasos (Laurence *et al.*, *Blood* 87:3245 (1996)). Deste modo, pensa-se que o plasma de doentes com TTP contém um ou mais factores que induzem directa ou indirectamente a apoptose. Como descrito no Pedido de patente internacional número WO 97/01715, o TRAIL está presente no soro de doentes com TTP e é provável que desempenhe um papel na indução de apoptose de células

endoteliais microvasculares. Outra microangiopatia trombótica é a síndrome hemolítica-urémica (HUS) (Moake, J.L., Lancet, 343:393 (1994); Melnyk *et al.*, (Arch. Intern. Med., 155:2077 (1995); Thompson *et al.*, *supra*). Assim, num caso, os anticorpos e composições de anticorpos aqui descritos são utilizados para tratar o estado que é frequentemente referido como "HUS do adulto" (ainda que possa também atingir crianças). Um distúrbio conhecido como HUS da infância/associada a diarreia difere na etiologia da HUS do adulto. Noutro caso, estados caracterizados pela coagulação de pequenos vasos sanguíneos podem ser tratados utilizando os anticorpos e composições de anticorpos aqui descritos. Tais estados incluem, mas não estão limitados aos aqui descritos. Por exemplo, pensa-se que os problemas cardíacos observados em cerca de 5-10% dos doentes pediátricos com SIDA envolvem a coagulação de pequenos vasos sanguíneos. O colapso da microvasculatura do coração tem sido relatada em doentes com esclerose múltipla. Como um outro exemplo, é considerado o tratamento de lúpus eritematoso disseminado (SLE). Num caso, os anticorpos e composições de anticorpos aqui descritos, de um modo preferido, os anticorpos antagonistas anti-TR4 aqui descritos, podem ser administrados *in vivo* a um doente que sofre de uma microangiopatia trombótica. Assim, é aqui descrito um método de tratamento de uma microangiopatia trombótica, que envolve a utilização de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou composição de anticorpos aqui descrito.

Os anticorpos e composições de anticorpos da invenção podem ser utilizados em associação com outros agentes úteis no tratamento de um distúrbio particular. Por exemplo, num estudo *in vitro* descrito por Laurence *et al.* (Blood 87:3245 (1996)) foi conseguida alguma redução da apoptose mediada pelo plasma de TTP de células endoteliais microvasculares utilizando um anticorpo

bloqueador anti-Fas, ácido aurintricarboxílico ou plasma normal empobrecido em crioprecipitados. Assim, um doente pode ser tratado com um anticorpo ou composição de anticorpos da invenção em associação com um agente que inibe a apoptose mediada pelo ligando de Fas de células endoteliais, tal como, por exemplo, um agente descrito acima. Numa forma de realização, os anticorpos da invenção e um anticorpo bloqueadores anti-FAS são ambos administrados a um doente que sofre de um distúrbio caracterizado por microangiopatia trombótica, tais como TTP ou HUS. Os exemplos de anticorpos monoclonais bloqueadores dirigidos contra o antígeno de Fas (CD95) são descritos na Publicação de pedido de patente internacional número WO 95/10540.

O equilíbrio natural entre estimuladores e inibidores endógenos da angiogénese é aquele em que predomina a influência do inibidor (Rastinejad et al., Cell 56:345-355 (1989)). Nos casos raros em que ocorre neovascularização em condições fisiológicas normais, tais como na cicatrização de feridas, regeneração de órgãos, desenvolvimento embrionário e processos reprodutores femininos, a angiogénese é rigorosamente regulado, e espacial e temporariamente delimitada. Em condições de angiogénese patológica, tal como as que caracterizam o crescimento de tumores sólidos, estes controlos reguladores falham. A angiogénese desregulada torna-se patológica e sustenta a progressão de muitas doenças neoplásicas e não neoplásicas. Um número de doenças graves é dominado por neovascularização anormal incluindo o crescimento e metástase de tumores sólidos, artrite, alguns tipos de distúrbios do olho e psoríase. Ver, e. g., as revisões por Moses et al., Biotech. 9:710-714 (1991); Folkman et al., N. Engl. J. Med., 353:1757-1771 (1995); Auerbach et al., J. Microvasc. Res. 29:401-411 (1985); Folkman, Advances

in Cancer Research, eds. Klein e Weinhouse, Academic Press, New York, pp. 175-203 (1985); Patz, Am. J. Ophthalmol. 94:715-743 (1982); e Folkman *et al.*, Science 221:719-725 (1983). Num número de estados patológicos, o processo de angiogénese contribui para o estado patológico. Por exemplo, acumularam-se dados significativos que sugerem que o crescimento de tumores sólidos é dependente da angiogénese. Folkman e Klagsbrun, Science 235:442-447 (1987).

A presente invenção proporciona o tratamento de doenças ou distúrbios associados a neovascularização por administração de um anticorpo ou composições de anticorpos da invenção. As condições malignas e metastáticas que podem ser tratadas com os polinucleótidos e polipéptidos da invenção incluem, mas não estão limitados às malignidades, tumores sólidos e cânceros aqui descritos e, de outro modo, conhecidos na técnica (para uma revisão sobre tais distúrbios, ver Fishman *et al.*, Medicine, 2ª Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1985)).

Adicionalmente, os distúrbios oculares associados a neovascularização que podem ser tratados com um anticorpo ou composição de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a: glaucoma neovascular, retinopatia diabética, retinoblastoma, fibroplasia retrolenticular, uveíte, retinopatia da prematuridade degenerescência macular, neovascularização de enxerto corneano, bem como outras doenças oculares inflamatórias, tumores oculares e doenças associadas a neovascularização da coróide ou íris. Ver, e. g., as revisões por Waltman *et al.*, Am. J. Ophthalmol. 85:704-710 (1978) e Gartner *et al.*, Surv. Ophthalmol. 22:291-312 (1978).

Adicionalmente, os distúrbios que podem ser tratados com um anticorpo ou composição de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, hemangioma, artrite, psoríase, angiofibroma, placas ateroscleróticas, cicatrização de feridas retardada, granulações, articulações hemofílicas, cicatrizes hipertróficas, fracturas não aderentes, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogénico, esclerodermia, tracoma e adesões vasculares.

Os anticorpos e composições de anticorpos da invenção são úteis no diagnóstico e tratamento ou prevenção de uma grande gama de doenças e/ou estados. Tais doenças e estados incluem, mas não estão limitados a, cancro (e. g., cancros relacionados com as células imunitárias, cancro da mama, cancro da próstata, cancro do ovário, linfoma folicular, cancro associada a mutação ou alteração de p53, tumor cerebral, cancro da bexiga, cancro cérvico-uterino, cancro do cólon, cancro colorrectal, carcinoma das células não pequenas do pulmão, carcinoma das células pequenas do pulmão, cancro do estômago, etc.), distúrbios linfoproliferativos (e. g., linfadenopatia), infecção microbiana (e. g., viral, bacteriana, etc.) (e. g., infecção por HIV-1, infecção por HIV-2, infecção pelo vírus do herpes (incluindo, mas não estando limitada a, HSV-1, HSV-2, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, EBV), infecção por adenovírus, infecção por poxvírus, infecção pelo vírus do papiloma humano, infecção por hepatite (e. g., HAV, HBV, HCV, etc.), infecção por *Helicobacter pylori*, *Staphylococcia* invasiva, etc.), infecção parasitária, nefrite, doenças ósseas (e. g., osteoporose), aterosclerose, dor, distúrbios cardiovasculares (e. g., neovascularização, hipovascularização ou circulação reduzida (e. g., doença isquémica (e. g., enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral, etc.))), SIDA, alergia, inflamação, doença

neurodegenerativa (e. g., doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, retinite pigmentar, degenerescência cerebelosa, etc.), rejeição de enxerto (aguda e crónica), doença do enxerto contra o hospedeiro, doenças devido a osteomielodisplasia (e. g., anemia aplástica, etc.), destruição do tecido da articulação no reumatismo, doença hepática (e. g., hepatite aguda e crónica, lesão hepática e cirrose), doenças auto-imunes (e. g., esclerose múltipla, artrite reumatóide, lúpus eritematoso disseminado, síndrome linfoproliferativa auto-imune (ALPS), glomerulonefrite complexa imune, diabetes auto-imune, púrpura trombocitopénica auto-imune, doença de Grave, tiroidite de Hashimoto, etc.), cardiomiopatia (e. g., cardiomiopatia dilatada), diabetes, complicações diabéticas (e. g., nefropatia diabética, neuropatia diabética, retinopatia diabética), gripe, asma, psoríase, glomerulonefrite, choque séptico e colite ulcerosa.

Os anticorpos e composições de anticorpos da invenção são úteis na promoção da angiogénese, cicatrização de feridas (e. g., feridas, queimaduras e fracturas ósseas).

Os anticorpos e composições de anticorpos da invenção também são úteis como um adjuvante para melhorar a sensibilidade imune a antígenos específicos, tal como nas respostas imunológicas antivirais.

Mais geralmente, os anticorpos e composições de anticorpos da invenção são úteis na regulação (i. e., aumento ou redução) da resposta imunológica. Por exemplo, os anticorpos e composições de anticorpos da invenção podem ser úteis na preparação ou recuperação de cirurgia, traumatismo, terapia de radiação, quimioterapia e transplante, ou pode ser utilizado

para reforçar a resposta imunológica e/ou a recuperação em idosos e indivíduos imunocomprometidos. Alternativamente, os anticorpos e composições de anticorpos da invenção são úteis como agentes imunossuppressores, por exemplo, no tratamento ou prevenção de distúrbios auto-imunes. Em formas de realização específicas, os anticorpos e composições de anticorpos da invenção são utilizados para tratar ou prevenir estados inflamatórios, alérgicos ou auto-imunes crónicos, tais como aqueles aqui descritos ou conhecidos, de outro modo, na técnica.

Composições Terapêuticas/Profilácticas e Administração

A invenção proporciona tratamento, inibição e profilaxia através da administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz do anticorpo (ou o seu fragmento) ou composição farmacêutica da invenção, de um modo preferido um anticorpo da invenção. Num aspecto preferido, um anticorpo ou o seu fragmento está substancialmente purificado (*i. e.*, substancialmente isento de substâncias que limitam o seu efeito ou produzem efeitos secundários indesejados). O indivíduo é, de um modo preferido, um animal, incluindo mas não estando limitado a, animais tais como vacas, porcos, cavalos, galinhas, gatos, cães, etc., e é, de um modo preferido, um mamífero e, de um modo muito preferido, um humano.

As formulações e métodos de administração que podem ser utilizados quando o composto compreende um ácido nucleico ou uma imunoglobulina são descritos acima; as formulações e vias de administração apropriadas adicionais podem ser seleccionadas de entre aquelas descritas aqui abaixo.

São conhecidos vários sistemas de administração e podem ser utilizados para administrar o anticorpo ou o seu fragmento da invenção, e. g., encapsulamento em lipossomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar o anticorpo ou fragmento de anticorpo, endocitose mediada pelo receptor (ver, e. g., Wu e Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construção de um ácido nucleico como parte de um vector retroviral ou outro, etc. Os métodos de introdução incluem, mas não estão limitados às vias intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, epidural e oral. As composições podem ser administradas por qualquer via conveniente, por exemplo, por infusão ou injeção bolus, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (e. g., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) e podem ser administradas em conjunto com outros agentes biologicamente activos. A administração pode ser sistémico ou local. Além disso, pode ser desejável introduzir as composições farmacêuticas da invenção no sistema nervoso central por qualquer via adequada, incluindo injeção intraventricular e intratecal; a injeção intraventricular pode ser facilitada por um cateter intraventricular, por exemplo, ligado a um reservatório, tal como um reservatório de Ommaya. Pode ser também utilizada a administração pulmonar, e. g., através da utilização de um inalador ou nebulizador, e formulação com um agente de formação de aerossóis.

Numa forma de realização específica, pode ser desejável administrar as composições farmacêuticas da invenção localmente na área necessitada de tratamento; isto pode ser conseguido, por exemplo, e não a título limitativo, por infusão local durante cirurgia, aplicação tópica, e. g., em conjunto com um penso após cirurgia, por injeção, por meio de um cateter, por meio de um

supositório ou por meio de um implante, sendo o referido implante de um material poroso, não poroso ou gelatinoso, incluindo membranas, tais como membranas sialásticas, ou fibras. De um modo preferido, quando se administra uma proteína, incluindo um anticorpo, da invenção, tem de se ter o cuidado de utilizar materiais aos quais a proteína não absorva.

Noutra forma de realização, a composição pode ser administrada numa vesícula, em particular, um lipossoma (ver Langer, *Science* 249:1527-1535 (1990); Treat *et al.*, em *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein e Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; ver geralmente *ibid.*).

Ainda noutra forma de realização, a composição pode ser administrada num sistema de libertação controlada. Numa forma de realização, pode ser utilizada uma bomba (ver Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). Noutra forma de realização, podem ser utilizados materiais poliméricos (ver *Medical Applications of Controlled Release*, Langer e Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen e Ball (eds.), Wiley, Nova Iorque (1984); Ranger e Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:71 (1983); ver também Levy *et al.*, *Science* 228:190 (1985); Durante *et al.*, *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard *et al.*, *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)). Ainda noutra forma de realização, um sistema de libertação controlada pode ser colocado na proximidade do alvo terapêutico, *i. e.*, o cérebro, requerendo assim apenas uma fracção da dose sistémica (ver, *e. g.*, Goodson,

em Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Outros sistemas de libertação controlada são discutidos na revisão de Langer (Science 249:1527-1535 (1990)).

Numa forma de realização específica sempre que a composição da invenção é um ácido nucleico que codifica uma proteína, o ácido nucleico pode ser administrado *in vivo* para promover a expressão da sua proteína codificada, construindo-o como parte de um vector de expressão de ácido nucleico apropriado e administrando-o de modo que se torne intracelular, e. g., utilizando um vector retroviral (ver Patente U.S. nº 4980286), ou por injeção directa ou utilizando bombardeamento com micropartículas (e. g., uma arma de genes; Biolistic, Dupont), ou revestindo com lípidos ou receptores da superfície celular ou agentes de transfecção, ou administrando-o em ligação com um péptido semelhante a homeobox que se sabe que entra no núcleo (ver e. g., Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 88:1864-1868 (1991)), etc. Alternativamente, um ácido nucleico pode ser introduzido intracelularmente e incorporado no ADN da célula hospedeira para expressão, por recombinação homóloga.

A presente invenção proporciona também composições farmacêuticas. Tais composições compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou um seu fragmento, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização específica, a expressão "farmacêuticamente aceitável" significa aprovado por uma entidade reguladora do governo Federal ou de um estado, ou listado na U.S. Pharmacopeia ou outra farmacopeia geralmente reconhecida, para ser utilizado em animais e, mais particularmente, em humanos. O termo " veículo " refere-se a um

diluyente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual o agente terapêutico é administrado. Tais veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tais como água e óleos, incluindo aqueles de origem petrolífera, animal, vegetal ou sintética, tais como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de sésamo e semelhantes. A água é um veículo preferido quando a composição farmacêutica é administrada por via intravenosa. As soluções salinas e soluções aquosas de dextrose e glicerol podem ser também utilizadas como veículos líquidos, particularmente para soluções injectáveis. Os excipientes farmacêuticos adequados incluem amido, glucose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, cré, sílica gel, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado em pó, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e semelhantes. Se desejado, a composição pode conter também quantidades mais pequenas de humectantes ou emulsionantes, ou agentes tampão de pH. Estas composições podem tomar a forma de soluções, suspensões, emulsão, comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, formulações de libertação prolongada e semelhantes. A composição pode ser formulada como um supositório, com aglutinantes e veículos tradicionais tais como triglicéridos. A formulação oral pode incluir veículos correntes tais como os tipos farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, etc. Os exemplos de veículos farmacêuticos adequados são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tais composições conterão uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou o seu fragmento, de um modo preferido na forma purificada, em conjunto com uma quantidade adequada de veículo de modo a proporcionar a forma para administração apropriada ao doente. A formulação deve adequar-se ao modo de administração.

Numa forma de realização preferida, a composição é formulada de acordo com procedimentos de rotina como uma composição farmacêutica adaptada para administração intravenosa em humanos. Tipicamente, as composições para administração intravenosa são soluções em tampão aquoso isotónico estéril. Se necessário, a composição pode incluir também um solubilizante e um anestésico local, tal como lidocaína, para aliviar a dor no sítio da injeção. Em geral, os ingredientes são fornecidos separadamente ou misturados em conjunto numa forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou concentrado isento de água num recipiente selado hermeticamente, tal como uma ampola ou saqueta indicando a quantidade de agente activo. Sempre que a composição é para ser administrada por infusão, ela pode ser fornecida com um frasco de infusão contendo água ou soro fisiológico de tipo farmacêutico, estéril. Sempre que a composição é administrada por injeção pode ser proporcionada uma ampola de água estéril para preparação injectável ou soro fisiológico para que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

As composições da invenção podem ser formuladas como formas neutras ou salinas. Os sais farmacêuticamente aceitáveis incluem aqueles preparados com aniões, tais como os derivados dos ácidos clorídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., e aqueles preparados com catiões, tais como os derivados de sódio, potássio, amónio, cálcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

A quantidade da composição da invenção que será eficaz no tratamento, inibição e prevenção de uma doença ou distúrbio associado à expressão e/ou actividade aberrante de um polipéptido da invenção, pode ser determinada por técnicas

clínicas correntes. Além disso, pode opcionalmente utilizar-se ensaios *in vitro* para ajudar a identificar gamas de dosagem óptima. A dose exacta a ser utilizada na formulação dependerá também da via de administração e da gravidade da doença ou distúrbio, e deve ser decidida de acordo com a avaliação crítica do praticante e as circunstâncias de cada doente. As doses eficazes podem ser extrapoladas de curvas dose-resposta derivadas de sistemas de ensaio *in vitro* ou em modelo animal.

Para os anticorpos, a dosagem administrada a um doente é tipicamente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg do peso corporal do doente. De um modo preferido, a dosagem administrada a um doente é entre 0,1 mg/kg e 20 mg/kg do peso corporal do doente, de um modo mais preferido 1 mg/kg a 10 mg/kg do peso corporal do doente. Em geral, os anticorpos humanos têm uma semivida maior no corpo humano do que os anticorpos de outra espécie devido à resposta imunológica a polipéptidos estranhos. Assim, são frequentemente possíveis dosagens inferiores e administrações menos frequentes de anticorpos humanos. Além disso, a dosagem e frequência de administração das composições terapêuticas ou farmacêuticas da invenção podem ser reduzidas melhorando a captação e penetração no tecido (e. g., no cérebro) dos anticorpos por modificações tal como, por exemplo, lipidação.

Em geral é preferida a administração de produtos com origem numa espécie ou reactividade de uma espécie (no caso de anticorpos) que é a mesma espécie que a do doente. Deste modo, numa forma de realização preferida, são administrados anticorpos, fragmentos ou ácidos nucleicos humanos a um humano doente para terapia ou profilaxia.

É preferível utilizar anticorpos de inibição e/ou neutralizantes da invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) de alta afinidade e/ou potentes *in vivo*, que se ligam imunoespecificamente a TR4, ou polinucleótidos que codificam anticorpos que se ligam imunoespecificamente a TR4, para os imunoensaios e a terapia de distúrbios relacionados com polinucleótidos ou polipéptidos de TR4, incluindo os seus fragmentos. Tais anticorpos terão, de um modo preferido, uma afinidade para o TR4 e/ou fragmentos polipeptídicos de TR4. As afinidades de ligação preferidas incluem aquelas com uma constante de dissociação ou K_D inferior ou igual a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M ou 10^{-5} M. De um modo mais preferido, os anticorpos da invenção ligam os polipéptidos de TR4 ou os seus fragmentos ou variantes com uma constante de dissociação ou K_D inferior ou igual a 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M ou 10^{-8} M. De um modo ainda mais preferido, os anticorpos da invenção ligam os polipéptidos de TR4 ou seus fragmentos ou variantes com uma constante de dissociação ou K_D inferior ou igual a 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M ou 10^{-15} M. Numa forma de realização preferida, os anticorpos da invenção induzem a apoptose de células que expressam TR4.

Como discutido em mais pormenor abaixo, os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados sozinhos ou em associação com outras composições. Os anticorpos podem ser ainda fundidos de modo recombinante com um polipéptido heterólogo na extremidade N- ou C-terminal ou conjugados quimicamente (incluindo conjugações covalentes e não covalentes) com

polipéptidos ou outras composições. Por exemplo, os anticorpos da presente invenção podem ser fundidos de modo recombinante ou conjugados com moléculas úteis como etiquetas em ensaios de detecção e com moléculas efectoras, tais como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionuclídeos ou toxinas. Ver, e. g., publicações PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patente U.S. nº 5314995; e documento EP 396387.

O anticorpo e as composições de anticorpos da invenção podem ser administrados sozinhos ou em associação com outros agentes terapêuticos, incluindo mas não estando limitados a agentes quimioterapêuticos, antibióticos, antivirais, agentes anti-retrovirais, anti-inflamatórios esteróides e não esteróides, agentes imunoterapêuticos convencionais e citocinas. As associações podem ser administradas simultaneamente, e. g., como uma mistura, separadamente mas simultaneamente ou concomitantemente; ou sequencialmente. Isto inclui apresentações nas quais os agentes associados são administrados em conjunto como uma mistura terapêutica e também procedimentos nos quais os agentes associados são administrados separadamente mas simultaneamente, e. g., através de linhas intravenosas separadas no mesmo indivíduo. A administração "em associação" inclui ainda a administração separada de um dos compostos ou agentes dado em primeiro lugar, seguido do segundo.

Terapias de Associação com anticorpos anti-TR4, TRAIL e/ou Agentes Quimioterapêuticos

Os anticorpos anti-TR4 podem ser administrados em associação com outros anticorpos anti-TR4, TRAIL e/ou agentes quimioterapêuticos.

Em formas de realização específicas, um anticorpo da invenção que se liga especificamente a TR4 é utilizado ou administrado em associação com um segundo anticorpo que se liga especificamente a TR7. Noutra forma de realização, os anticorpos específicos para TR4 e TR7 são anticorpos agonistas que induzem a apoptose de células que expressam o TR4 (e. g., células que expressam TR4 e TR7). Numa forma de realização específica, a associação de tratamento anti-TR4 e tratamento anti-TR7 induz mais apoptose nas células que expressam TR4 e TR7 do que o tratamento com anticorpo anti-TR4 ou o tratamento com anticorpo anti-TR7 sozinho. Os anticorpos anti-TR4 e anti-TR7 podem ser administrados simultaneamente, sequencialmente ou numa combinação de administração simultânea ou sequencial ao longo do regime de dosagem. Noutra forma de realização, os anticorpos anti-TR4 e anti-TR7 específicos são utilizados ou administrados em associação com um fármaco quimioterapêutico, tal como aqueles aqui descritos (ver, por exemplo, abaixo e Exemplo 4). Numa forma de realização particular, a indução sinérgica de apoptose que resulta do tratamento com os anticorpos anti-TR4 e anti-TR7 é mais evidente ou mais pronunciada quando os anticorpos anti-TR4 e anti-TR7 são utilizados ou administrados em associação com um agente quimioterapêutico e/ou um reagente de reticulação.

Numa forma de realização preferida, as composições da invenção são administradas em associação com um agente quimioterapêutico. Os agentes quimioterapêuticos que podem ser administrados com as composições da invenção incluem, mas não estão limitados a, derivados de antibióticos (e. g., doxorubicina (adriamicina), bleomicina, daunorubicina, e dactinomicina); antiestrogénios (e. g., tamoxifeno); antimetabolitos (e. g., fluorouracilo, 5-FU, metotrexato,

floxuridina, interferão alfa-2b, ácido glutâmico, plicamicina, mercaptopurina e 6-tioguanina); agentes citotóxicos (e. g., carmustina, BCNU, lomustina, CCNU, citosina arabinósida, ciclofosfamida, estramustina, hidroxiureia, procarbazona, mitomicina, bussulfano, cis-platina e sulfato de vincristina); hormonas (e. g., medroxiprogesterona, fosfato sódico de estramustina, etinilestradiol, estradiol, acetato de megestrol, metiltestosterona, difosfato de dietilestilbestrol, clorotrianiseno e testolactona); derivados de mostarda de azoto (e. g., melfalano, clorambucil, mecloretamina (mostarda de azoto) e tiotepa); esteróides e associações (e. g., fosfato de sódico de betametasona); e outros (e. g., dicarbazona, asparaginase, mitotano, sulfato de vincristina, sulfato de vinblastina, etoposido, Topotecano, 5-Fluorouracilo, paclitaxel (Taxol), Cisplatina, Citarabina, e IFN-gama, irinotecano (Camptosar, CPT-11), análogos de irinotecano e gencitabina (GEMZAR™)).

Numa forma de realização específica, o anticorpo e composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, e prednisona) ou qualquer combinação dos componentes de CHOP. Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com Rituximab. Numa outra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados com Rituximab e CHOP, ou Rituximab e qualquer combinação dos componentes de CHOP.

Em formas de realização preferidas adicionais, as composições da invenção são administradas em associação com

polipéptidos de TRAIL ou os seus fragmentos ou variantes, particularmente do domínio extracelular solúvel de TRAIL.

Numa forma de realização, as composições da invenção são administradas em associação com outros membros da família de TNF ou anticorpos específicos para membros da família dos receptores de TNF. As moléculas de TNF, relacionadas com TNF ou semelhantes a TNF que podem ser administradas com as composições da invenção incluem, mas não estão limitadas às formas solúveis de TNF-alfa, linfotoxina-alfa (LT-alfa, também conhecida como TNF-beta), LT-beta (presente no heterotrímero complexo LT-alfa2-beta), OPGL, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF-gama (Publicação Internacional nº WO 96/14328), TRAIL, AIM-II (Publicação Internacional nº WO 97/34911), APRIL (J. Exp. Med. 188(6):1185-1190), endocina-alfa (Publicação Internacional nº WO 98/07880), TR6 (Publicação Internacional nº WO 98/30694), OPG e neutrocina-alfa (Publicação Internacional nº WO 98/18921, OX40, e o factor de crescimento de tecido nervoso (NGF), e formas solúveis de Fas, CD30, CD27, CD40 e 4-1BB, TR2 (Publicação Internacional nº WO 96/34095), DR3 (Publicação Internacional nº WO 97/35904), TR5 (Publicação Internacional nº WO 98/30693), TR6 (Publicação Internacional nº WO 98/30694), TR7 (Publicação Internacional nº WO 98/41629), TRANK, TR9 (Publicação Internacional nº WO 98/56892), TR10 (Publicação Internacional nº WO 98/54202), 312C2 (Publicação Internacional nº WO 98/06842) e TR12, e formas solúveis de CD154, CD70, e CD153.

Terapias de Associação Adicionais

Numa forma de realização mais preferida, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um antimalárico, metotrexato, anticorpo anti-TNF, ENBREL™ e/ou sulfassalazina. Numa forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com metotrexato. Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com anticorpo anti-TNF. Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com metotrexato e anticorpo anti-TNF. Noutra forma de realização, o anticorpo e composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com sulfassalazina. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com metotrexato, anticorpo anti-TNF e sulfassalazina. Noutra forma de realização, o anticorpo e composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com ENBREL™. Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com ENBREL™ e metotrexato. Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com ENBREL™, metotrexato e sulfassalazina. Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com ENBREL™, metotrexato e sulfassalazina. Noutras formas de realização, um ou mais antimaláricos são combinados com uma das associações especificadas acima. Numa forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um antimalárico (e. g.,

hidroxicloroquina), ENBREL™, metotrexato e sulfassalazina. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um antimalárico (e. g., hidroxiclorocina), sulfassalazina, anticorpo anti-TNF e metotrexato.

Os anticorpos da invenção (incluindo moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo) podem ser administrados sozinhos ou em associação com outros regimes terapêuticos ou profilácticos (e. g., terapia de radiação, quimioterapia, terapia hormonal, imunoterapia, agentes antitumorais, agentes antiangiogénese e anti-inflamatórios). Tais terapias combinatórias podem ser administradas sequencialmente e/ou simultaneamente.

Os agentes imunossuppressores não específicos convencionais, que podem ser administrados em associação com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, esteróides, ciclosporina, análogos de ciclosporina, ciclofosfamida, ciclofosfamida IV, metilprednisolona, prednisolona, azatioprina, FK-506, 15-desoxispergualina e outros agentes imunossuppressores que actuam suprimindo a função das células T responsivas.

Em formas de realização específicas, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com imunossuppressores. As preparações imunossuppressoras que podem ser administradas com o anticorpo e composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitadas a, ORTHOCLONE™ (OKT3), SANDIMMUNE™/NEORAL™/SANGDYA™ (ciclosporina), PROGRAF™ (tacrolímus), CELLCEPT™ (micofenolato), Azatioprina, glucorticosteróides e RAPAMUNE™ (sirolímus). Numa

forma de realização específica, os imunossupressores podem ser utilizados para prevenir a rejeição de transplante de órgão ou medula óssea.

Numa forma de realização preferida, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com terapia de esteróides. Os esteróides que podem ser administrados em associação com o anticorpo e composições de anticorpos da invenção, incluem, mas não estão limitados a, corticosteróides orais, prednisona e metilprednisolona (e. g., metilprednisolona IV). Numa forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com prednisona. Numa outra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com prednisona e um agente imunossupressor. Os agentes imunossupressores que podem ser administrados com o anticorpo e composições de anticorpos da invenção e prednisona são aqueles aqui descritos, e incluem, mas não estão limitados a, azatioprina, cilofosfamida e ciclofosfamida IV. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com metilprednisolona. Numa outra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com metilprednisolona e um agente imunossupressor. Os agentes imunossupressores que podem ser administrados com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção e metilprednisolona são aqueles aqui descritos, e incluem, mas não estão limitados a, azatioprina, ciclofosfamida e ciclofosfamida IV.

A invenção abrange também a associação dos polinucleótidos e/ou polipéptidos da invenção (e/ou agonistas ou antagonistas dos mesmos) com outras terapias hematopoiéticas propostas ou convencionais. Assim, por exemplo, os polinucleótidos e/ou polipéptidos da invenção (e/ou agonistas ou antagonistas dos mesmos) podem ser combinados com compostos que exibem isoladamente efeitos estimuladores eritropoiéticos, tais como eritropoietina, testosterona, estimuladores de células progenitoras, factor de crescimento análogo a insulina, prostaglandinas, serotonina, AMP cíclico, prolactina e triiodotizonina. São também abrangidas associações do anticorpo e composições de anticorpos da invenção com compostos geralmente utilizados para tratar anemia aplástica, tais como, por exemplo, metenoleno, estanozolol e nandrolona; para tratar anemia por deficiência de ferro, tais como, por exemplo, preparações de ferro; para tratar anemia maligna, tais como, por exemplo, vitamina B₁₂ e/ou ácido fólico; e para tratar anemia hemolítica, tais como, por exemplo, esteróides adrenocorticais, e. g., corticóides. Ver e. g., Resegotti et al., Panminerva Medica, 23:243-248 (1981); Kurtz, FEBS Letters, 14a:105-108 (1982); McGonigle et al., Rim Int., 25:437-444 (1984); e Pavlovic-Kanter, Expt. Hematol., 8 (supl. 8) 283-291 (1980).

Os compostos que melhoram os efeitos ou têm sinergia com a eritropoietina são também aqui úteis como adjuvantes, e incluem mas não estão limitados a, agonistas adrenérgicos, hormonas tiroideias, androgénios, factores eritropoiéticos hepáticos, eritrotrofinas e eritrogeninas, Ver por e. g., Dunn, "Current Concepts in Erythropoiesis", John Wiley and Sons (Chichester, England, 1983); Kalmani, Rim Int., 22:383-391 (1982); Shahidi, New Eng. J. Med., 289:72-80 (1973); Urabe et al., J. Exp. Med., 149:1314-1325 (1979); Billat et al., Expt. Hematol., 10:135-140

(1982); Naughton *et al.*, *Acta Haemat*, 69:171-179 (1983); Cognote *et al.* no resumo 364, *Proceedings 7th Intl. Cong. of Endocrinology* (Quebec City, Quebec, 1-7 de Julho de 1984); e Rothman *et al.*, 1982, *J. Surg. Oncol.*, 20:105-108 (1982). Os métodos para estimular a hematopoiese compreendem a administração de uma quantidade hematopoieticamente eficaz (*i. e.*, uma quantidade que resulta na formação de células sanguíneas) de uma composição farmacêutica contendo polinucleótidos e/ou polipéptidos da invenção (e/ou os seus agonistas ou antagonistas) a um doente. Os polinucleótidos e/ou polipéptidos da invenção e/ou agonistas ou antagonistas dos mesmos são administrados ao doente por qualquer técnica adequada, incluindo mas não estando limitada a, parentérica, sublingual, tópica, intrapulmonar e intranasal, e aquelas técnicas aqui discutidas em mais pormenor. A composição farmacêutica contém opcionalmente um ou mais membros do grupo consistindo de eritropoietina, testosterona, estimuladores de células progenitoras, factor de crescimento análogo a insulina, prostaglandinas, serotonina, AMP cíclico, prolactina, triiodotizonina, metenoleno, estanozolol e nandrolona, preparações de ferro, vitamina B₁₂, ácido fólico e/ou esteróides adrenocorticais.

Numa forma de realização adicional, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com factores hematopoiéticos de crescimento. Os factores hematopoiéticos de crescimento que podem ser administrados com o anticorpo e composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, LEUKINE™ (SARGRAMOSTIM™) e NEUPOGEN™ (FILGRASTIM™).

Numa forma de realização adicional, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados sozinhos ou em associação com um agente(s) antiangiogénico(s). Os agentes antiangiogénicos que podem ser administrados com o anticorpo e composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, Angiostatina (Entremed, Rockville, MD), Troponina-1 (Boston Life Sciences, Boston, MA), Factor anti-Invasivo, ácido retinóico e os seus derivados, paclitaxel (Taxol), Suramina, Inibidor Tecidual da Metaloproteinase-1, Inibidor Tecidual da Metaloproteinase-2, VEGI, Inibidor do Ativador de Plasminogénio-1, Inibidor do Ativador de Plasminogénio-2 e várias formas dos metais de transição mais leves do "grupo d".

Os metais de transição mais leves do "grupo d" incluem, por exemplo, espécies de vanádio, molibdénio, tungsténio, titânio, nióbio e tântalo. Tais espécies de metais de transição podem formar complexos de metais de transição. Os complexos adequados das espécies de metais de transição supramencionados incluem complexos oxo de metais de transição.

Os exemplos representativos de complexos de vanádio incluem os complexos de oxo vanádio, tais como os complexos de vanadato e vanadilo. Os complexos de vanadato adequados incluem complexos de metavanadato e ortovanadato, tais como, por exemplo, metavanadato de amónio, metavanadato de sódio e ortovanadato de sódio. Os complexos de vanadilo adequados incluem, por exemplo, acetilacetato de vanadilo e sulfato de vanadilo incluindo hidratos de sulfato de vanadilo, tais como mono- e tri-hidratos de sulfato de vanadilo.

Os exemplos representativos de complexos de tungsténio e molibdénio incluem também os complexos oxo. Os complexos de oxo

tungsténio adequados incluem os complexos de tungstato e óxido de tungsténio. Os complexos de tungstato adequados incluem tungstato de amónio, tungstato de cálcio, tungstato de sódio di-hidratado e ácido tungstíco. Os óxidos de tungsténio adequados incluem óxido de tungsténio (IV) e óxido de tungsténio (VI). Os complexos de oxo molibdénio adequados incluem complexos de molibdato, óxido de molibdénio e molibdenilo. Os complexos de molibdato adequados incluem molibdato de amónio e os seus hidratos, molibdato de sódio e os seus hidratos e molibdato de potássio e os seus hidratos. Os óxidos de molibdénio adequados incluem óxido de molibdénio (VI), óxido de molibdénio (VI) e ácido molíbdico. Os complexos de molibdenilo adequados incluem, por exemplo, acetilacetato de molibdenilo. Outros complexos de tungsténio e molibdénio adequados incluem os derivados hidroxo derivados de, por exemplo, glicerol, ácido tartárico e açúcares.

Uma grande variedade de outros factores antiangiogénicos pode ser também utilizada no contexto da presente invenção. Os exemplos representativos incluem, mas não estão limitados a, factor de plaquetas 4; sulfato de protamina; derivados sulfatados de quitina (preparados a partir das cascas de caranguejo-das-neves), (Murata et al., Cancer Res. 51:22-26, 1991); Complexo de Peptidoglicanos Polissacáridos Sulfatados (SP-PG) (a função deste composto pode ser melhorado pela presença de esteróides tais como estrogénio e citrato de tamoxifeno); Estaurosporina; moduladores do metabolismo da matriz, incluindo, por exemplo, análogos de prolina, cis-hidroxiprolina, d,L-3,4-desidroprolina, Tiaprolina, alfa, alfa-dipiridilo, fumarato de aminopropionitrilo; 4-propil-5-(4-piridinil)-2(3H)-oxazolona; Metotrexato; Mitoxantrona; Heparina; Interferões; soro de Macroglobulina 2; ChIMP-3 (Pavloff et al., J. Bio. Chem. 267:17321-17326, 1992);

Quimostatina (Tomkinson *et al.*, Biochem J. 286:475-480, 1992); Tetradecassulfato de Ciclodextrina; Eponemicina; Camptotecina; Fumagilina (Ingber *et al.*, Nature 348:555-557, 1990); Aurotiomalato de Sódio ("GST"; Matsubara e Ziff, J. Clin. Invest. 79:1440-1446, 1987); soro anticolagenase; alfa2-antiplasmina (Holmes *et al.*, J. Biol. Chem. 262(4):1659-1664, 1987); Bisantreno (National Cancer Institute); Lobenzarite dissódico (ácido N-(2)-carboxifenil-4- cloroantronílico dissódico ou "CCA"; (Takeuchi *et al.*, Agents Actions 36:312-316, 1992); e inibidores de metaloproteinase tal como BB94.

Os factores antiangiogénicos adicionais que podem ser também utilizados no contexto da presente invenção incluem Talidomida, (Celgene, Warren, NJ); esteróide angioestático; AGM-1470 (H. Brem e J. Folkman J Pediatr. Surg. 28:445-51 (1993)); um antagonista de integrina alfa v beta 3 (C. Storgard *et al.*, J Clin. Invest. 103:47-54 (1999)); carboxinaminolmidazole; Carboxiamidotriazole (CAI) (National Cancer Institute, Bethesda, MD); Combretastatina A-4 (CA4P) (OXiGENE, Boston, MA); Esqualamina (Magainin Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA); TNP-470, (Tap Pharmaceuticals, Deerfield, ILO); ZD-0101 AstraZeneca (London, UK); APRA (CT2584); Benefina, Birostatina-1 (SC359555); CGP-41251 (PKC 412); CM101; Dexrazoxano (ICRF187); DMXAA; Endostatina; Flavopridiol; Genesteína; GTE; ImmTher; Iressa (ZD1839); Octreótido (Somatostatina); Panretina; Penacilamina; Photopoint; PI-88; Prinomastat (AG-3540) Purlitina; Suradista (FCE26644); Tamoxifeno (Nolvadex); Tazaroteno; Tetratiomolibdato; Xeloda (Capecitabina); e 5-Fluorouracilo.

Os agentes antiangiogénicos que podem ser administrados em associação com os compostos da invenção podem actuar através de

uma variedade de mecanismos incluindo, mas não estando limitados a, inibição da proteólise da matriz extracelular, bloqueio do funcionamento das moléculas de adesão de células endoteliais-matriz extracelular, antagonismo da função dos indutores de angiogénese tais como os factores de crescimento e inibição dos receptores de integrina expressos em células endoteliais em proliferação. Os exemplos de inibidores antiangiogénico que interferem com a proteólise da matriz extracelular e que podem ser administrados em associação com o anticorpo e composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, AG-3540 (Agouron, La Jolla, CA), BAY-12-9566 (Bayer, West Haven, CT), BMS-275291 (Bristol Myers Squibb, Princeton, NJ), CGS-27032A (Novartis, East Hanover, NJ), Marimastat (British Biotech, Oxford, UK) e Metastat (Aeterna, St-Foy, Quebec). Os exemplos de inibidores antiangiogénicos que actuam bloqueando a função das moléculas de adesão de células endoteliais-matriz extracelular e que podem ser administrados em associação com o anticorpo e composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, EMD-121974 (Merck KgaA Darmstadt, Alemanha) e Vitaxina (Ixsys, La Jolla, CA/Medimmune, Gaithersburg, MD). Os exemplos de agentes antiangiogénicos que actuam antagonizando ou inibindo directamente os indutores de angiogénese e que podem ser administrados em associação com o anticorpo e composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, Angiozima (Ribozima, Boulder, CO), anticorpo Anti-VEGF (Genentech, S. San Francisco, CA), PTK-787/ZK-225846 (Novartis, Basel, Suíça), SU-101 (Sugen, S. San Francisco, CA), SU-5416 (Sugen/Pharmacia Upjohn, Bridgewater, NJ) e SU-6668 (Sugen). Outros agentes antiangiogénicos actuam para inibir indirectamente a angiogénese. Os exemplos de inibidores indirectos da angiogénese que podem ser administrados em associação com o anticorpo e

composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, IM-862 (Cytran, Kirkland, WA), Interferão-alfa, IL-12 (Roche, Nutley, NJ), e Polissulfato de pentosano (Georgetown University, Washington, DC).

Em formas de realização particulares é considerada a utilização de anticorpo e composições de anticorpos da invenção em associação com agentes antiangiogénicos para o tratamento, prevenção e/ou melhoria de cancros e outros distúrbios hiperproliferativos.

Numa outra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um agente antiviral. Os agentes antivirais que podem ser administrados com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, aciclovir, ribavirina, amantadina e remantidina.

Em certas formas de realização, os agentes terapêuticos da invenção são administrados em associação com agentes anti-retrovirais, inibidores da transcriptase inversa de nucleósidos/nucleótidos (NRTI), inibidores da transcriptase inversa não nucleosídica (NNRTI) e/ou inibidores de protease (PIs). Os NRTI que podem ser administrados em associação com os agentes terapêuticos da invenção, incluem, mas não estão limitados a, RETROVIR™ (zidovudina/AZT), VIDEX™ (didanosina/ddI), HIVID™ (zalcitabina/ddC), ZERIT™ (estavudina/d4T), EPIVIR™ (lamivudina/3TC) e COMBIVIR™ (zidovudina/lamivudina). Os NNRTI que podem ser administrados em associação com os agentes terapêuticos da invenção, incluem, mas não estão limitados a, VIRAMUNE™ (nevirapina), RESCRIPTOR™ (delavirdina) e SUSTIVA™ (efavirenz). Os inibidores de protease

que podem ser administrados em associação com os agentes terapêuticos da invenção, incluem, mas não estão limitados a, CRIXIVAN™ (indinavir), NORVIR™ (ritonavir), INVIRASE™ (saquinavir) e VIRACEPT™ (nelfinavir). Numa forma de realização específica, os agentes anti-retrovirais, nucleósido inibidores da transcriptase inversa, inibidores da transcriptase inversa não nucleosídicos e/ou inibidores de protease podem ser utilizados em qualquer associação com os agentes terapêuticos da invenção para tratar a SIDA e/ou para prevenir ou tratar a infecção por HIV.

Numa outra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um agente antibiótico. Os agentes antibióticos que podem ser administrados com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, amoxicilina, aminoglicósidos, beta-lactama (glicopéptido), beta-lactamases, Clindamicina, cloranfenicol, cefalosporinas, ciprofloxacina, ciprofloxacina, eritromicina, fluoroquinolonas, macrólidos, metronidazole, penicilinas, quinolonas, rifampina, estreptomicina, sulfonamida, tetraciclinas, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazole e vancomicina.

Noutras formas de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção podem ser administrados em associação com agentes anti-infecção oportunista. Os agentes anti-oportunistas que podem ser administrados em associação com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção, incluem, mas não estão limitados a, TRIMETOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE™, DAPSONE™, PENTAMIDINE™, ATOVAQUONE™, ISONIAZID™, RIFAMPIN™, PIRAZINAMIDE™, ETHAMBUTOL™, RIFABUTIN™, CLARITHROMICYN™, AZITHROMYCIN™, GANCICLOVIR™, FOSCARNET™, CIDOFOVIR™,

FLUCONAZOLE™, ITRACONAZOLE™, KETOCONAZOLE™, ACYCLOVIR™, FAMCICOLVIR™, PYRIMETHAMINE™, LEUCOVORIN™, NEUPOGEN™ (filgrastim/G-CSF) e LEUKINE™ (sargramostim/GM-CSF). Numa forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em qualquer associação com TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE™, DAPSONE™, PENTAMIDINE™ e/ou ATOVAQUONE™ para tratar profilacticamente, prevenir e/ou diagnosticar uma infecção de pneumonia oportunista por *Pneumocystis carinii*. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em qualquer associação com ISONIAZIDE™, RIFAMPIN™, PYRAZINAMIDE™ e/ou ETAMBUTOL™ para tratar profilacticamente, prevenir e/ou diagnosticar uma infecção complexa oportunista por *Mycobacterium avium*. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em qualquer associação com RIFABUTIN™, CLARITHROMYCIN™ e/ou AZITHROMYCIN™ para tratar profilacticamente, prevenir e/ou diagnosticar uma infecção oportunista por *Mycobacterium tuberculosis*. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em qualquer associação com GANCICLOVIR™, FOSCARNET™ e/ou CIDOFOVIR™ para tratar profilacticamente, prevenir e/ou diagnosticar uma infecção oportunista por citomegalovírus. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em qualquer associação com FLUCONAZOLE™, ITRACONAZOLE™ e/ou KETOCONAZOLE™ para tratar profilacticamente, prevenir e/ou diagnosticar um infecção fúngica oportunista. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em qualquer associação com ACYCLOVIR™ e/ou FAMCICOLVIR™ para tratar profilacticamente, prevenir e/ou diagnosticar uma infecção

oportunista pelo vírus herpes simplex de tipo I e/ou tipo II. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em qualquer associação com PYRIMEHTAMINE™ e/ou LEUCOVORIN™ para tratar profilacticamente, prevenir e/ou diagnosticar uma infecção oportunista por *Toxoplasma gondii*. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em qualquer associação com LEUCOVORIN™ e/ou NEUPOGEN™ para tratar profilacticamente, prevenir e/ou diagnosticar uma infecção bacteriana oportunista.

Numa forma de realização adicional, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados sozinhos ou em associação com um agente anti-inflamatório. Os agentes anti-inflamatórios que podem ser administrados com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, glucocorticóides e os anti-inflamatórios não esteróides, derivados de ácidos aminoarilcarboxílicos, derivados de ácidos arilacéticos, derivados de ácidos arilbutíricos, ácidos arilcarboxílicos, derivados de ácidos arilpropiónicos, pirazoles, pirazolonas, derivados de ácido salicílico, tiazinacarboxamidas, ácido e-acetamidocapróico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxibutírico, amixetrina, bendazac, benzidamina, bucolome, difenpiramida, ditazol, emorfazona, guaiazuleno, nabumetona, nimesulide, orgoteína, oxaceprol, paranilina, perisoxal, pifoxima, proquazona, proxazole e tenidap.

Os anticorpos e composições de anticorpos da invenção podem ser administrados sozinhos ou em associação com outros adjuvantes. Os adjuvantes que podem ser administrados com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem,

mas não estão limitados a, alúmen, alúmen mais desoxicolato (ImmunoAg), MTP-PE (Biocine Corp.), QS21 (Genentech, Inc.), BCG, e MPL. Numa forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com alúmen. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com QS-21. Outros adjuvantes que podem ser administrados com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, Imunomodulador de lípido de monofosforilo, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, Sais de alumínio, MF-59 e Tecnologia de adjuvante virossómico. As vacinas que podem ser administradas com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, vacinas dirigidas para protecção contra MMR (sarampo, papeira, rubéola), poliomielite, varicela, tétano/difteria, hepatite A, hepatite B, haemophilus influenzae B, tosse convulsa, pneumonia, gripe, Doença de Lyme, rotavírus, cólera, febre amarela, encefalite Japonesa, poliomielite, raiva, febre tifóide e tosse convulsa, e/ou PNEUMOVAX-23™. As associações podem ser administradas simultaneamente, e. g., como uma mistura, separadamente mas simultaneamente ou concomitantemente; ou sequencialmente. Isto inclui apresentações em que os agentes associados são administrados em conjunto como uma mistura terapêutica e também procedimentos nos quais os agentes associados são administrados separadamente mas simultaneamente, e. g., através de linhas intravenosas separadas no mesmo indivíduo. A administração "em associação" inclui ainda a administração separada de um dos compostos ou agentes dado em primeiro lugar, seguido do segundo.

Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em

associação com PNEUMOVAX-23™ para tratar, prevenir e/ou diagnosticar uma infecção e/ou qualquer doença, distúrbio e/ou estado associado à mesma. Numa forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em associação com PNEUMOVAX-23™ para tratar, prevenir e/ou diagnosticar qualquer infecção bacteriana Gram-positiva e/ou qualquer doença, distúrbio e/ou estado associado à mesma. Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em associação com PNEUMOVAX-23™ para tratar, prevenir e/ou diagnosticar uma infecção e/ou qualquer doença, distúrbio e/ou estado associado a um ou mais membros do género *Enterococcus* e/ou do género *Streptococcus*. Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em qualquer associação com PNEUMOVAX-23™ para tratar, prevenir e/ou diagnosticar uma infecção e/ou qualquer doença, distúrbio e/ou estado associado a um ou mais membros dos estreptococos do Grupo B. Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são utilizados em associação com PNEUMOVAX-23™ para tratar, prevenir e/ou diagnosticar uma infecção e/ou qualquer doença, distúrbio e/ou estado associado a *Streptococcus pneumoniae*.

Numa forma de realização preferida, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com o ligando CD40 (CD40L), uma forma solúvel de CD40L (e. g., AVREND™), fragmentos, variantes ou derivados biologicamente activos de CD40L, anticorpos anti-CD40L (e. g., anticorpos agonistas ou antagonistas) e/ou anticorpos anti-CD40 (e. g., anticorpos agonistas ou antagonistas).

Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um anticoagulante. Os anticoagulantes que podem ser administrados com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, heparina, varfarina e aspirina. Numa forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com heparina e/ou varfarina. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com varfarina. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com varfarina e aspirina. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com heparina. Noutra forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com heparina e aspirina.

Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um agente que suprime a produção de anticorpos anticardiolipina. Em formas de realização específicas, os polinucleótidos da invenção são administrados em associação com um agente que bloqueia e/ou reduz a aptidão dos anticorpos anticardiolipina para ligar a proteína do plasma de ligação a fosfolípidos, beta 2-glicoproteína I (b2GPI).

Numa forma de realização preferida, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um antimalárico. Os antimaláricos que podem ser administrados com o anticorpo e as composições de anticorpos da

invenção incluem, mas não estão limitados a, hidroxiclorocina, clorocina e/ou quinacrina.

Numa forma de realização preferida, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um NSAID.

Numa forma de realização não exclusiva, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um, dois, três, quatro, cinco, dez ou mais dos seguintes fármacos: NRD-101 (Hoechst Marion Roussel), diclofenac (Dimethaid), oxaprozina potássico (Monsanto), mecasermina (Chiron), T-714 (Toyama), pemetrexed dissódico (Eli Lilly), atreleutona (Abbott), valdecoxib (Monsanto), eltenac (Byk Gulden), campate, AGM-1470 (Takeda), CDP-571 (Celltech Chiroscience), CM-101 (CarboMed), ML-3000 (Merckle), CB-2431 (KS Biomedix), CBF-BS2 (KS Biomedix), terapia de genes de IL-1Ra (Valentis), JTE-522 (Japan Tobacco), paclitaxel (Angiotech), DW-166HC (Dong Wha), mesilato de darbufelona (Warner-Lambert), receptor de TNF 1 solúvel (synergen; Amgen), IPR-6001 (Institute for Pharmaceutical Research), trocade (Hoffman-La Roche), EF-5 (Scotia Pharmaceuticals), BIIL-284 (Boehringer Ingelheim), BIIF-1149 (Boehringer Ingelheim), LeukoVax (Inflammatics), MK-671 (Merck), ST-1482 (Sigma-Tau) e propionato de butixocorte (WarnerLambert).

Numa forma de realização preferida, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um, dois, três, quatro, cinco ou mais dos seguintes fármacos: metotrexato, sulfassalazina, aurotiomalato de sódio, auranofina, ciclosporina, penicilamina, azatioprina, um fármaco antimalárico (e.g., como aqui descrito),

ciclofosfamida, clorambucilo, ouro, ENBREL™ (Etanercept), anticorpo anti-TNF, LJP 394 (La Jolla Pharmaceutical Company, San Diego, Califórnia) e prednisolona.

Numa forma de realização adicional, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados sozinhos ou em associação com uma ou mais preparações de imunoglobulina intravenosa. As preparações de imunoglobulina intravenosa que podem ser administradas com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, GAMMAR™, IVEEGAM™, SANDOGLOBULIN™, GAMMAGARD S/D™, e GAMIMUNE™. Numa forma de realização específica, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com preparações de imunoglobulina intravenosa na terapia de transplantes (e. g., transplante de medula óssea).

Ligando de CD40 (CD40L), uma forma solúvel de CD40L (e. g., AVREND™), fragmentos, variantes ou derivados biologicamente activos de CD40L, anticorpos anti-CD40L (e. g., anticorpos agonistas ou antagonistas) e/ou anticorpos anti-CD40 (e. g., anticorpos agonistas ou antagonistas).

Numa forma de realização adicional, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com citocinas. As citocinas que podem ser administradas com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, GM-CSF, G-CSF, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IL12, IL13, IL15, anti-CD40, CD40L, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama, TNF-alfa e TNF-beta. Em formas de realização preferidas, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados com o receptor de TRAIL. Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições

de anticorpos da invenção podem ser administrados com qualquer interleucina, incluindo, mas não estando limitadas a, IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21 e IL-22. Em formas de realização preferidas, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com IL4 e IL10.

Numa forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com uma ou mais quimiocinas. Em formas de realização específicas, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com uma quimiocina α (CxC) seleccionada do grupo consistindo de proteína-10 indutível com gama-interferão (γ IP-10), interleucina-8 (IL-8), factor de plaquetas-4 (PF4), proteína de activação de neutrófilos (NAP-2), GRO- α , GRO- β , GRO- γ , péptido de activação de neutrófilos (ENA-78), proteína quimiotáctica de granulócitos-2 (GCP-2) e factor derivado de células estromais-1 (SDF-1, ou factor estimulador de pré-células B (PBSF)); e/ou uma quimiocina β (CC) seleccionada do grupo consistindo de: RANTES (regulado por activação, expressado e segregado por T normais), proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa (MIP-1 α), proteína inflamatória de macrófagos-1 beta (MIP-1 β), proteína quimiotáctica de monócitos-1 (MCP-1), proteína quimiotáctica de monócitos-2 (MCP-2), proteína quimiotáctica de monócitos-3 (MCP-3), proteína quimiotáctica de monócitos-4 (MCP-4) proteína inflamatória de macrófagos-1 gama (MIP-1 γ), proteína inflamatória de macrófagos-3 alfa (MIP-3 α), proteína inflamatória de macrófagos-3 beta (MIP-3 β), proteína inflamatória de macrófagos-4 (MIP-4/DC-CK-1/PARC), eotaxina, Exodus e 1-309; e/ou a quimiocina γ (C), linfotactina.

Noutra forma de realização, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados com quimiocina beta-8, quimiocina beta-1 e/ou a proteína inflamatória de macrófagos-4. Numa forma de realização preferida, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados com quimiocina beta-8.

Numa forma de realização adicional, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com um antagonista de IL-4. Os antagonistas de IL-4 que podem ser administrados com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a: polipéptidos solúveis do receptor de IL-4, formas multiméricas dos polipéptidos solúveis do receptor de IL-4; anticorpos anti-receptor de IL-4 que ligam o receptor de IL-4 sem transduzir o sinal biológico desencadeado pela IL-4, anticorpos anti-IL4 que bloqueiam a ligação de IL-4 a um ou mais receptores de IL-4, e muteínas de IL-4 que ligam os receptores de IL-4 mas não transduzem o sinal biológico desencadeado pela IL-4. De um modo preferido, os anticorpos utilizados de acordo com este método são anticorpos monoclonais (incluindo fragmentos de anticorpo, tal como, por exemplo, aqueles aqui descritos).

Numa forma de realização adicional, o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção são administrados em associação com factores de crescimento de fibroblastos. Os factores de crescimento de fibroblastos que podem ser administrados com o anticorpo e as composições de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14 e FGF-15.

Demonstração da Utilidade Terapêutica ou Profiláctica de uma Composição

Os compostos da invenção são de um modo preferido testados *in vitro* e, em seguida, *in vivo* em relação à actividade terapêutica ou profiláctica desejada, antes da utilização em humanos. Por exemplo, os ensaios *in vitro* que podem ser utilizados para determinar se é indicada a administração de um anticorpo ou composição específica da presente invenção, incluem os ensaios de cultura de células *in vitro* em que uma amostra de tecido do doente é cultivada em cultura e exposta ou, de outro modo, administrada com um anticorpo ou composição da presente invenção, e é observado o efeito de um tal anticorpo ou composição da presente invenção sobre a amostra de tecido. Em várias formas de realização específicas, podem ser realizados ensaios *in vitro* com células representativas de tipos de células envolvidas num distúrbio do doente, para determinar se um anticorpo ou composição da presente invenção tem um efeito desejado sobre tais tipos de células. De um modo preferido, os anticorpos ou composições da invenção também são testados em sistemas de ensaio *in vitro* e modelos animais antes da administração em humanos.

Os anticorpos ou composições da presente invenção para serem utilizados em terapia podem ser testados quanto à sua toxicidade em sistemas de modelo animal adequados, incluindo mas não estando limitado a ratos, ratinhos, galinhas, vacas, macacos e coelhos. Para avaliação *in vivo* da toxicidade de um anticorpo ou composição pode ser utilizado qualquer sistema de modelo animal conhecido na técnica.

Os anticorpos ou composições da invenção podem ser testados quanto à sua aptidão para reduzir a formação de tumores em ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Os anticorpos ou composições da invenção podem ser também testados quanto à sua aptidão para inibir a replicação viral ou reduzir a carga viral em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os anticorpos ou composições da invenção podem ser também testados quanto à sua aptidão para reduzir os números bacterianos em ensaios *in vitro* e *in vivo* conhecidos dos especialistas na técnica. Os anticorpos ou composições da invenção podem ser também testados quanto à sua aptidão para aliviar um ou mais sintomas associados a cancro, um distúrbio imunológico (e. g., uma doença inflamatória), um distúrbio neurológico ou uma doença infecciosa. Os anticorpos ou composições da invenção podem ser também testados quanto à sua aptidão para diminuir o curso de tempo da doença infecciosa. Além disso, os anticorpos ou composições da invenção podem ser testados quanto à sua aptidão para aumentar o período de sobrevivência de animais que sofrem de uma doença ou distúrbio, incluindo cancro, um distúrbio imunológico ou uma doença infecciosa. As técnicas conhecidas dos especialistas na técnica podem ser utilizados para analisar a função dos anticorpos ou composições da invenção *in vivo*.

A eficácia no tratamento ou prevenção de infecção viral pode ser demonstrado detectando a aptidão de um anticorpo ou composição da invenção para inibir a replicação do vírus, para inibir a transmissão ou impedir que o vírus se estabeleça no seu hospedeiro, ou para prevenir, melhorar ou aliviar os sintomas da doença em progressão. O tratamento é considerado terapêutico se, por exemplo, existir uma redução na carga viral, melhoria de um ou mais sintomas, ou uma diminuição na mortalidade e/ou

morbidade após administração de um anticorpo ou composição da invenção.

Os anticorpos ou composições da invenção podem ser testados quanto à sua aptidão para modular a actividade biológica de células imunitárias pondo em contacto as células imunitárias, de um modo preferido, células imunitárias humanas (e. g., células T, células B e células Assassinas Naturais), com um anticorpo ou composição da invenção ou um composto de controlo, e determinada a aptidão do anticorpo ou composição da invenção para modular (i.e., aumentar ou diminuir) a actividade biológica de células imunitárias. A aptidão de um anticorpo ou composição da invenção para modular a actividade biológica de células imunitárias pode ser avaliado detectando a expressão de antigénios, detectando a proliferação de células imunitárias (i. e., proliferação de células B), detectando a activação de moléculas de sinalização, detectando a função efectora das células imunitárias ou detectando a diferenciação de células imunitárias. Podem ser utilizadas técnicas conhecidas dos especialistas na técnica para medir estas actividades. Por exemplo, a proliferação celular pode ser analisada por ensaios de incorporação de ³H-timidina e contagens de células com azul de tripano. A expressão do antigénio pode ser analisada, por exemplo, por imunoensaios incluindo, mas não estando limitados a, sistemas de ensaio competitivos e não competitivos utilizando técnicas, tais como transferências de Western, radioimunoensaios imuno-histoquímicos, ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), imunoensaios em "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, reacções de precipitina, reacções de precipitina de difusão em gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaios imunorradiométricos, imunoensaios fluorescentes, imunoensaios de proteína A e análise

FACS. A activação de moléculas de sinalização pode ser analisada, por exemplo, por ensaios de cinase e ensaios de desvio electroforético (EMSA). Numa forma de realização preferida é medida a aptidão de um anticorpo ou composição da invenção para induzir a proliferação de células B. Noutra forma de realização preferida é medida a aptidão de um anticorpo ou composição da invenção para modular a expressão de imunoglobulina.

Painéis/Misturas

São também aqui descritas misturas de anticorpos (incluindo scFvs e outras moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo ou variantes) que se ligam imuno especificamente a TR4 ou um seu fragmento ou variante, em que a mistura tem pelo menos um, dois, três, quatro, cinco ou mais anticorpos diferentes da invenção. Em casos específicos, são aqui descritas misturas de pelo menos 2, de um modo preferido pelo menos 4, pelo menos 6, pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 15, pelo menos 20 ou pelo menos 25 anticorpos diferentes que se ligam imuno especificamente a TR4 ou os seus fragmentos ou variantes, em que pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 4, pelo menos 6 ou pelo menos 10 anticorpos da mistura é um anticorpo da invenção. Num caso específico, cada anticorpo da mistura é um anticorpo da invenção.

São também aqui descritos painéis de anticorpos (incluindo scFvs e outras moléculas compreendendo ou, alternativamente, consistindo dos seus fragmentos de anticorpo ou variantes) que se ligam imuno especificamente a TR4 ou um seu fragmento ou

variante, em que o painel tem pelo menos um, dois, três, quatro, cinco ou mais anticorpos diferentes da invenção. Em casos específicos, são aqui descritos que anticorpos têm afinidades diferentes para o receptor de TRAIL, especificidades diferentes para o receptor de TRAIL ou velocidades de dissociação diferentes. São também aqui descritos painéis de pelo menos 10, de um modo preferido pelo menos 25, pelo menos 50, pelo menos 75, pelo menos 100, pelo menos 125, pelo menos 150, pelo menos 175, pelo menos 200, pelo menos 250, pelo menos 300, pelo menos 350, pelo menos 400, pelo menos 450, pelo menos 500, pelo menos 550, pelo menos 600, pelo menos 650, pelo menos 700, pelo menos 750, pelo menos 800, pelo menos 850, pelo menos 900, pelo menos 950 ou pelo menos 1000 anticorpos. Os painéis de anticorpos podem ser utilizados, por exemplo, em placas de 96 poços para ensaios, tal como ELISA.

São também aqui descritas composições compreendendo, um ou mais anticorpos (incluindo moléculas compreendendo, ou alternativamente consistindo de fragmentos de anticorpo da invenção). Num caso, uma composição aqui descrita compreende, um, dois, três, quatro, cinco ou mais anticorpos que compreendem ou alternativamente consistem de, um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer um ou mais dos domínios VH de um ou mais dos scFvs referidos no Quadro 1, ou um variante dos mesmos. Noutro caso, uma composição aqui descrita compreende, um, dois, três, quatro, cinco ou mais anticorpos que compreendem, ou alternativamente consistem de, um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma ou mais das CDR1 de VH de um domínio VH de um ou mais dos scFvs referidos no Quadro 1, ou um seu variante. Noutro caso, uma composição aqui descrita compreende, um, dois, três, quatro, cinco ou mais anticorpos que compreendem, ou alternativamente

consistem de, um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma ou mais das CDR2 de VH de um domínio VH de um ou mais dos scFvs referidos no Quadro 1, ou uma variante dos mesmos. Num caso preferido, uma composição aqui descrita compreende, um, dois, três, quatro, cinco ou mais anticorpos que compreendem, ou alternativamente consistem de, um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma ou mais das CDR3s de VH como um domínio VH de um ou mais dos scFvs referidos no Quadro 1, ou uma sua variante.

São também aqui descritas composições compreendendo um ou mais anticorpos (incluindo moléculas compreendendo, ou alternativamente consistindo de fragmentos de anticorpo da invenção) listados abaixo. É também aqui descrito uma composição que compreende, um, dois, três, quatro, cinco ou mais anticorpos que compreendem, ou alternativa consistem de, um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer um ou mais dos domínios VL de um ou mais dos scFvs referidos no Quadro 1, ou uma variante dos mesmos; uma composição cuja invenção compreende, um, dois, três, quatro, cinco ou mais anticorpos que compreendem, ou alternativamente consistem de, um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma ou mais das CDR1 dos domínios VL de um ou mais dos scFvs referidos no Quadro 1, ou uma variante dos mesmos; uma composição que compreende, um, dois, três, quatro, cinco ou mais anticorpos que compreendem, ou alternativamente consistem de, um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma ou mais das CDR2 de VL de um ou mais dos scFvs referidos no Quadro 1, ou uma sua variante; e uma composição que compreende, um, dois, três, quatro, cinco ou mais anticorpos que compreendem, ou alternativamente consistem de, um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma ou mais das CDR3 dos

domínios VL de um ou mais dos scFvs referidos no Quadro 1, ou uma sua variante.

Kits

A invenção proporciona também um kit compreendendo o anticorpo ou o seu fragmento da invenção. É também aqui descrito uma pacote ou kit farmacêutico compreendendo um ou mais recipientes cheios com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Opcionalmente, pode estar associada a esse(s) recipiente(s) uma nota na forma indicada por uma entidade governamental que regula o fabrico, utilização ou venda de produtos farmacêuticos ou produtos biológicos, nota essa que reflecte a aprovação pela entidade do fabrico, utilização ou venda para administração humana.

A presente invenção proporciona kits que podem ser utilizados nos métodos acima. Numa forma de realização, um kit compreende um anticorpo da invenção, de um modo preferido um anticorpo purificado, num ou mais recipientes. Numa forma de realização alternativa, um kit compreende um fragmento de anticorpo que se liga imuno especificamente a TR4. Numa forma de realização específica, os kits da presente invenção contêm um polipéptido de TR4 substancialmente isolado ou o seu fragmento ou variante como um controlo. De um modo preferido, os kits da presente invenção compreendem ainda um anticorpo de controlo que não reage com qualquer, alguns ou todos os receptores de TRAIL. Noutra forma de realização específica, os kits da presente invenção contêm um meio para detectar a ligação de um anticorpo aos polipéptidos de TR4 (e. g., o anticorpo pode estar conjugado com um substrato detectável tal como um composto fluorescente,

um substrato enzimático, um composto radioactivo ou um composto luminescente, ou um segundo anticorpo que reconhece os primeiros anticorpos pode ser conjugado com um substrato detectável). Em formas de realização específicas, o kit pode incluir um receptor de TRAIL produzido de modo recombinante ou sintetizado quimicamente. O TR4 proporcionado no kit pode estar também ligado a um suporte sólido. Numa forma de realização mais específica, o meio de detecção do kit descrito acima inclui um suporte sólido ao qual está ligado o TR4. Um tal kit pode incluir também um anticorpo anti-humano marcado com repórter não ligado. Nesta forma de realização, a ligação do anticorpo ao TR4 pode ser detectada pela ligação do referido anticorpo marcado com repórter.

É também aqui descrito um kit de diagnóstico para ser utilizado para rastrear soro contendo antigénios do polipéptido da invenção. O kit de diagnóstico inclui um anticorpo substancialmente isolado, imunorreactivo de maneira específica com um receptor de TRAIL, e meios para detectar a ligação dos polipéptidos de TR4 ao anticorpo. Num caso, o anticorpo está ligado a um suporte sólido. Num caso específico, o anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal. Os meios de detecção do kit podem incluir um segundo anticorpo monoclonal marcado. Alternativamente, ou além disso, o meio de detecção pode incluir um antigénio competitivo, marcado.

Numa configuração de diagnóstico, o soro a testar é feito reagir com um reagente em fase sólida possuindo receptores de TRAIL ligados na superfície obtidos pelos métodos aqui descritos. Depois dos polipéptidos de TR4 se ligarem a um anticorpo específico, as componentes não ligadas do soro são removidas por lavagem, é adicionado anticorpo anti-humano

marcado com repórter, o anticorpo anti-humano não ligado é removido por lavagem e é feito reagir um reagente com o anticorpo anti-humano marcado com repórter para ligar o repórter ao reagente em proporção à quantidade de anticorpo anti-TR4 ligado no suporte sólido. Tipicamente, o repórter é uma enzima que é detectada incubando a fase sólido na presença de um substrato fluorimétrico, luminescente ou colorimétrico adequado.

O reagente em superfície sólida no ensaio acima é preparado por técnicas conhecidas para fixar material proteico a material suporte sólido, tais como esferas poliméricas, varetas, placa de 96 poços ou material de filtro. Estes métodos de fixação incluem geralmente adsorção não específica da proteína ao suporte ou ligação covalente da proteína, tipicamente através de um grupo amina livre, a um grupo quimicamente reactivo no suporte sólido, tais como um grupo carboxilo, hidroxilo ou aldeído activado. Alternativamente, podem ser utilizadas placas revestidas com estreptavidina em conjunto com antigénio(s) biotinilado(s).

Assim, é aqui descrito um sistema de ensaio ou kit para realizar este método de diagnóstico. O kit inclui geralmente um suporte com receptor de TRAIL recombinante ligado na superfície e um anticorpo anti-humano marcado com repórter para detectar o anticorpo anti-TR4 ligado na superfície.

Expressão Placentária de Receptores de TRAIL

A expressão de receptores e ligandos da família de necrose tumoral em placenta inteira e em linhas de células de macrófagos e trofoblasto placentárias foi cuidadosamente examinada. Foi demonstrado que os trofoblastos, que expressam TR7 e TR5 mas não

o TR10, são totalmente resistentes à morte por TRAIL recombinante, enquanto os macrófagos, os quais expressam TR4, TR7 e TR10 mas não TR5, são sensíveis (Phillips *et al.*, J. Immunol 15:6053-9 (1999)). Assim, os métodos de utilização de anticorpos anti-TR4 aqui descritos, podem ser também utilizados na placenta e tipos de células placentárias (e. g., macrófagos e células de trofoblasto) para prevenir, tratar, diagnosticar, melhorar ou seguir doenças e distúrbios da placenta e tipos de células placentárias.

Terapia de Genes

Numa forma de realização específica, os ácidos nucleicos compreendendo sequências que codificam os anticorpos ou seus derivados funcionais, são administrados para tratar, inibir ou prevenir uma doença ou distúrbio associado à expressão e/ou actividade aberrante de receptores de TRAIL e/ou seus ligandos (e. g., TRAIL), por meio de terapia de genes. Terapia de genes refere-se à terapia realizada pela administração a um indivíduo de um ácido nucleico expresso ou expressável. Nesta forma de realização da invenção, os ácidos nucleicos produzem a sua proteína codificada que medeia um efeito terapêutico.

Qualquer um dos métodos de terapia de genes disponível na técnica pode ser utilizado de acordo com a presente invenção. A seguir são descritos métodos ilustrativos.

Para revisões gerais sobre os métodos de terapia de genes, ver Goldspiel *et al.*, Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu e Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932

(1993); e Morgan e Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIBTECH* 1 1(5):155-215 (1993). Os métodos geralmente conhecidos na matéria de tecnologia de ADN recombinante que podem ser utilizados são descritos em Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); e Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NJ (1990).

Num aspecto preferido, uma composição da invenção compreende ou, alternativamente, consiste de ácidos nucleicos que codificam um anticorpo, sendo os referidos ácidos nucleicos parte de um vector de expressão que expressa o anticorpo ou os seus fragmentos ou proteínas quiméricas ou cadeias pesadas ou leves num hospedeiro adequado. Em particular, tais ácidos nucleicos têm promotores, de um modo preferido promotores heterólogos, operacionalmente ligados à região de codificação do anticorpo, sendo o referido promotor indutível ou constitutivo, e, opcionalmente, específico do tecido. Noutra forma de realização particular, são utilizadas moléculas de ácido nucleico nas quais as sequências de codificação de anticorpo e quaisquer outras sequências desejadas estão flanqueadas por regiões que promovem a recombinação homólogo num sítio desejado do genoma, proporcionando, desse modo, a expressão intracromossômica dos ácidos nucleicos que codificam o anticorpo (Koller e Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 86:8932-8935 (1989); Zijlstra *et al.*, *Nature* 342:435-438 (1989). Em formas de realização específicas, a molécula de anticorpo expressa é um scFv; alternativamente, as sequências de ácido nucleico incluem sequências que codificam as cadeias pesadas e leves, ou os seus fragmentos, de um anticorpo.

A administração dos ácidos nucleicos a um doente pode ser directa, em cujo caso o doente é directamente exposto ao ácido nucleico ou vectores portadores do ácido nucleico, ou indirecta, em cujo caso, as células são primeiro transformadas com os ácidos nucleicos *in vitro*, em seguida transplantadas no doente. Estas duas abordagens são conhecidos, respectivamente, como terapia de genes *in vivo* ou *ex vivo*.

Numa forma de realização específica, as sequências de ácido nucleico são directamente administradas *in vivo*, onde são expressas para produzir o produto codificado. Isto pode ser conseguido por qualquer um dos numerosos métodos conhecidos na técnica, e. g., construindo-o como parte de um vector de expressão de ácido nucleico apropriado e administrando-o de modo a tornar-se intracelular, e. g., por infecção utilizando retrovirais deficientes ou atenuados ou outros vectores virais (ver Patente U.S. nº 4980286), ou por injeção directa de ADN nu, ou utilizando o bombardeamento de micropartículas (e. g., uma arma de genes; Biolistic, Dupont), ou revestimento com lípidos ou receptores da superfície celular ou agentes de transfecção, encapsulamento em lipossomas, micropartículas, ou microcápsulas, ou administrando-o em ligação com um péptido que se sabe que entra no núcleo, administrando-o em ligação com um ligando sujeito a endocitose mediada pelo receptor (ver, e. g., Wu e Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)) (o qual pode ser utilizado para visar tipos de células que expressam especificamente os receptores), etc. Noutra forma de realização, podem ser preparados complexos de ácido nucleico-ligando, nos quais o ligando compreende um péptido viral fusogénico que rompe endossomas, permitindo que o ácido nucleico evite a degradação lisossómica. Ainda noutra forma de realização, o ácido nucleico pode ser direccionado *in vivo* para captação e expressão celular

específica, visando um receptor específico (ver, e. g., Publicações PCT WO 92/06180; WO 92/22715; W092/20316; W093/14188, WO 93/20221). Alternativamente, o ácido nucleico pode ser introduzido intracelularmente e incorporado no ADN da célula hospedeira para expressão, por recombinação homóloga (Koller e Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra *et al.*, Nature 342:435-438 (1989)).

Numa forma de realização específica são utilizados vectores virais que contêm sequências de ácido nucleico que codificam um anticorpo da invenção ou fragmentos do mesmo. Por exemplo, pode ser utilizado um vector retroviral (ver Miller *et al.*, Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Estes vectores retrovirais contêm as componentes necessárias para o empacotamento correcto do genoma viral e integração no ADN da célula hospedeira. As sequências de ácido nucleico que codificam o anticorpo a ser utilizado em terapia de genes são clonadas em um ou mais vectores, o que facilita a administração do gene num doente. Mais detalhes sobre os vectores retrovirais podem ser encontrados em Boesen *et al.*, Biotherapy 6:29 1-302 (1994), o qual descreve a utilização de um vector retroviral para entregar o gene de *mdr 1* em células pluripotentes hematopoiéticas para tornar as células pluripotentes mais resistente a quimioterapia. Outras referências que ilustram a utilização de vectores retrovirais em terapia de genes são: Clowes *et al.*, J. Clin. Invest. 93:644-651(1994); Klein *et al.*, Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons e Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); e Grossman e Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993).

Os adenovírus são outros vectores virais que podem ser utilizados em terapia de genes. Os adenovírus são veículos

especialmente atractivos para administrar genes em epitélios respiratórios. O adenovírus infecta naturalmente epitélios respiratórios, onde provocam uma doença ligeira. Outros alvos para os sistemas de administração baseados em adenovírus são o fígado, o sistema nervoso central, células endoteliais e o músculo. Os adenovírus têm a vantagem de serem capazes de infectar células que não se encontram em divisão. Kozarsky e Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) apresentam uma revisão sobre a terapia de genes baseada em adenovírus. Bout *et al.*, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) demonstrou a utilização de vectores de adenovírus para transferir genes para epitélios respiratórios de macacos rhesus. Pode encontrar-se outros casos de utilização de adenovírus na terapia de genes em Rosenfeld *et al.*, *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld *et al.*, *Cell* 68:143- 155 (1992); Mastrangeli *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); Publicação PCT W094/12649; e Wang, *et al.*, *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). Numa forma de realização preferida, são utilizados vectores de adenovírus.

O vírus adeno-associado (AAV) foi também proposto para ser utilizado em terapia de genes (Walsh *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); Patente U.S. nº 5436146).

Outra abordagem à terapia de genes envolve a transferência de um gene para células em cultura de tecido por métodos tais como electroporação, lipofecção, transfecção mediada por fosfato de cálcio ou infecção viral. Em geral, o método de transferência inclui a transferência de um marcador seleccionável para as células. As células são depois colocadas sob selecção para isolar aquelas células que captaram e expressam o gene

transferido. Aquelas células são depois administradas a um doente.

Nesta forma de realização, o ácido nucleico é introduzido numa célula antes da administração *in vivo* da célula recombinante resultante. Essa introdução pode ser realizada por qualquer método conhecido na técnica, incluindo mas não estando limitado a transfecção, electroporação, microinjecção, infecção com um vector viral ou bacteriófago contendo as sequências de ácido nucleico, fusão celular, transferência de gene mediada por cromossoma, transferência de gene mediada por microcélula, fusão de esferoplasto, etc. Numerosas técnicas são conhecidas na técnica para a introdução de genes estranhos em células (ver, e. g., Loeffler e Behr, Meth. Enzymol. 217:599-718 (1993); Cohen *et al.*, Meth. Enzymol. 217:718-644 (1993); Clin. Pharma. Ther. 29:69-92m (1985)) e podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção, com a condição de que não sejam destruídas as funções de desenvolvimento e fisiológicas necessárias das células destinatárias. A técnica deve proporcionar uma transferência estável do ácido nucleico para a célula, de modo que o ácido nucleico seja expressável pela célula e, de um modo preferido, transmitido e expressável pela sua descendência celular.

As células recombinantes resultantes podem ser administradas a um doente por vários métodos conhecidos na técnica. As células sanguíneas recombinantes (e. g., células pluripotentes ou progenitoras hematopoiéticas) são de um modo preferido administradas por via intravenosa. A quantidade de células concebida para ser utilizada depende do efeito desejado, estado do doente, etc., e pode ser determinada por um especialista na técnica.

As células nas quais pode ser introduzido um ácido nucleico para efeitos de terapia de genes abrangem qualquer tipo de células disponível, desejado e incluem, mas não estão limitadas a, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, células musculares, hepatócitos; células sanguíneas tais como linfócitos T, linfócitos B, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariócitos, granulócitos; várias células pluripotentes ou progenitoras, em particular células pluripotentes ou progenitoras hematopoiéticas, e. g., como obtidas a partir de medula óssea, sangue do cordão umbilical, sangue periférico, fígado fetal, etc.

Numa forma de realização preferida, a célula utilizada para terapia de genes é autóloga ao doente.

Numa forma de realização em que são utilizadas células recombinantes em terapia de genes, as sequências de ácido nucleico que codificam um anticorpo ou o seu fragmento são introduzidos nas células de tal forma que são expressas pelas células ou pela sua descendência, e as células recombinantes são em seguida administradas *in vivo* para efeito terapêutico. Numa forma de realização específica, são utilizadas células pluripotentes ou progenitoras. Quaisquer células pluripotentes e/ou progenitoras que possam ser isoladas e mantidas *in vitro* podem ser potencialmente utilizadas de acordo com esta forma de realização da presente invenção (ver e. g. Publicação PCT WO 94/08598; Stemple e Anderson, *Cell* 71:973-985 (1992); Rheinwald, *Meth. Cell Bio.* 21A:229 (1980); e Pittelkow e Scott, *Mayo Clinic Proc.* 71:771 (1986)).

Numa forma de realização específica, o ácido nucleico a ser introduzido para efeitos de terapia de genes compreende um promotor indutível operacionalmente ligado à região de codificação, de tal forma que a expressão do ácido nucleico pode ser controlada, controlando a presença ou ausência do indutor de transcrição apropriado.

Exemplos

Exemplo 1: Isolamento e caracterização dos scFvs referidos no Quadro 1

Resgate de grandes bibliotecas de scFv

Foi utilizada uma biblioteca de scFv com até 1×10^{11} clones, a qual é uma versão expandida da biblioteca com $1,38 \times 10^{10}$ descrita (Vaughan et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 309-314), para seleccionar anticorpos específicos para TR4. Os fagos foram resgatados tomando 3×10^{10} células de uma cultura-mãe em glicerol e cultivados em 2YTAG (meio 2YT suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 2% (p/v) de glucose) a 37 °C durante 2h com agitação. Foi adicionado o fago auxiliar M13K07 (Stratagene) à cultura a uma multiplicidade de infecção (moi) de aproximadamente 10. A cultura foi incubada estacionária a 37 °C durante 15 min, seguida de 45 min com arejamento ligeiro (200 rpm) à mesma temperatura. A cultura foi centrifugada e as células foram ressuspensas em 500 mL de 2YTAK (meio 2YT suplementado com 100 µg/mL de canamicina), e a cultura incubada de um dia para o outro a 30 °C com bom arejamento (300 rpm). As partículas de fago foram purificadas e concentradas por três

ciclos de precipitação em polietilenoglicol (PEG) (20% de PEG 6000, NaCl 2,5 M) sobre gelo, em seguida ressuspensas em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) a 10^{12} unidades de transdução (tu)/mL, tituladas como clones resistentes a ampicilina.

Incubação das bibliotecas de scFv sobre TR4

A proteína de fusão de TR4 solúvel, purificada foi produzido por HGS. Os fagomídeos purificados foram primeiro desseleccionados sobre uma proteína de fusão irrelevante para remover quaisquer ligantes irrelevantes. Para este fim, 500 µL de uma proteína de fusão irrelevante foi imobilizada (10 µg/mL em PBS) sobre um imunotubo com 75 mm × 12 mm (Nunc; Maxisorp) de um dia para o outro a 4 °C. Depois de lavar 3 vezes com PBS, o tubo foi cheio com MPBS a 3% (3% de leite em pó magro 'Marvel' em PBS) e bloqueado durante 2 h a 37 °C. A lavagem foi repetida e foram adicionadas partículas de fagomídeo (10^{13} tu) em 500µL de MPBS a 3% contendo 100µg/mL de proteína de fusão irrelevante e o tubo incubado estacionário a 37 °C durante 1 h. As partículas de fagomídeo foram em seguida transferidas para um imunotubo que tinha sido revestido com TR4 (10 µg/mL em PBS) de um dia para o outro a 4 °C e bloqueado durante 2 h a 37 °C com MPBS a 3%. O tubo foi incubado estacionário a 37 °C durante 1 hora e, em seguida, lavado 10 vezes com PBST (PBS contendo 0,1% (v/v) de Tween 20) e 10 vezes com PBS. As partículas de fagomídeo ligadas foram eluídas com 1 mL de trietilamina 100 mM durante 10 min à temperatura ambiente, em seguida imediatamente neutralizadas com 0,5 mL de Tris.HCl 1M (pH 7,4). Os fagos eluídos foram utilizados para infectar 10 mL de *E. coli* TG1 em crescimento exponencialmente. As células infectadas foram cultivadas em

caldo 2YT durante 1 h a 37 °C com arejamento ligeiro, em seguida semeadas em placas de ágar 2YTAG (243 mm × 243 mm; Nunc) e incubadas, de um dia para o outro, a 30 °C. As colónias foram raspadas das placas para 10 mL de caldo 2YT e adicionado 15% (v/v) de glicerol para conservação a -70 °C.

As culturas-mãe em glicerol da primeira ronda de incubação sobre a proteína de fusão de TR4 foram depois superinfectadas com fago auxiliar e resgatadas para dar partículas de fagomídeo para a segunda ronda de incubação. Foram inoculados 25 µL da cultura-mãe em glicerol em 25 mL de caldo 2TYAG e incubados a 37 °C com bom arejamento até a OD_{600nm} chegar a 0,7. Foi adicionada o fago auxiliar M13K07 (moi =10) à cultura, a qual foi então incubada estacionária durante 15 min a 37 °C, em seguida com agitação durante 45 min à mesma temperatura. A cultura foi centrifugada, as células foram ressuspensas em 50 mL de 2YTAK pré-aquecido e o resgate foi realizado de um dia para o outro a 30 °C como atrás. As partículas de fagomídeo foram purificadas e concentradas como atrás e ressuspensas em PBS até 10¹³ tu/mL. Os reportórios colhidos em rondas de selecção subsequentes foram superinfectados e resgatados do mesmo modo.

Foram realizadas quatro rondas de selecção por incubação e as colónias individuais foram rastreadas por ELISA de fago em relação à ligação a TR4.

ELISA de Fago

Para determinar a especificidade de cada um dos anticorpos foi realizada uma ELISA de fago para cada anticorpo contra a proteína de fusão de TR4 e uma proteína de fusão irrelevante.

Colónias de *E. coli* individuais contendo fagomídeo foram inoculadas em placas de 96 poços contendo 100 µL de meio 2TYAG por poço. As placas foram incubadas a 37 °C durante 4 horas, agitando. Foi adicionado fago auxiliar M13K07 a cada poço a uma mo de 10 e as placas foram incubadas durante mais 1 hora a 37 °C. As placas foram centrifugadas numa centrífugadora de bancada a 2000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi removido e os sedimentos celulares foram ressuspensão em 100 µL de 2TYAK e incubados a 30 °C, de um dia para o outro, com agitação. No dia seguinte, as placas foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min e 100 µL de sobrenadante contendo fago de cada poço cuidadosamente transferidos para uma placa de 96 poços fresca. Foram adicionados 20 µL de MPBS 6× a cada poço, e incubados à temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear o fago antes do ELISA.

Placas flexíveis de 96 poços (Falcon) foram revestidas, de um dia para o outro, a 4 °C com TR4 humano (1 µg/mL) ou uma proteína de fusão irrelevante (1 µg/mL). Ambos os antígenos foram revestidos em PBS. Após revestimento, as soluções foram retiradas dos poços e as placas foram bloqueadas durante 1 hora à temperatura ambiente em MPBS. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS e, em seguida, foram adicionados 50 µL de fago pré-bloqueado a cada poço. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora e, em seguida, lavadas com 3 trocas de PBST, seguidas de 3 trocas de PBS.

A cada poço foram adicionados 50 µL de um conjugado anti-M13-HRP (Pharmacia) a uma diluição de 1 para 5000 em MPBS e as placas incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora. Cada

placa foi lavada três vezes com PBST, seguida de três vezes com PBS.

Foram então adicionados 50 µL de substrato TMB a cada poço, e incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos ou até desenvolvimento de cor. A reação foi parada pela adição de 25 µL de H₂SO₄ 0,5 M. O sinal produzido foi medido lendo a absorvância a 450nm (A₄₅₀) utilizando um leitor de placas microtítulo (Bio-Rad 3550).

A partir de um painel de 1500 clones quer foram rastreados por ELISA foram identificados 250 anticorpos que ligavam a proteína de fusão de TR4, mas não uma proteína de fusão irrelevante. Os resultados de uma placa típica de clones são mostrados na Figura 1. Noventa e cinco por cento dos anticorpos isolados reconheceram a proteína de fusão de TR4, mas não uma proteína de fusão irrelevante.

ELISA de Fago de Especificidade

Para determinar a especificidade dos anticorpos que ligavam TR4, foi realizada uma ELISA de fago contra a proteína de fusão de TR4 humano e um painel de antígenos humanos relacionados e não relacionados, TR7, TR5, TR10, BlyS (descrito nas Publicações de Patente Internacional Números WO98/18921 e WO00/50597), proteína de fusão irrelevante e BSA.

Colônias de *E. coli* contendo fagomídeo particulares foram inoculadas em 5 mL de 2YTAG e incubadas a 37 °C durante 4 horas, com agitação. Foi adicionado o fago auxiliar M13K07 (Pharmacia) a cada tubo a uma moi de 10 e incubado durante 30 min a 37 °C

durante 1 hora, os primeiros 30 minutos estáticos e os 30 minutos finais com agitação suave. As células foram sedimentadas por centrifugação a 3500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante contendo fago (5 mL) foi cuidadosamente transferido para um tubo fresco, adicionado 1 mL de MPBS 6X e, em seguida, incubado à temperatura ambiente durante 1 hora para pré-bloquear o fago antes do ELISA.

Placas flexíveis de 96 poços (Falcon) foram revestidas de um dia para o outro a 4 °C com cada antigénio (1 µg/mL). Todos os antigénios foram revestidos em PBS. Após revestimento, as soluções foram retiradas dos poços e as placas foram bloqueadas durante 1 hora à temperatura ambiente em MPBS. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS e, em seguida, foram adicionados 50 µL de fago pré-bloqueado a cada poço. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora e, em seguida, lavadas com 3 trocas de PBST, seguidas de 3 trocas de PBS.

A cada poço foram adicionados 50 µL de um conjugado anti-M13-HRP (Pharmacia) a uma diluição de 1 para 5000 em MPBS e as placas incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora. Cada placa foi lavada três vezes com PBST, seguida de três vezes com PBS.

Foram então adicionados 50 µL de substrato TMB a cada poço e incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos ou até desenvolvimento de cor. A reacção foi parada pela adição de 25 µL de H₂SO₄ 0,5 M. O sinal produzido foi medido lendo a absorvância a 450 nm (A₄₅₀) utilizando um leitor de placas microtítulo (Bio-Rad 3550).

Utilizando este ensaio, demonstrou-se que os scFVs T1014F08, T1014G03, T1014A04, T1014G04, T1014B11, T1017D09 ligam o TR4 mas não o TR7, TR5, TR10, BLyS ou uma proteína de fusão irrelevante, indicando que os anticorpos reconhecem especificamente o TR4.

Exemplo 2:

Análise Biacore da Afinidade dos Polipéptidos de Ligação a TR4

Materiais

Instrumento BIAcore 2000

Software de controlo BIAcore 2000, versão 3.1.1

BIAevaluation, versão 3.1

Chip Sensor BIAcore CM5, N° de Cat BR-1000-14 N° de Lote 0364 (BIAcore)

Tampão de HBS-EP

Kit de Acoplamento de Amina N° de Cat BR-1000-50 (BIAcore)

EDC, N° 1048-950345(BIAcore)

NHS, N° 1048-950345(BIAcore)

Etanolamina, N° 1048-950345(BIAcore)

Acetato 10 mM, pH 4,0 N° de Cat BR1003-50, N° de Lote 1821-9503844(BIAcore)

TRAIL-FLAG (Alexis Biochemicals N° de Cat 522-003-C010 N° L04793/a)

A temperatura foi de 25 °C durante todas as experiências.

Métodos Gerais

TR4, TR5, TR7 e TR10 (na forma de proteínas de fusão de Fc) são imobilizados em células de fluxo individuais de um chip sensor BIAcore. A proteína de fusão de TR4-Fc compreende os resíduos M1-I240 de TR4 (SEQ ID N°:1). O processamento pós-tradução desta proteína de fusão resulta numa proteína de fusão TR4-Fc que compreende os resíduos A109-I240 de TR4 (SEQ ID N°:1). A proteína de fusão TR5-Fc compreende os resíduos R70-S282 de TR5 (SEQ ID N°:2). Esta proteína é expressa num sistema de expressão de baculovírus que utiliza o sinal do péptido GP. Assim, o processamento pós-tradução desta proteína de fusão resulta numa proteína de fusão TR5-Fc que compreende os últimos 3 resíduos do péptido sinal GP (Ala-Asp-Pro) fundidos com R70-S282 de TR5 (SEQ ID N°:2) fundidos com a região Fc. A proteína de fusão TR7-Fc compreende os resíduos E52-G184 de TR7 (SEQ ID N°:3). Esta proteína é expressa num sistema de expressão de baculovírus que utiliza o péptido sinal GP. Assim, o processamento pós-tradução desta proteína de fusão resulta numa proteína de fusão TR7-Fc que compreende os últimos 3 resíduos do péptido sinal GP (Ala-Asp-Pro) fundidos com E52-G184 de TR5 (SEQ ID N°:3) fundidos com a região Fc. A proteína de fusão TR10-Fc compreende os resíduos M1-G204 de TR10 (SEQ ID N°:4). O processamento pós-tradução desta proteína de fusão resulta numa

proteína de fusão TR10-Fc que compreende os resíduos A56-G204 de TR10 (SEQ ID N°:4).

O acoplamento de amina é utilizado para ligar covalentemente cada receptor (Fc) à matriz de dextrano no chip sensor CM5. O pH óptimo para este acoplamento é analisado utilizando experiências de pré-concentração que vão desde pH 4-7 e é determinado com base no declive da ligação.

O acoplamento efectivo é realizado utilizando o modo de injeção manual. Um nível alvo de ~2000RU é fixo como objectivo

para todas as células de fluxo. (Este pode variar desde 2000-3100 dependendo do peso molecular do receptor). A concentração de todos os receptores para imobilização foi de 10 ug/mL em acetato 10 mM, pH 4,0. Toda a experiência de imobilização é realizada a 5 microlitros/min. O tempo de contacto para a injeção de EDC/NHS é de 7 minutos. A etanolamina é injectada durante 7 minutos.

O rastreio pode ser realizado com os seguintes procedimentos. O caudal para todo o ciclo de ligação é de 25 microlitros/minuto. Os anticorpos correspondentes aos scFvs são diluídos em HBS-EP e feitos passar através de todas as quatro células com receptores de TRAIL imobilizados. Cada amostra está em contacto com os receptores durante 4 minutos. A regeneração é realizada utilizando 15 microlitros de NaOH 25 mM. A regeneração é considerada bem sucedida quando não só remove o anticorpo, mas também não desnatura o receptor imobilizado.

O controlo positivo para esta experiência de rastreio é uma injeção idêntica (em caudal e intervalo de tempo) do ligando TRAIL solúvel. A concentração é de 1 micrograma/mL. O controlo negativo é uma diluição 1:10 em HBS-EP do diluente de anticorpo. Os dados podem ser analisados utilizando o conjunto de software BIAevaluation.

Análise Biacore de Anticorpos Anti-TR4

Na experiência seguinte foram determinadas as afinidades de certos anticorpos (correspondentes aos scFvs aqui descritos) para TR4 com base nos métodos gerais descritos acima, utilizando um método de "subtração de dupla referência" utilizando o receptor TR4:Fc na célula de fluxo experimental e TR2:Fc (compreendendo os aminoácidos 1-240 de TR2 como divulgado no documento W096/34095) como um negativo controlo.

Imobilização:

O pH ótimo para este acoplamento foi analisado utilizando experiências de pré-concentração que vão desde pH 4-7 e foi determinado como sendo pH 4,0 para ambos os receptores TR4 e TR2. O acoplamento de amina foi utilizado para ligar covalentemente cada receptor (fc) à matriz de dextrano no chip sensor CM5. A experiência de imobilização foi realizada utilizando o modo de injeção manual. Toda a experiência de imobilização foi realizada a 5 µL/min. Foi aplicada uma injeção de 3 minutos de EDC/NHS (1:1) a cada célula de fluxo para

activar os ésteres. Um nível alvo de ~200RU foi fixado como

objectivo para todas as células de fluxo. Os receptores de fusão de Fc, TR4 e TR2 a 5 µg/mL, foram imobilizados em células de fluxo individuais de um chip sensor. A quantidade aplicadas variou desde 8-14 µL. Uma injeção de etanolamina de 3 minutos completou a experiência de imobilização inactivando os ésteres.

Cinética:

Os ciclos cinéticos foram realizadas como se segue: O caudal para todo o ciclo foi de 25 µL/minuto, com o percurso do fluxo a incluir sempre as células de fluxo de controlo (TR2) e experimental (TR4). Foi aplicada uma injeção de tampão de 1 minuto para estabilizar a linha de base. O anticorpo purificado (anticorpo IgG1 compreendendo os domínios VH e VL e cada um dos scFvs T1014A04, T1014G03, T1014F08 e T14G04) foi diluído de 10 µg/mL (65 nM) para 0,115 µg/mL (0,75 nM) em tampão de ensaio e testado em duplicado. Cada concentração esteve em contacto com a célula de fluxo de controlo (TR2) e experimental (TR4) durante uma fase de associação de 4 minutos e uma fase de dissociação de 10 minutos. A regeneração foi realizada utilizando NaOH 25 mM de 5-12 µL dependendo da concentração da amostra.

Avaliação:

Foi realizada uma subtração de dupla referência, a qual refere-se à subtração da células de fluxo de controlo para cada ciclo, além de uma subtração de ciclo de tampão. Foi utilizado o modelo de Langmuir 1:1 para todos os ajustes de avaliação. Os resultados destas experiências são mostrados no Quadro 5 abaixo.

Quadro 5: Afinidade dos anticorpos para TR4

Clone	k_a	k_d	K_D	χ^2
T1014A04	$5,67 \times 10^5$	$2,65 \times 10^{-4}$	$4,68 \times 10^{-10}$	2
T1014G03	$3,50 \times 10^5$	$1,94 \times 10^{-4}$	$5,54 \times 10^{-10}$	0,76
T1014F08	$1,23 \times 10^6$	$1,02 \times 10^{-4}$	$8,27 \times 10^{-10}$	1,83
T1014G04	$6,05 \times 10^5$	$1,18 \times 10^{-4}$	$1,94 \times 10^{-10}$	1,14

Exemplo 3:

Inibição da Ligação de TRAIL Biotinilado a TR4

I. Materiais:

PBS 10X (Qualidade Biológica Cat 130-069-161, Lote 708712)

Microplaca Immulon 4 (Dynex Cat 3855, Lote ND540319)

Albumina de Soro Bovino fracção V (Sigma, N° 58H0456)

Tri Hidroxi Metil Amino Metano (BASE TRIS)

Tween 20 (Sigma)

Fc anti-humano de cabra (Sigma, I-2136, N° 89H4871)

TR-4:Fc (como descrito acima)

TRAIL Biotinilado (AM100200-Peprotech)

HRP-Estreptavidina (Vector, N° L0328)

Sistema de Substrato de Micropoço de TMB-Peroxidase (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.)

H₂SO₄ (Fisher)

Placa de diluição de 96 poços (Costar)

II. Tampões:

Tampão de revestimento (PBS 1X)

Tampão de bloqueio (3% de BSA em PBS)

Diluyente Universal (1% de BSA em PBST)

Tampão de lavagem (0,1% de Tween 20 e PBS 1X)

III. Métodos

Fc anti-humano de cabra é diluído até 0,1 microgramas/mL em tampão de revestimento. Uma microplaca Immulon 4 é revestida com

100 microlitros por poço da solução de Fc anti-humano de cabra e incubada de um dia para o outro a 4 °C. A solução de revestimento é decantada da placa e é fornecida solução de bloqueio a 200 microlitros por poço. A placa é incubada à temperatura ambiente durante 1 hora. Depois do período de incubação de 1 hora, a solução de bloqueio é decantada da placa e é fornecido 1 micrograma/mL de TR4-Fc a 100 microlitros/poço e incubado durante 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação, a placa é lavada cinco vezes manualmente utilizando um distribuidor Wheaton.

Os anticorpos correspondentes aos scFvs aqui descritos são (previamente) preparados numa placa de diluição de baixa ligação utilizando diluente. Os anticorpos são preparados em duplicado e são diluídos a partir da concentração-mãe por diluições sucessivas de 2,5 vezes para os 7 poços seguintes. Se estiver disponível uma forma purificada do anticorpo, a concentração de partida é 5 microgramas/mL. O controlo positivo (TR4-Fc) é diluído desde 5 microgramas/mL. São transferidos 100 microlitros para a placa ELISA e pré-incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente. São adicionados 20 microlitros de TRAIL biotinilado a 5 microgramas/mL a 100 µL do sobrenadante e misturados. Os 120 microlitros combinados são incubados durante 2 horas à TA.

Após a incubação de duas horas, o ciclo de lavagem é repetido e a placa decantada e absorvida com papel. A HRP-estreptavidina é diluída a 1:2000 e são fornecidos 100 microlitros por poço. A incubação é durante uma hora à temperatura ambiente. Entretanto são retiradas quantidades iguais do substrato de peroxidase TMB e da solução B de

peroxidase e as soluções são equilibradas até à temperatura ambiente.

Após a incubação de uma hora, a placa é decantada e lavada cinco vezes com PBST e absorvida com papel. O substrato de peroxidase TMB e a solução B de peroxidase são combinados e são fornecidos 100 microlitros para cada poço. A cor foi desenvolvida à temperatura ambiente durante 15 minutos. O desenvolvimento de cor é desactivado adicionando 50 microlitros de H_2SO_4 1 M a cada poço. A placa é imediatamente lida a 450 nm utilizando o espectrómetro da Molecular Devices.

Em seguida é medida a IC-50, *i. e.*, a concentração de anticorpo purificado que resultou em 50% de inibição da ligação estacionária. Para efeitos de comparação é utilizado um polipéptido de TR4 como uma amostra neste ensaio.

Exemplo 4:

Análise da Aptidão dos Anticorpos Anti-TRAIL-R1 (TR4) para induzir Apoptose

Métodos Gerais:

Os anticorpos anti-TR4 são testados quanto à sua aptidão para induzir a apoptose de células que expressam TR4, sozinhos ou em associação com agentes quimioterapêuticos ou de reticulação. Resumidamente, os anticorpos são testados quanto à actividade para induzir a apoptose mediada por TR4 de linhas de células que expressam TR4, SW480 e HeLa. A linha de células de

fibrossarcoma HT1080, a qual não expressa TR4, é utilizada como um controle negativo.

Para induzir a apoptose, as células HeLa ou SW480 são incubadas com a concentração indicada de anticorpos monoclonais ou um anticorpo de controle de IgG2a humano. Um dia antes do ensaio, as células ($0,3 \times 10^6$ células/mL; 100 μ L/poço) são aplicadas nos poços de uma placa de 96 poços e deixadas aderir, de um dia para o outro. No dia seguinte é adicionada o anticorpo de ensaio na presença ou ausência de 2,0 microgramas/mL de ciclo-heximida (Sigma R75010-7). Nalgumas experiências, a potência do anticorpo monoclonal anti-TR4 é comparada com a proteína rhuTRAIL-FLAG (Alexis Biochemicals). A rhuTRAIL é utilizada às concentrações indicadas na presença de anticorpo intensificador anti-FLAG a 2 microgramas/mL. O efeito da reticulação secundária é também avaliado medindo a aptidão dos anticorpos monoclonais para matar células sozinhas ou na presença de um anticorpo específico anti-Fc de Ig humana de cabra secundário (SIGMA). O anticorpo de reticulação secundário é adicionado às células a uma concentração equivalente do anticorpo monoclonal de ensaio. A aptidão de um agente quimioterapêutico para sensibilizar as células para a morte através do anticorpo monoclonal é avaliada tratando células HeLa ou SW480 com anticorpo monoclonal na presença de Topotecano (Hycamtin, SmithKline Beecham NDC 0007-4201-01).

Os ensaios são realizados durante 16-18 h a 37 °C, após o que a viabilidade é revelada utilizando o reagente, Azul de Alamar (Biosource, N° de cat. DAL1100) utilizando as condições sugeridas pelo fabricante. A fluorescência do Azul de Alamar é detectada utilizando o leitor de fluorescência CytoFluor a 530 nm de excitação e 590 de emissão. Os resultados são

expressos como uma percentagem de viabilidade em comparação com as células não tratadas.

Outros agentes quimioterapêuticos que podem ser testados neste ensaio (e utilizados em regimes de tratamento em conjunto com os anticorpos da presente invenção) incluem, por exemplo, 5-Fluorouracilo, Etoposido, Taxol, Cisplatina, Citabarina (Cytosar), IFN gama, camptotecina, irinotecano (camptosar, CPT-11), adrimicina (doxorubicina), metotrexato, paraplatinina, interferão-alfa, paclitaxel, docetaxel, o inibidor de NF-kappa-B SN50 e gencitabina (Gemzar™). Outras linhas de células que podem ser testadas neste ensaio incluem, por exemplo, a linha de linfoma de Burkitt humano ST486, linha de células de carcinoma da mama humano MDA-MB-231, a linha de células de carcinoma uterino humano RL-95, a linha de células de carcinoma pulmonar humano SK-MES-1, linhas de células de cancro do cólon humano, LS 174T, HT29 e HCT116, as linhas de células de cancro do pâncreas su.86.86 e CFPAC, a linha de células de cancro do ovário humano TOV21G e a linha de células de cancro hepatocelular humano SNU449. Os cancros dos tecidos correspondentes aos tecidos a partir dos quais foram derivadas estas linhas de células cancerosas podem ser tratados com as composições terapêuticas de acordo com a invenção.

Análise dos Anticorpos Anti-TR4

Utilizando o ensaio acima, os vários scFVs aqui descritos que tinham sido convertidos em moléculas de IgG1 inteiras foram testados quanto à aptidão para induzir a apoptose de células que expressam TR4 1 (TR4). O formato de IgG1 do T1014A04 induz a apoptose de células SW480 na presença de um agente de

reticulação, mas na ausência de ciclo-heximida. Na presença de ciclo-heximida, mas com ou sem um reagente de reticulação, o formato de IgG1 do T1014A04 induz a apoptose de células SW480 e HeLa. A morte de células SW480 e HeLa por tratamento com o formato de IgG1 do T1014A04 na presença de ciclo-heximida é maior quando é também utilizado reagente de reticulação. De facto, na presença de reagente de reticulação e ciclo-heximida, o formato de IgG1 do T1014A01 é capaz de induzir mais apoptose do que uma concentração igual (em ng/mL) de TRAIL solúvel. O formato de IgG1 do T1015A02 não induz morte na ausência do agente de sensibilização ciclo-heximida. Na presença de ciclo-heximida, com ou sem um reagente de reticulação, o formato de IgG1 do T1015A02 induz a apoptose de células SW480 mas não de células HeLa. A morte de SW480 por tratamento com o formato de IgG1 do T1015A02 é maior na presença de um reagente de reticulação.

Além disso, o ensaio descrito neste exemplo pode ser também utilizado para testar o efeito de mais do que um anticorpo anti-TR4 sobre células que expressam TR4. Por exemplo, as células podem ser tratadas com um anticorpo que liga especificamente TR4 e um anticorpo que liga especificamente TR7. Como acima, esta experiência pode ser realizada na presença ou ausência de um ou mais agentes quimioterapêuticos ou agentes de reticulação. Noutra variante da presente experiência, os anticorpos aqui descritos podem ser testados quanto ao efeito de indução de apoptose quando utilizados na presença de TRAIL. A quantidade de apoptose induzida pelo tratamento duplo com anti-TR4 e anti-TR7 pode ser sinérgico em comparação com o tratamento com anti-TR4 ou anti-TR7 sozinho. Um tal efeito pode ser mais pronunciado quando a experiência é realizada na presença de agentes quimioterapêuticos e/ou de reticulação.

Exemplo 5:

Identificação e Clonagem de domínios VH e VL

Um método para identificar e clonar domínios VH e VL de linhas de células que expressam um anticorpo particular consiste em realizar PCR com iniciadores específicos de VH e VL em ADNc preparado a partir das linhas de células que expressam o anticorpo. Resumidamente, o ARN é isolado das linhas de células e utilizado como uma cadeia molde para RT-PCR concebida para amplificar os domínios VH e VL dos anticorpos expressos pelas linhas de células de EBV. As células podem ser submetidas a lise no reagente TRIzol[®] (Life Technologies, Rockville, MD) e extraídas com um quinto do volume de clorofórmio. Após adição de clorofórmio, a solução é deixada incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugada a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C numa centrífugadora de bancada. O sobrenadante é recolhido e o ARN é precipitado utilizando um volume igual de isopropanol. O ARN precipitado é sedimentado centrifugando a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C numa centrífugadora de bancada. Após centrifugação, o sobrenadante é rejeitado e lavado com etanol a 75%. Após lavagem, o ARN é novamente centrifugado a 800 rpm durante 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante é rejeitado e o sedimento deixado secar ao ar. O ARN é dissolvido em água DEPC e aquecido a 60 °C durante 10 minutos. As quantidades de ARN podem ser determinadas utilizando medições de densidade óptica.

O ADNc pode ser sintetizado, de acordo com métodos bem conhecidos na técnica, a partir de 1,5-2,5 microgramas de ARN utilizando transcriptase inversa e iniciadores hexaméricos

aleatórios. O ADNc é, em seguida, utilizado como uma cadeia molde para amplificação por PCR dos domínios VH e VL. Os iniciadores utilizados para amplificar os genes de VH e VL são mostrados no Quadro 6. Tipicamente, uma reacção de PCR utiliza um único iniciador 5' e um único iniciador 3'. Por vezes, quando a quantidade de cadeia molde de ARN disponível é limitativa, ou para maior eficiência, podem ser utilizados grupos de iniciadores 5' e/ou 3'. Por exemplo, por vezes são utilizados todos os cinco iniciadores VH-5' e todos os iniciadores JH3' numa única reacção de PCR. A reacção de PCR é realizada num volume de 50 microlitros contendo tampão de PCR 1X, 2mM de cada dNTP, 0,7 unidades de Taq-polimerase de Alta Fidelidade, mistura de iniciadores 5', mistura de iniciadores 3' e 7,5 microlitros de ADNc. A mistura de iniciadores 5' e 3' de ambos VH e VL pode ser feita misturando em conjunto 22 pmole e 28 pmole, respectivamente, de cada um dos iniciadores individuais. As condições de PCR são: 96 °C durante 5 minutos; seguida de 25 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto, e 72 °C durante 1 minuto; seguida de um ciclo de extensão de 72 °C durante 10 minutos. Depois de a reacção estar concluída, os tubos de amostra foram conservados 4 °C.

Quadro 6: Sequências Iniciadoras Utilizadas para Amplificar os domínios VH e VL.

Nome do iniciador	SEQ ID Nº	Sequência do Iniciador (5'-3')
Iniciadores de VH		
VH1-5' Hu	6	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
VH2-5' Hu	7	CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG
VH3-5' Hu	8	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
VH4-5' Hu	9	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG

Nome do iniciador SEQ ID Nº Sequência do Iniciador (5'-3')

Iniciadores de VH

VH5-5' Hu	10	GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC
VH6-5' Hu	11	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
JH1,2-5' Hu	12	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
JH3-5' Hu	13	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC
JH4,5-5' Hu	14	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
JH6-5' Hu	15	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC

Iniciadores de VL

Vkappa1-5' Hu	16	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
Vkappa2a-5' Hu	17	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC
Vkappa2b-5' Hu	18	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC
Vkappa3-5' Hu	19	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC
Vkappa4-5' Hu	20	GACATCGTGATGACCCAGTCTCC
Vkappa5-5' Hu	21	GAAACGACACTCACGCAGT
Vkappa6-5' Hu	22	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC
Vlambda1-5' Hu	23	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Vlambda2-5' Hu	24	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
Vlambda3-5' Hu	25	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Vlambda3b-5' Hu	26	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Vlambda4-5' Hu	27	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Vlambda5-5' Hu	28	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
Vlambda6-5' Hu	29	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA
Jkappa1-3' Hu	30	ACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCC
Jkappa2-3' Hu	31	ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
Jkappa3-3' Hu	32	ACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC
Jkappa4-3' Hu	33	ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC
Jkappa5-3' Hu	34	ACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC
Jlambda1-3' Hu	35	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Jlambda2-3' Hu	36	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC

(continuação)

Nome do iniciador	SEQ ID Nº	Sequência do Iniciador (5'-3')
-------------------	-----------	--------------------------------

Iniciadores de VL

Jlambda3--3' Hu	37	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Jlambda3b-3' Hu	38	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Jlambda4-3' Hu	39	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Jlambda5-3' Hu	40	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
Jlambda6-3' Hu	41	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA

As amostras de PCR são em seguida submetidas a electroforese num gel de agarose a 1,3%. As bandas de ADN dos tamanhos esperados (~506 pares de bases para os domínios VH e 344 pares de bases para os domínios VL) podem ser cortadas do gel e purificadas utilizando métodos bem conhecidos na técnica. Os produtos de PCR purificados podem ser ligados num vector de clonagem de PCR (vector TA de Invitrogen Inc., Carlsbad, CA). os produtos de PCR clonados individuais podem ser isolados após transfecção de E. coli e selecção de cor azul/branca. Os produtos de PCR clonados podem ser depois sequenciados utilizando métodos geralmente conhecidos na técnica.

Exemplo 6: Anticorpos Anti-TR4 Retardam o Crescimento de Células Tumoriais em Ratinhos Glabros.

A linha de células tumorais SW480 (adenocarcinoma colorrectal) foi mantida *in vitro* em meio L-15 de Leibovitz suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antibióticos de acordo com as instruções recebidas da American Type Culture Collection. As células das repicagens 3-10 foram utilizadas para os estudos *in vivo*. As células tumorais foram colhidas dos balões T-150, lavadas com PBS estéril e, em seguida,

ressuspensas em soro fisiológico estéril a uma densidade de 5(10⁴) células/ul. As células tumorais foram implantadas por via subcutânea no dorso superior ou flancos de ratinhos Suíços atímicos a uma densidade de 10⁷ células por sítio, 2 sítios por animal. Nos modelos tumorais profiláticos (de novo), os tratamentos com agentes quimioterapêuticos e anticorpo foram iniciados 24 h após inoculação das células tumorais.

O tratamento com anticorpo, com um anticorpo compreendendo o domínio VH e VL de T1014A04 ou T1014G03 (neste exemplo a seguir "T1014A04" ou "T1014G03"), foi como se segue: dose de carga: 20 mg/kg, por via intravenosa 24 horas após injeção das células tumorais com doses de manutenção de 10 mg/kg, por via intraperitoneal. As doses de manutenção de T1014A04 foram dadas aos quatro, sete, dez, treze e dezasseis dias. As doses de manutenção de T1014G03 foram dados aos quatro, sete, dez, catorze, vinte e dois e vinte e cinco dias. O topotecano foi o agente quimioterapêutico utilizado nesta experiência. Na experiência com T1014A04, a dose e frequência de administração do Topotecano foi como se segue: 0,3 ou 0,6 mg/kg, por via intraperitoneal no primeiro, segundo, terceiro, quarto, sétimo, décimo, décimo quarto, décimo oitavo, vigésimo segundo e vigésimo quinto dias da experiência. Na experiência com T1014G03, a dose e frequência de administração de Topotecano foi como se segue: 0,3 ou 0,6 mg/kg, por via intraperitoneal no primeiro, segundo, terceiro, quarto, sétimo, décimo, décimo terceiro e décimo sexto dias da experiência.

Quando o T1014A04 ou T1014G03 foi administrado com topotecano foi observada uma redução significativa no tamanho do tumor. O tratamento com o anticorpo sozinho pode reduzir o

crescimento de tumor nos últimos pontos no tempo. (ver Figuras 1-3).

O ensaio descrito acima pode ser também utilizado para testar o efeito do tratamento com mais do que um anticorpo anti-TR4 no crescimento de células tumorais *in vivo*. Por exemplo, os animais em que foram injectadas células tumorais podem ser tratados com um anticorpo que liga especificamente TR4 e um anticorpo que liga especificamente TR7. Como acima, esta experiência pode ser realizada na presença ou ausência de um ou mais agentes quimioterapêuticos. Noutra variante da presente experiência, os anticorpos aqui descritos podem ser administrados em associação com TRAIL. A aptidão de uma tal terapia de associação para inibir o crescimento de células tumorais em comparação com o tratamento com qualquer um dos anticorpos sozinhos pode ser avaliada utilizando os métodos detalhados acima e comparando os resultados obtidos entre a terapia de associação com os resultados obtidos para o tratamento com um anticorpo anti-TR4 ou anti-TR7 sozinho.

Exemplo 7: Efeito de Anticorpos Anti-TR4 sobre Hepatócitos Humanos.

O efeito de T1014G03 (lote AB22125-M2) em hepatócitos primários humanos foi determinado medindo a activação da caspase ou a viabilidade celular. Os hepatócitos humanos foram tratados com 15,6, 62,5, 250 ou 1000 ng/mL de TRAIL (resíduos de aminoácido 114-281, Biomol Research Laboratories Inc, Plymouth Meeting, PA), 62,5, 125, 250 ou 1000 ng/mL de mAb de controlo de isotipo (hIgG₁, CAT002) ou 62,5, 125, 250 ou 1000 ng/mL de T1014G03. A activação da caspase foi determinada às 6 h após

tratamento, enquanto a viabilidade foi determinada às 24 h após tratamento.

A actividade da caspase foi medida utilizando um ensaio fluorimétrico utilizando o substrato de caspase DEVD conjugado com Rodamina, (e. g., Ensaio Fluorimétrico Homogéneo de Caspases disponível de Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN)). A viabilidade celular foi determinada utilizando um ensaio com Azul de ALAMAR™ (Biosource International, Camarillo, CA). O TRAIL reduziu a viabilidade celular a todas as concentrações testadas e induziu a actividade caspase à concentração mais alta testada. Em contraste com o TRAIL, determinou-se que o tratamento com T1014G03 não afecta a caspase ou a viabilidade celular em hepatócitos Humanos.

Exemplo 8: Modelo de Xenoenxerto de Carcinoma Uterino RL95-2

O objectivo desta experiência foi examinar se o T1014G03 é capaz de alterar o padrão de crescimento do tumor RL95-2 em ratinhos atímicos quando é utilizado T1014G03 como um agente único.

A RL95-2 é um linha de células de adenocarcinoma uterino que forma tumores sólidos quando injectada por via subcutânea em ratinhos atímicos. Foi demonstrado que as células RL95-2 expressam TRAIL-R1 e são sensíveis *in vitro* a apoptose induzida por T1014G03 na ausência de qualquer agente de sensibilização. Com base nestas observações, o modelo de RL95-2 em ratinhos atímicos foi seleccionado para testar a eficácia *in vivo* de T1014G03 na redução de tumores preexistentes. Nestas

experiências, o T1014F08 serviu como um controlo negativo (huIgG λ). O T1014F08 liga o TRAIL-R1, mas não foi observado como tendo actividade agonista.

Células RL95-2 na fase log foram injectadas SC (10 milhões células /ratinho) em ratinhos glabros. Após 3 dias, o tamanho do tumor foi determinado e os animais foram segregados em vários grupos de tratamento (6 animais /grupo de tratamento) de tal forma que todos os grupos de tratamento tinham um tumor com 5x5 mm de tamanho. Os ratinhos foram injectados (IP) com anticorpos T1014G03 ou T1014F08 em doses de 0,2, 2,0 e 20 mg/Kg nos dias 4, 8, 12 e 16. O tamanho do tumor foi seguido duas vezes por semana do dia 3 até ao dia 43. Ratinhos que receberam veículo de injeção (soro fisiológico) serviram como controlo. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney e são expressos como número de vezes de aumento do tamanho do tumor relativamente ao tamanho do tumor no dia 3. O crescimento do tumor foi, significativamente, atrasado em ratinhos tratados com anticorpo T1014G03 a 20 mg/Kg em comparação com os animais de controlo e tratados com T1014F08. O efeito do anticorpo T1014G03 a 0,2 e 2,0 mg/Kg não foi significativamente diferente do controlo. Os dados demonstram a aptidão do T1014G03 para inibir o crescimento de células tumorais preestabelecidas.

O ensaio descrito acima pode ser também utilizado para testar o efeito do tratamento com mais do que um anticorpo anti-TR4 no crescimento de tumores preestabelecidos *in vivo*. Por exemplo, os animais em que foram injectadas células tumorais podem ser tratados com um anticorpo que liga especificamente TR4 e um anticorpo que liga especificamente TR7. Como acima, esta experiência pode ser realizada na presença ou ausência de um ou

mais agentes quimioterapêuticos. Noutra variante da presente experiência, os anticorpos aqui descritos podem ser administrados em associação com TRAIL. A aptidão dessa terapia de associação para inibir o crescimento de tumores ou mesmo eliminar os tumores em comparação com o tratamento com qualquer um dos anticorpos sozinhos pode ser avaliada utilizando os métodos detalhados acima e comparando os resultados obtidos entre a terapia de associação com os resultados obtidos do tratamento com um anticorpo anti-TR4 ou anti-TR7 sozinho.

Exemplo 9: Imuno-histoquímica do tecido tumoral primário para expressão da expressão de TRAIL R1 (TR4).

Tecidos de tumores primários humanos da bexiga, mama, cólon, fígado, pulmão, ovário e pâncreas foram revelados com um anticorpo policlonal de cabra anti-TRAIL-R1 humano (R&D Systems). Este anticorpo revela células transfectadas com construções de expressão de TRAIL-R1, mas não células transfectadas com o vector de controlo. Os dados da revelação são apresentados abaixo no Quadro 7. Foi observada revelação positiva em certos tecidos de carcinoma da mama, cólon, pulmão e estômago. Em contraste, as amostras de tecido humano normal dos mesmos órgãos não tinham qualquer revelação específica. Além disso, não foi observada qualquer revelação específica em amostras de fígado e baço humano e de macaco normais.

Quadro 7: Revelação Imuno-histoquímica de Tecidos Tumoriais e Normais Humanos

Tecido Tumoral	Nº Avaliado	Positiva	+/-	Negativa
Bexiga	2	0	1	1
Mama	2	1	0	1
Cólon	2	1	1	0
Fígado	2	0	1	1
Pulmão	2	2	0	1
Ovário	1	0	0	1
Pâncreas	2	0	0	2
Estômago	1	1	0	0
Total	14	5	3	6
Normal Tecido				
Bexiga	1	0	0	1
Mama	0	0	0	0
Cólon	1	0	0	1
Fígado	1	0	1	0
Pulmão	1	0	0	1
Ovário	1	0	0	1
Pâncreas	1	0	0	1
Estômago	0	0	0	0
Total	6	0	1	5

Exemplo 10: Produção e Purificação do Anticorpo

O seguinte exemplo descreve métodos de produção e purificação de anticorpo em grande escala que podem ser utilizados para preparar os anticorpos da presente invenção. Um especialista na técnica estará ciente das modificações de rotina

ao protocolo descrito abaixo, por exemplo, quanto à escolha da coluna, coluna, tampões de carga, lavagem e eluição, e pH.

Aumento de Escala da Cultura de Células e Produção de Anticorpo

É utilizado um meio de crescimento isento de soro e isento de fontes animais (HGS-NS0SF) desde a descongelação das células, ao longo do aumento de escala até ao biorreactor de produção. O meio de crescimento HGS-NS0SF é preparado adicionando 20 mL/L de suplemento GS e 1 mL/L de concentrado de lípido de colesterol (sintético) em 1 L de meio de hibridoma CD sem l-glutamina (Invitrogen/Life Technologies). Os meios são conservados a 2-8 °C até à sua utilização.

Descongelação de células de Frasco(s) MCB

Aproximadamente 16×10^6 células são descongeladas a 37 °C num banho de água. As células são transferidas para balão/balões de cultura T-225 para produzir um volume de trabalho de aproximadamente 50 mL com uma densidade de inoculação de aproximadamente $3,0 \times 10^5$ células/mL. O balão ou balões de cultura são, em seguida, colocados numa incubadora de CO₂ humidificada a 37 °C com 5% de CO₂ durante 4 dias.

Primeira(s) Expansão ou Expansões de Cultura em Balão Giratório

A cultura é expandida de forma asséptica num balão giratório de 500 mL para dar, aproximadamente, 300 mL de volume

de trabalho, a uma densidade celular de inoculação de aproximadamente $2,2 \times 10^5$ células/mL. O balão giratório é em seguida colocado sobre agitadores magnéticos numa incubadora de CO₂ humidificada a 37 °C com 5% de CO₂ durante 4 dias. A velocidade de agitação para o balão giratório é 80 rpm.

A cultura é novamente expandida de forma asséptica num balão giratório de 3000 mL para dar aproximadamente 1500 mL de volume de trabalho, a uma densidade celular de inoculação de aproximadamente $2,2 \times 10^5$ células/mL. O balão giratório é em seguida colocado sobre agitadores magnéticos numa incubadora de CO₂ humidificada a 37 °C com 5% de CO₂ durante 4 dias. A velocidade de agitação para os balões giratórios é 80 rpm. Se houver acumulada uma quantidade suficiente de cultura de células para inocular o biorreactor de sementeira, prosseguir para o Passo 4. Se não, a cultura é expandida de forma asséptica em múltiplos balões giratórios de 3000 mL durante um total de 3 a 4 expansões, até ser acumulada uma quantidade suficiente de cultura de células para inocular o biorreactor de sementeira.

Cultura de Sementeira

O biorreactor de sementeira é munido de 2 impulsores para misturar, uma sonda de oxigénio dissolvido, uma sonda de temperatura, uma sonda de pH, amostragem asséptica e sistemas adicionais. O primeiro passo do processo de cultura de células é a adição de meio HGS-NS0SF ao biorreactor. Depois da temperatura do meio HGS-NS0SF atingir $37 \pm 0,5$ °C, os níveis de oxigénio dissolvido (DO) e pH são estabilizados por adição de N₂ e CO₂ para diminuir a concentração de oxigénio dissolvido para $30 \pm 5\%$ de saturação do ar e obter um pH de $7,20 \pm 0,10$. A velocidade de

agitação é de 80 rpm. A cultura de células conjunta é transferida de forma asséptica para um biorreactor de sementeira de 15 L contendo meio de crescimento HGS-NS0SF estéril para produzir uma cultura com uma densidade celular de inoculação de, aproximadamente, $2,2 \times 10^5$ células/mL. Durante o processo de cultivo a temperatura é mantida através de uma manta de aquecimento e um dedo de refrigeração, a concentração de oxigénio é mantida através de um aspensor e arejamento da superfície, e o pH é controlado por adição de CO₂ gasoso para diminuir o pH. O período de cultivo é de 5-6 dias. As saídas de ar do biorreactor são protegidas com filtros hidrófobos de 0,2 µm para respiradouros.

Cultura de Produção

O biorreactor de produção é munido de 2 impulsores para misturar, 2 sondas de oxigénio dissolvido, uma sonda de temperatura, 2 sondas de pH, amostragem asséptica e sistemas adicionais. São assepticamente transferidos 80 L de meio de crescimento HGS-NS0SF para o biorreactor de produção de 100 L. Depois da temperatura do meio de crescimento HGS-NS0SF atingir $37 \pm 0,5$ °C, os níveis de DO e pH são estabilizados por adição de N₂ e CO₂ para diminuir a concentração de oxigénio dissolvido para $30 \pm 5\%$ de saturação do ar e obter um pH de $7,20 \pm 0,10$. A velocidade de agitação é 45 rpm. A cultura de sementeira de 15 L é transferida de forma asséptica para o biorreactor de produção para produzir um cultura com uma densidade celular de inoculação de, aproximadamente, $2,2 \times 10^5$ células/mL. Durante o processo de cultivo a temperatura é mantida através de um permutador de calor, a concentração de oxigénio é mantida através de um aspensor e arejamento da superfície, e o pH é controlado por

adição de CO₂ gasoso para diminuir o pH. No dia 3 após inoculação quando a densidade celular atinge aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/mL, foram fornecidos em lote, aproximadamente, 6 L de meio HGS-NS0SF ao biorreactor de produção. A cultura de produção contendo o anticorpo foi colhida no Dia 5 após a alimentação.

Recuperação e Purificação

Colheita do Sobrenadante das Células

O sobrenadante das células, (e. g., sobrenadante da cultura de células NS0 que expressam anticorpos aqui descritos) é colhida no dia 5 ou 6 após a alimentação final no biorreactor de produção final utilizando um processo de cultura de células em lote. O processo de colheita é iniciado quando é obtida uma concentração de anticorpo de pelo menos 400 mg/L. A temperatura da cultura de células no biorreactor de produção é arrefecida até 15 °C na altura da colheita e mantida a essa temperatura durante a recuperação. É utilizado um processo de filtração de profundidade para remoção das células e recuperação do anticorpo. A sequência do processo de filtração consiste de filtros de 4,5 µm, 0,45 µm e 0,2 µm de tamanho de poro ligados em série. É mantido um caudal constante de 1,00 L/min durante a operação com um controlo de pressão através dos filtros de 15 psi. O sobrenadante da cultura filtrado através de 0,2 µm é recolhido num saco de processo e transferido para purificação.

O processo de purificação é realizado a 22 a 26 °C.

Cromatografia em Coluna MEP HyperCEL HCIC

O sobrenadante da cultura é carregado numa coluna MEP HyperCEL™, uma cromatografia de interacção de Carga Hidrófoba, HCIC, disponível de Ciphergen Biosystems, ou coluna equivalente que é equilibrada em Tris 50 mM, cloreto de sódio 0,5 M, pH 7,5. A coluna MEP é lavada com citrato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 0,15 M, pH 6,4 e eluída com citrato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 0,15 M, pH 4,4. A eluição é seguida por absorvância no ultravioleta (UV) a 280 nm. As fracções dos picos são recolhidas, analisadas por A₂₈₀ e SDS-PAGE. As fracções apropriadas são misturadas.

Inactivação do Vírus

O eluato da coluna MEP é ajustado com ácido cítrico 1 M a pH 3,4 ± 0,2 e deixado em repouso durante 45-60 minutos para inactivação viral. A solução é em seguida reajustada a pH 5,0 com base Tris 1 M.

Cromatografia em Coluna de SP Sepharose FF

O eluato inactivado da coluna MEP é diluído com água para preparação injectável (WFI) até uma condutividade de 5 mS/cm, e carregado numa coluna de SP Sepharose FF (cromatografia de troca catiónica, Amersham-Pharmacia) ou coluna equivalente equilibrada com acetato de sódio 65 mM, pH 5,0. O anticorpo é eluído da coluna SP com citrato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,15 M, 1,9% de glicina, pH 7,1. A eluição é seguida por absorvância no ultravioleta (UV) a 280 nm. As fracções dos picos são recolhidas

e analisadas por A_{280} e SDS-PAGE. As fracções apropriadas são misturadas.

Filtração, Diafiltração e Concentração para Remoção do Vírus

O eluato da coluna de SP Sepharose FF é filtrado através de um filtro de 0,2 μm sequencialmente ligado e um filtro Pall DV50 para remoção do vírus. O filtrado do DV50 é colocado num dispositivo de membrana de corte de PM 30kD (Millipore Pellicon) para concentrar até uma concentração alvo de 35-40 mg/mL, e diafiltrado contra citrato de sódio 10 mM, 1,9% de glicina, 0,5% de sacarose, pH 6,5. O material diafiltrado é seguido por A_{280} . O diafiltrado em bruto é filtrado através de 0,2 μm e conservado a 2-8 °C até 24 horas.

Cromatografia em Coluna de Q Sepharose FF

A solução TRM-1 diafiltrada é feita passar sobre uma coluna de Q Sepharose FF (cromatografia de troca aniónica, Amersham-Pharmacia) ou coluna equivalente equilibrada com citrato de sódio 10 mM, 1,9% de glicina, 0,5% de sacarose, pH 6,5. O anticorpo é recolhido no caudal de saída e seguido por A_{280} . As fracções apropriadas são misturadas e a concentração alvo final é 25 mg/mL.

Formulação em Bruto, Filtração e Carga de Substância Farmacológica em Bruto

Polissorbato 80 (solução-mãe a 2%) é pré-filtrado através de um filtro de 0,2 μm e adicionado à solução de anticorpo do

passo 7 até uma concentração final de 0,02%. O anticorpo purificado é filtrado de maneira asséptica numa hotte de fluxo laminar através de um filtro de 0,2 µm e introduzido em recipientes de polipropileno.

Conservação da Substância Farmacológica em Bruto

A substância farmacológica em bruto é conservada a 2-8 °C (conservação de duração curta) ou a ou abaixo de -65 °C (conservação de duração longa) antes da libertação do produto. São realizadas análises de processo da cultura do biorreactor de produção não processada na altura da colheita para cada lote e análises de processo durante o processo de purificação. O biorreactor é submetido a amostragem asséptica e a cultura é testada várias vezes ao longo da cultura quanto à densidade celular, viabilidade e determinação de nutrientes para assegurar consistência do material a ser fornecido para purificação. O processo de purificação é seguido em cada passo. O aspecto é verificado por inspecção visual. A concentração de proteína é determinada por Absorvância a 280 nm. O pH do material é verificado. A pureza é verificada, por exemplo, por SDS-PAGE e cromatografia de exclusão molecular. Pode ser realizado um ELISA para verificar a aptidão do anticorpo para ligar o seu antigénio. A actividade biológica do anticorpo é também seguida. O teor de ADN residual, níveis de Endotoxinas e a carga biológica (o número de organismos viáveis presentes na preparação de anticorpo) são todos seguidos e mantidos aos níveis padrão aceitáveis ou abaixo. Adicionalmente pode ser analisado o teor de oligossacáridos; a sequência peptídica das cadeias de anticorpo pode ser também analisada utilizando sequenciação N-terminal e mapeamento de péptidos. Podem ser

também realizados estudos da estabilidade do anticorpo de curta e longa duração.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Human Genome Sciences, Inc.

<120> Anticorpos que se Ligam Imunoespecificamente aos Receptores de TRAIL

<130> PF550PCT

<140> Não conhecido

<141> 2002-05-07

<150> 60/369860

<151> 2002-04-05

<150> 60/341237

<151> 2001-12-20

<150> 60/331310

<151> 2001-11-14

<150> 60/331044

<151> 2001-11-07

<150> 60/327364

<151> 2001-10-09

<150> 60/323807
<151> 2001-09-21

<150> 60/309176
<151> 2001-08-02

<150> 60/294981
<151> 2001-06-04

<150> 60/293473
<151> 2001-05-25

<160> 66

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 468
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Ser Ala Arg Ala Arg Ala Gly Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala Arg
 65 70 75 80
 Glu Ala Ser Pro Arg Leu Arg Val His Lys Thr Phe Lys Phe Val Val
 85 90 95
 Val Gly Val Leu Leu Gln Val Val Pro Ser Ser Ala Ala Thr Ile Lys
 100 105 110
 Leu His Asp Gln Ser Ile Gly Thr Gln Gln Trp Glu His Ser Pro Leu
 115 120 125
 Gly Glu Leu Cys Pro Pro Gly Ser His Arg Ser Glu Arg Pro Gly Ala
 130 135 140
 Cys Asn Arg Cys Thr Glu Gly Val Gly Tyr Thr Asn Ala Ser Asn Asn
 145 150 155 160
 Leu Phe Ala Cys Leu Pro Cys Thr Ala Cys Lys Ser Asp Glu Glu Glu
 165 170 175
 Arg Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Ala Cys Gln Cys Lys Pro
 180 185 190
 Gly Thr Phe Arg Asn Asp Asn Ser Ala Glu Met Cys Arg Lys Cys Ser
 195 200 205
 Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val Lys Val Lys Asp Cys Thr Pro Trp
 210 215 220
 Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Asn Gly His Asn Ile
 225 230 235 240
 Trp Val Ile Leu Val Val Thr Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Val Ala
 245 250 255
 Val Leu Ile Val Cys Cys Cys Ile Gly Ser Gly Cys Gly Gly Asp Pro
 260 265 270
 Lys Cys Met Asp Arg Val Cys Phe Trp Arg Leu Gly Leu Leu Arg Gly
 275 280 285
 Pro Gly Ala Glu Asp Asn Ala His Asn Glu Ile Leu Ser Asn Ala Asp
 290 295 300
 Ser Leu Ser Thr Phe Val Ser Glu Gln Gln Met Glu Ser Gln Glu Pro
 305 310 315 320
 Ala Asp Leu Thr Gly Val Thr Val Gln Ser Pro Gly Glu Ala Gln Cys
 325 330 335
 Leu Leu Gly Pro Ala Glu Ala Glu Gly Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu
 340 345 350
 Val Pro Ala Asn Gly Ala Asp Pro Thr Glu Thr Leu Met Leu Phe Phe
 355 360 365
 Asp Lys Phe Ala Asn Ile Val Pro Phe Asp Ser Trp Asp Gln Leu Met
 370 375 380

Arg Gln Leu Asp Leu Thr Lys Asn Glu Ile Asp Val Val Arg Ala Gly
 385 390 395 400
 Thr Ala Gly Pro Gly Asp Ala Leu Tyr Ala Met Leu Met Lys Trp Val
 405 410 415
 Asn Lys Thr Gly Arg Asn Ala Ser Ile His Thr Leu Leu Asp Ala Leu
 420 425 430
 Glu Arg Met Glu Glu Arg His Ala Lys Glu Lys Ile Gln Asp Leu Leu
 435 440 445
 Val Asp Ser Gly Lys Phe Ile Tyr Leu Glu Asp Gly Thr Gly Ser Ala
 450 455 460
 Val Ser Leu Glu
 465

<210> 2

<211> 299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Gln	Gly	Val	Lys	Glu	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Gly	Asn	Ser	Gly	Asp	1	5	10	15
Arg	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Asp	Gly	Arg	Gly	Arg	Val	Arg	Pro	Arg	Thr	20	25	30	
Gln	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	His	Thr	Met	Ala	Arg	Ile	Pro	Lys	Thr	Leu	35	40	45	
Lys	Phe	Val	Val	Val	Ile	Val	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Ala	Tyr	50	55	60	
Ser	Ala	Thr	Thr	Ala	Arg	Gln	Glu	Glu	Val	Pro	Gln	Gln	Thr	Val	Ala	65	70	75	80
Pro	Gln	Gln	Gln	Arg	His	Ser	Phe	Lys	Gly	Glu	Glu	Cys	Pro	Ala	Gly	85	90	95	
Ser	His	Arg	Ser	Glu	His	Thr	Gly	Ala	Cys	Asn	Pro	Cys	Thr	Glu	Gly	100	105	110	
Val	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ala	Ser	Asn	Asn	Glu	Pro	Ser	Cys	Phe	Pro	Cys	115	120	125	
Thr	Val	Cys	Lys	Ser	Asp	Gln	Lys	His	Lys	Ser	Ser	Cys	Thr	Met	Thr	130	135	140	
Arg	Asp	Thr	Val	Cys	Gln	Cys	Lys	Glu	Gly	Thr	Phe	Arg	Asn	Glu	Asn	145	150	155	160

Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Ser Arg Cys Pro Ser Gly Glu Val
 165 170 175
 Gln Val Ser Asn Cys Thr Ser Trp Asp Asp Ile Gln Cys Val Glu Glu
 180 185 190
 Phe Gly Ala Asn Ala Thr Val Glu Thr Pro Ala Ala Glu Glu Thr Met
 195 200 205
 Asn Thr Ser Pro Gly Thr Pro Ala Pro Ala Ala Glu Glu Thr Met Asn
 210 215 220
 Thr Ser Pro Gly Thr Pro Ala Pro Ala Ala Glu Glu Thr Met Thr Thr
 225 230 235 240
 Ser Pro Gly Thr Pro Ala Pro Ala Ala Glu Glu Thr Met Thr Thr Ser
 245 250 255
 Pro Gly Thr Pro Ala Pro Ala Ala Glu Glu Thr Met Thr Thr Ser Pro
 260 265 270
 Gly Thr Pro Ala Ser Ser His Tyr Leu Ser Cys Thr Ile Val Gly Ile
 275 280 285
 Ile Val Leu Ile Val Leu Leu Ile Val Phe Val
 290 295

<210> 3

<211> 411

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Cys	Leu	Arg	Cys	Thr	Arg	Cys	Asp	Ser	Gly	Glu	Val	Glu	Leu	Ser	Pro	115	120	125	
Cys	Thr	Thr	Thr	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Gln	Cys	Glu	Glu	Gly	Thr	Phe	130	135	140	
Arg	Glu	Glu	Asp	Ser	Pro	Glu	Met	Cys	Arg	Lys	Cys	Arg	Thr	Gly	Cys	145	150	155	160
Pro	Arg	Gly	Met	Val	Lys	Val	Gly	Asp	Cys	Thr	Pro	Trp	Ser	Asp	Ile	165	170	175	
Glu	Cys	Val	His	Lys	Glu	Ser	Gly	Ile	Ile	Ile	Gly	Val	Thr	Val	Ala	180	185	190	
Ala	Val	Val	Leu	Ile	Val	Ala	Val	Phe	Val	Cys	Lys	Ser	Leu	Leu	Trp	195	200	205	
Lys	Lys	Val	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	210	215	220	
Asp	Pro	Glu	Arg	Val	Asp	Arg	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro	Gly	Ala	Glu	Asp	225	230	235	240
Asn	Val	Leu	Asn	Glu	Ile	Val	Ser	Ile	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Val	Pro	245	250	255	
Glu	Gln	Glu	Met	Glu	Val	Gln	Glu	Pro	Ala	Glu	Pro	Thr	Gly	Val	Asn	260	265	270	
Met	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Ser	Glu	His	Leu	Leu	Glu	Pro	Ala	Glu	Ala	275	280	285	
Glu	Arg	Ser	Gln	Arg	Arg	Arg	Leu	Leu	Val	Pro	Ala	Asn	Glu	Gly	Asp	290	295	300	
Pro	Thr	Glu	Thr	Leu	Arg	Gln	Cys	Phe	Asp	Asp	Phe	Ala	Asp	Leu	Val	305	310	315	320
Pro	Phe	Asp	Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Met	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu	Met	Asp	325	330	335	
Asn	Glu	Ile	Lys	Val	Ala	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Arg	Asp	Thr	340	345	350	
Leu	Tyr	Thr	Met	Leu	Ile	Lys	Trp	Val	Asn	Lys	Thr	Gly	Arg	Asp	Ala	355	360	365	
Ser	Val	His	Thr	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	370	375	380	
Ala	Lys	Gln	Lys	Ile	Glu	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Phe	Met	385	390	395	400
Tyr	Leu	Glu	Gly	Asn	Ala	Asp	Ser	Ala	Met	Ser						405	410		

<210> 4

<211> 386

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met	Gly	Leu	Trp	Gly	Gln	Ser	Val	Pro	Thr	Ala	Ser	Ser	Ala	Arg	Ala
1				5					10					15	
Gly	Arg	Tyr	Pro	Gly	Ala	Arg	Thr	Ala	Ser	Gly	Thr	Arg	Pro	Trp	Leu
			20					25					30		
Leu	Asp	Pro	Lys	Ile	Leu	Lys	Phe	Val	Val	Phe	Ile	Val	Ala	Val	Leu
		35					40					45			
Leu	Pro	Val	Arg	Val	Asp	Ser	Ala	Thr	Ile	Pro	Arg	Gln	Asp	Glu	Val
	50					55					60				
Pro	Gln	Gln	Thr	Val	Ala	Pro	Gln	Gln	Gln	Arg	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu
65					70					75					80
Glu	Glu	Cys	Pro	Ala	Gly	Ser	His	Arg	Ser	Glu	Tyr	Thr	Gly	Ala	Cys
				85					90					95	
Asn	Pro	Cys	Thr	Glu	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Ala	Ser	Asn	Asn	Leu
			100					105					110		
Pro	Ser	Cys	Leu	Leu	Cys	Thr	Val	Cys	Lys	Ser	Gly	Gln	Thr	Asn	Lys
		115					120					125			
Ser	Ser	Cys	Thr	Thr	Thr	Arg	Asp	Thr	Val	Cys	Gln	Cys	Glu	Lys	Gly
	130					135					140				
Ser	Phe	Gln	Asp	Lys	Asn	Ser	Pro	Glu	Met	Cys	Arg	Thr	Cys	Arg	Thr
145					150					155					160
Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Met	Val	Lys	Val	Ser	Asn	Cys	Thr	Pro	Arg	Ser
				165					170					175	
Asp	Ile	Lys	Cys	Lys	Asn	Glu	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Thr	Gly	Lys	Thr
			180					185					190		
Pro	Ala	Ala	Glu	Glu	Thr	Val	Thr	Thr	Ile	Leu	Gly	Met	Leu	Ala	Ser
		195					200					205			
Pro	Tyr	His	Tyr	Leu	Ile	Ile	Ile	Val	Val	Leu	Val	Ile	Ile	Leu	Ala
	210					215						220			
Val	Val	Val	Val	Gly	Phe	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	Tyr	Leu
225					230					235					240
Lys	Gly	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Glu	Arg	Val	His	Arg
				245					250					255	

Val	Leu	Phe	Arg	Arg	Arg	Ser	Cys	Pro	Ser	Arg	Val	Pro	Gly	Ala	Glu			
			260					265					270					
Asp	Asn	Ala	Arg	Asn	Glu	Thr	Leu	Ser	Asn	Arg	Tyr	Leu	Gln	Pro	Thr			
		275					280					285						
Gln	Val	Ser	Glu	Gln	Glu	Ile	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Ala	Glu	Leu	Thr			
	290					295					300							
Gly	Val	Thr	Val	Glu	Ser	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	Arg	Leu	Leu	Glu	Gln			
305					310					315					320			
Ala	Glu	Ala	Glu	Gly	Cys	Gln	Arg	Arg	Arg	Leu	Leu	Val	Pro	Val	Asn			
				325					330					335				
Asp	Ala	Asp	Ser	Ala	Asp	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Asp	Ala	Ser	Ala	Thr			
			340					345					350					
Leu	Glu	Glu	Gly	His	Ala	Lys	Glu	Thr	Ile	Gln	Asp	Gln	Leu	Val	Gly			
	355						360					365						
Ser	Glu	Lys	Leu	Phe	Tyr	Glu	Glu	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser	Ala	Thr	Ser			
	370					375					380							
Cys	Leu																	
385																		

<210> 5

<211> 401

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Leu Tyr Cys Ser	Pro Val Cys Lys Glu	Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu	85	90	95
Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val	Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr		100	105	110
Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe			115	120	125
Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg			130	135	140
Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys			145	150	155
Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys			165	170	175
Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr			180	185	190
Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg			195	200	205
Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val			210	215	220
Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile			225	230	235
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu			245	250	255
Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln			260	265	270
Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala			275	280	285
Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly			290	295	300
Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys			305	310	315
Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn			325	330	335
Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser			340	345	350
Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr			355	360	365
Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu			370	375	380

Phe	Leu	Glu	Met	Ile	Gly	Asn	Gln	Val	Gln	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys
385					390					395					400

Leu

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 6

caggtgcagc tgggtgcagtc tgg 23

<210> 7

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 7

caggtcaact taagggagtc tgg 23

<210> 8

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 8

gaggtgcagc tgggtggagtc tgg 23

<210> 9

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 9

caggtgcagc tgcaggagtc ggg 23

<210> 10

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 10

gaggtgcagc tggttcagtc tgc 23

<210> 11

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 11

caggtacagc tgcagcagtc agg 23

<210> 12

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 12

tgaggagacg gtgaccaggg tgcc 24

<210> 13

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 13

tgaagagacg gtgaccattg tccc 24

<210> 14

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 14

tgaggagacg gtgaccaggg ttcc 24

<210> 15

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 15

tgaggagacg gtgaccgtgg tccc 24

<210> 16

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 16

gacatccaga tgaccagtc tcc 23

<210> 17

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 17

gatgttggtga tgactcagtc tcc 23

<210> 18

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 18

gatattgtga tgactcagtc tcc 23

<210> 19

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 19

gaaattgtgt tgacgcagtc tcc 23

<210> 20

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 20

gacatcgtga tgacccagtc tcc 23

<210> 21

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 21

gaaacgacac tcacgcagtc tcc 23

<210> 22

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 22

gaaattgtgc tgactcagtc tcc 23

<210> 23

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 23

cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

<210> 24

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 24

cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

<210> 25

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 25

tcctatgtgc tgactcagcc acc 23

<210> 26

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 26

tcttctgagc tgactcagga ccc 23

<210> 27

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 27

cacgttatac tgactcaacc gcc 23

<210> 28

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 28

caggctgtgc tcactcagcc gtc 23

<210> 29

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 29

aattttatgc tgactcagcc cca 23

<210> 30

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 30

acgtttgatt tccaccttgg tccc 24

<210> 31

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 31

acgtttgatc tccagcttgg tccc 24

<210> 32

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 32

acgtttgata tccactttgg tccc 24

<210> 33

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 33

acgtttgatc tccaccttgg tccc 24

<210> 34

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 34

acgtttaatc tccagtcgtg tccc 24

<210> 35

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 35

cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

<210> 36

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 36

cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

<210> 37

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 37

tcctatgtgc tgactcagcc acc 23

<210> 38

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 38

tcttctgagc tgactcagga ccc 23

<210> 39

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 39

cacgttatac tgactcaacc gcc 23

<210> 40

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 40

caggctgtgc tcactcagcc gtc 23

<210> 41

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR útil para amplificar domínios VH e VL

<400> 41

aattttatgc tgactcagcc cca 23

<210> 42

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1014A04 scFv

<400> 42

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly Asp Ser Phe Asn Ala Tyr
20 25 30

Phe Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Phe Asn Pro Asp Ser Gly Thr Ala Asp Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60
His Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80
Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Arg Gln His Arg Gly Asn Thr Phe Ala Pro Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala
130 135 140
Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Thr
145 150 155 160
Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro
165 170 175
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Gly Val Asn Gln Arg Pro Ser
180 185 190
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
195 200 205
Leu Thr Val Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
210 215 220
Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Leu Thr Val Leu Gly
245

<210> 43

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1014G03 scFv

<400> 43

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Met	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Arg	Val	Ser	Gly	Asp	Thr	Phe	Thr	Ala	Tyr	
			20					25					30			
Phe	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Trp	Phe	Asn	Pro	Ile	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ser	Ala	Glu	Lys	Phe	
	50					55					60					
Arg	Gly	Arg	Val	Ala	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Asn	Arg	Leu	Thr	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Gln	His	Arg	Gly	Asn	Thr	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
		115					120					125				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	
	130					135					140					
Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	
145					150					155					160	
Ser	Asp	Ile	Gly	Ala	Tyr	Lys	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	
				165					170				175			
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Val	Ile	Tyr	Glu	Val	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	
			180					185					190			
Gly	Val	Ser	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	
	195						200					205				
Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	
	210					215					220					
Asn	Ser	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Asn	Thr	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	
225					230					235					240	
Val	Thr	Val	Leu	Gly												
				245												

<210> 44

<211> 244

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1014A02 scFv

<400> 44

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ser Ile Asp Tyr Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Met Thr Ile Asp Lys Ser Lys Lys Gln Phe Pro Leu
65 70 75 80
Lys Ile Asp Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gln Leu Gly Arg Ile Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Ala Leu Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser
130 135 140
Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Ser Ser Ser
145 150 155 160
Asn Ile Gly Gly Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Ala Thr
165 170 175
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val
180 185 190
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala
195 200 205
Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr
210 215 220
Trp Asp Asp Ser Arg Gly Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240
Thr Val Leu Gly

<210> 45

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1014A12 scFv

<400> 45

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Asp	Val	Lys	Arg	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	Ala	Tyr
		20						25					30		
Phe	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Phe	Asn	Pro	Asp	Ser	Gly	Thr	Ala	Asp	Ser	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
His	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Phe
65					70					75					80
Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Val	Arg	Gln	His	Arg	Gly	Asn	Thr	Phe	Ala	Pro	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr
		100						105					110		
Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
	115					120						125			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val
	130					135					140				
Ser	Gly	Pro	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Ser
145					150					155					160
Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro
			165						170					175	
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Ile	Ile	His	Asp	Val	Ser	Arg	Arg	Pro	Ser
		180						185					190		
Glu	Val	Ser	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser
	195						200					205			
Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys
	210					215					220				
Ser	Ser	Tyr	Ser	Ser	Thr	Asn	Ser	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
225					230					235					240
Val	Thr	Val	Leu	Gly											
				245											

<210> 46

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1014B01 scFv

<400> 46

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	Ile	Ser	Gly	Asp	Thr	Phe	Ala	Ala	Tyr	
			20					25					30			
Phe	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Trp	Phe	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Ala	Asp	Ser	Ser	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
His	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65				70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Thr	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
		115				120						125				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gln	Ser	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	
	130					135					140					
Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	
	145				150					155					160	
Ser	Asp	Ile	Gly	Ala	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	His	Pro	
				165					170					175		
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Ile	Ile	Ser	Glu	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	
			180					185					190			
Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Leu	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	
		195					200					205				
Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	
	210					215					220					

Gly	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ser	Asn	Ile	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
225					230					235					240
Val	Thr	Val	Leu	Gly											
				245											

<210> 47

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1014B11 scFv

<400> 47

Glu	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	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	Ala	Tyr
			20					25					30		
Phe	Ile	His	Trp	Leu	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40						45			
Gly	Trp	Phe	Asn	Pro	Ile	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ser	Pro	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
His	Gly	Arg	Val	Ala	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65				70					75					80
Met	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gln	His	His	Ser	Asn	Thr	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
		100						105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val
	130					135					140				
Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Asn
145					150					155					160

Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro
			165						170					175	
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile	Tyr	Glu	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
		180						185					190		
Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser
		195					200					205			
Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys
	210					215					220				
Ser	Ser	Tyr	Thr	Thr	Ser	Asn	Thr	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
225					230					235					240
Leu	Thr	Val	Leu	Gly											
				245											

<210> 48

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1014F11 scFv

<400> 48

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

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Leu	Pro	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	130	135	140	
Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	145	150	155	160
Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	165	170	175	
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile	Tyr	Glu	Val	Ser	Met	Arg	Pro	Ser	180	185	190	
Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	195	200	205	
Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	210	215	220	
Ala	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ser	Asn	Asn	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	225	230	235	240
Leu	Thr	Val	Leu	Gly												245			

<210> 49

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1014G04 scFv

<400> 49

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Asp	Val	Lys	Arg	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	Ala	Tyr	
			20					25					30			
Phe	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Trp	Phe	Asn	Pro	Asp	Ser	Gly	Thr	Ala	Asp	Ser	Ala	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
His	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Phe	
65					70					75					80	
Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Val	Arg	Gln	His	Arg	Gly	Asn	Thr	Phe	Ala	Pro	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	
			100					105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
		115					120					125				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gln	Pro	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	
	130					135					140					
Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	
145					150					155					160	
Ser	Asp	Val	Gly	Ser	Tyr	Glu	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	
				165					170					175		
Gly	Lys	Ala	Pro	Arg	Leu	Met	Ile	Ser	Glu	Val	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	
			180					185					190			
Gly	Val	Pro	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	
		195					200					205				
Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	
	210					215					220					
Ser	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ser	Asn	Asn	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	
225					230					235					240	
Val	Thr	Val	Leu	Gly												
				245												

<210> 50

<211> 250

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1015A02 scFv

<220>

<221> SÍTIO

<222> (250)

<223> Xaa é igual a Gly ou Ser

<400> 50

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Lys	Cys	Asn	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Gly	Thr	Gly
			20					25					30		
Asp	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	His	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Lys	Pro	Ser
	50					55					60				
Leu	Arg	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Ser	Met	Asp	Thr	Ser	Arg	Asn	Gln	Phe
65					70					75					80
Ser	Leu	Lys	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Val	Arg	Glu	Trp	Ala	Asn	Gly	Asp	His	Trp	Ser	Ala	Phe	Asp	Leu
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
	115						120					125			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gln	Ala	Val	Leu	Thr
	130					135					140				
Gln	Pro	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Thr	Ile	Pro
145					150					155					160
Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Asn	Thr	Val	Asn	Trp	Tyr
				165					170					175	
Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Asn	Asp
			180					185					190		
Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly
	195						200					205			
Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala
	210					215					220				

Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr	Val	Phe
225					230					235					240
Gly	Thr	Gly	Thr	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Xaa						
				245				250							

<210> 51

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1015A07 scFv

<400> 51

Glu	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	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	Ala	Tyr
			20					25					30		
Phe	Ile	His	Trp	Leu	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Phe	Asn	Pro	Ile	Ser	Gly	Thr	Ala	Asp	Ser	Pro	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
His	Gly	Arg	Val	Ala	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75						80
Met	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gln	His	His	Ser	Asn	Thr	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Met
	130					135					140				
Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser
145					150					155					160
Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro
				165					170					175	

Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile	Tyr	Ala	Val	Thr	Asn	Arg	Pro	Ser
			180					185					190		
Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser
		195					200					205			
Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys
	210					215					220				
Ser	Ser	Tyr	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
225					230					235					240
Val	Thr	Val	Leu	Gly											
				245											

<210> 52

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1015E01 scFv

<220>

<221> SÍTIO

<222> (4)

<223> Xaa é igual a Val ou Leu

<220>

<221> SÍTIO

<222> (5)

<223> Xaa é igual a Ala ou Val

<220>

<221> SÍTIO

<222> (7)

<223> Xaa é igual a Ala ou Ser

<220>

<221> SÍTIO

<222> (10)

<223> Xaa é igual a Asp ou Glu

<220>

<221> SÍTIO

<222> (12)

<223> Xaa é igual a Asn ou Lys

<220>

<221> SÍTIO

<222> (23)

<223> Xaa Met ou Lys

<400> 52

Glu	Val	Gln	Xaa	Xaa	Gln	Xaa	Gly	Ala	Xaa	Val	Xaa	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Xaa	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	Ala	Tyr	
		20						25					30			
Phe	Ile	His	Trp	Leu	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Trp	Phe	Asn	Pro	Ile	Ser	Gly	Thr	Ala	Asp	Ser	Pro	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
His	Gly	Arg	Val	Ala	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65				70					75					80	
Met	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Gln	His	His	Ser	Asn	Thr	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
		100						105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
		115					120					125				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Met	
	130					135					140					

Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser
 145 150 155 160
 Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro
 165 170 175
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Ala Val Thr Asn Arg Pro Ser
 180 185 190
 Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Ala Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
 195 200 205
 Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Asn Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Val Thr Val Leu Gly
 245

<210> 53

<211> 249

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> T1006F07 scFv

<400> 53

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

Ala Arg Glu Pro Ser Phe Gln Gln Trp Gly His Tyr Ser Tyr Gly Met
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val
 130 135 140
 Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Ala Ala Arg
 145 150 155 160
 Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser Trp Tyr
 165 170 175
 Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Asn
 180 185 190
 Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly
 195 200 205
 Asn Thr Ala Thr Leu Lys Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala
 210 215 220
 Asp Tyr Tyr Cys Leu Ala Trp Asp Ser Ser Ala Asp Trp Val Phe Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 245

<210> 54

<211> 735

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1014A04 scFv

<400> 54

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgac gtgaagaggc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tectgcaaga tttctggaga cagcttcaac gcctacttta ttactgggt gcgtcaggcc 120
 cctggacagg ggcttgagtg gatgggatgg ttcaaccctg acagtggtag cgcagactct 180
 gcacagaagt ttacggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccagcag tactgccttc 240

ttggagctga	gcagactgag	atctgacgac	acagccgtgt	attactgtgt	gagacaacat	300
cggggtaaca	cgttcgcccc	ctggggccgg	gggacaatgg	tcaccgtctc	gagtggaggc	360
ggcgggttcag	gcggaggtgg	ctctggcggg	ggcggaagtg	cacagtctgt	gctgactcag	420
ccaccctccg	cgcccggggc	tcctggacag	tcagtcacca	tctcctgcac	tggaaccacc	480
agtgacgttg	gtggttataa	ctatgtctcc	tggtaccaac	agcaccagc	caaagcccc	540
aaactcatga	tttatggggg	caatcagcgg	ccctcagggg	tccctgatcg	cttctctggc	600
tccaagtctg	gcaacacggc	ctccctgacc	gtctctgggc	tccaggtctg	ggatgaggct	660
gattattact	gcagttcata	tgcaaggcagc	aacaattggg	tggtcggcgg	agggaccaag	720
ctgaccgtcc	taggt					735

<210> 55

<211> 735

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1014G03 scFv

<400> 55

gaggtccagc	tggtacagtc	tgagctgaa	gtgaagatgc	ctggggcctc	agtcaagctc	60
tcctgcaggg	tttctggaga	caccttcacc	gcctacttca	ttcactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggatgg	ttcaacccta	tcagtggcac	cgcaggctct	180
gctgagaagt	ttcgccggcag	ggtcgccatg	accaggggaca	cgtccatcag	cactgcctac	240
atggaattga	acaggctgac	atttgacgac	acggccgtct	attattgtgc	gagacaacat	300
cgggggaata	cgtttgaccc	ctggggccag	ggcaccctgg	tcaccgtctc	gagtggaggc	360
ggcgggttcag	gcggaggtgg	ctctggcggg	ggcggaagtg	cacagtctgc	cctgactcag	420
cctgcctccg	tgtctgggtc	tcctggacag	tcgatcacca	tctcctgcac	tggaaccagc	480
agtgacattg	gtgcttataa	gtatgtctcc	tggtatcaac	aacaccagc	caaagcccc	540
aaactttgtga	tttatgaggt	cagtaatcgg	ccctcagggg	ttccagtcg	cttctctggc	600
tccaagtctg	gccagacggc	ctccctgacc	atctctgggc	tccaggtctg	cgacgaggct	660
gattattact	gcaactcata	tcaaggttac	aacacgtggg	tggtcggcgg	agggaccaag	720
gtcaccgtcc	taggt					735

<210> 56

<211> 732

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1014A02 scFv

<400> 56

```
cagggtgcagc tgcaggagtc cggcccagga ctggtgaagc cctcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt gattactact ggagttgggt ccggcagtc 120
cccggaag gactggagtg gattggtct atcgattatg ccggcagcac caattacaac 180
ccgtccctca agagccgagt caccatgaca atagacaagt ccaagaagca attccccctg 240
aagatagatt ctgtgaccgc cgcagatacg gccatgtatt actgtgcgag acaacttggg 300
cggatttctg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcgagtgg aggcggcggt 360
tcaggcgag gtggctctgg cgggagcga agtgcacttt cctatgtgct gactcagcca 420
ccctcagcgt ctgggacccc cgggagaggt gtcaccatct cttgtgctgg aagcagctcc 480
aacatcgag gaaataactgt aaactggtac cagcaactcc cagcaacggc ccccaaactc 540
ctcatctata gtaataatca gcggccctca ggggtccctg accgattctc tggctccaag 600
tctggcacgt cagcctccct ggccatcagt gggctccagt ctgaggatga ggctgattat 660
tactgtgcaa catgggatga cagtcggggt ggttgggtgt tcggcggagg gaccaagctg 720
accgtcctag gt 732
```

<210> 57

<211> 735

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1014A12 scFv

<400> 57

```
gagggtccagc tgggtgcagtc tggggctgac gtgaagaggc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaaga tttctggaga cagcttcacc gcctacttta ttcactgggt gcgtcaggcc 120
cctggacagg ggcttgagtg gatgggatgg ttcaaccctg acagtgggtac cgcagactct 180
gcacagaagt ttcacggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccagcag tactgccttc 240
ttggagctga gcagactgag atctgacgac accgccgtat attactgtgt gagacaacat 300
cggggtaaca cgttcgcccc ctggggccgg gggacaatgg tcaccgtctc gagtggaggc 360
ggcggttcag gcggagggtgg ctctggcgggt ggcgggaagt cacagtctgc cctgactcag 420
cctgcctccg tgtctggtcc tcctggacag tcgataccca tctcctgcac tggatccagc 480
agtgacgttg gtggttataa gtatgtctcc tggtagcaac aacacccagg caaagcccc 540
aaactcatta ttcattgatgt cagtaggcgg ccctcagagg tttctagtcg cttctctggc 600
tccaagtctg gcaacacggc ctccctgacc atctctgggc tccaggctga ggacgaggct 660
gagtactact gcagctcata ttcaagcacc aactcttggg tggtcggcgg agggaccaag 720
gtcaccgtcc taggt 735
```

<210> 58

<211> 735

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1014B01 scFv

<400> 58

```
caggtccagc tgggtgcagtc tgggggctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaaga tttctggaga caccttcgcc gcctacttta ttcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctggagtg gatgggatgg ttcaacccta acagtgggtac cgcagactct 180
tcacagaagt ttacaggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cactgcctac 240
atggagttga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attattgtgc gagacaacat 300
cggctctaata cgttcgaccc ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc gagtggaggc 360
ggcggttcag gcgaggtgg ctctggcggg ggcggaagtg cacagtctgt cgtgacgcag 420
ccgccctcag tgtctgggtc tcctggacag tcagtcacca tctcctgcac tggaccagc 480
agtgcattg gtgcttataa ttatgtctcc tgggtccagc agcaccagg taaagcccc 540
aaactcataa tttctgaggt cagtaagcgg ccctcagggg tccctgatcg cctctctggc 600
tccaagtctg gcaacacggc ctccctgacc gtctccgggc tccaggctga ggatgaggct 660
gattattact gcggctcata tgcaggcagc aatatttggg tgttcggcgg agggaccaag 720
gtcaccgtcc taggt 735
```

<210> 59

<211> 735

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1014B11 scFv

<400> 59

```
gaggtccagc tgggtgcagtc tgggggctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtaaaggtc 60
tcctgcaaga tttctggaga cagcttcacc gcctatttta ttcactgggt gcgacaggcc 120
cctggagaag ggcttgagtg gatgggatgg ttcaatccta tcagcgggtac cgccggctct 180
ccacagaagt ttacaggcag ggtcgccatg acccgtgaca cgtccatcag tactgcctac 240
atggagttga ccaggctggc atctgacgac acggccattt attattgtgc gagacaacat 300
cactctaata cgttcgaccc ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagtggaggc 360
ggcggttcag gcgaggtgg ctctggcggg ggcggaagtg cacaatctgc cctgactcag 420
cctgcctccg tgtctgggtc tcctggacag tcgatcacca tctcctgcac tggaccacac 480
agtgcagttg gtggttacaa ctatgtctcc tgggtaccaac aacaccagg caaagcccc 540
aaactcatga tttatgaggt caataatcgg ccctcagggg tttctaatacg cttctctggc 600
tccaagtctg gcaacacggc ctccctgacc atctctgggc tccaggctga cgacgaggct 660
gattattact gcagctcata tacaaccagc aacacttggg tgttcggcgg agggaccaag 720
ctgaccgtcc taggt 735
```

<210> 60

<211> 735

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1014F08 scFv

<400> 60

gaggtccagc	tggtgcagtc	tggggctgaa	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtcaagctc	60
tcctgcaggg	tttctggaga	caccttcacc	gcctacttca	ttcactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcctgagtg	gatgggatgg	ttcaacccta	tcagtggcac	cgcaggctct	180
gctgcgaggt	ttcgcggcag	ggtcgccatg	accagggaca	cgtccatcag	cactgcctac	240
atggaattga	acaggctgac	atttgacgac	acggccgtct	attattgtgc	gagacaacat	300
cgggggaata	cctttgaccc	ctggggcaaa	ggcaccctgg	tcaccgtctc	gagtggaggc	360
ggcggttcag	gcgagagtg	ctctggcggg	ggcggaagtg	cactgcctgt	gctgactcag	420
ccaccctccg	cgcccggttc	tcctggacag	tcagtcacca	tctcctgcac	tggaaccagc	480
agtgcagttg	gtgggtataa	gtatgtctcc	tggtaccaac	agcaccaggg	caaagcccc	540
aaactcatga	tttatgaggt	cagtatgcgg	ccgtcagggg	tcccggatcg	cttctctggc	600
tccaagtctg	gcaacacggc	ctccctgacc	gtctctgggc	tccaggctga	ggatgaggct	660
gattattact	gcgcctcata	tgcaggcagc	aacaattggg	tggtcggcgg	agggaccaag	720
ctgaccgtcc	taggt					735

<210> 61

<211> 735

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1014G04 scFv

<400> 61

gaagtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgac	gtgaagaggc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaaga	tttctggaga	cagcttcacc	gcctacttta	ttcactgggt	gcgtcaggcc	120
cctggacagg	ggcctgagtg	gatgggatgg	ttcaaccctg	acagtgggtac	cgcagactct	180
gcacagaagt	ttcacggcag	ggtcaccatg	accagggaca	cgtccagcag	tactgccttc	240
ttggagctga	gcagactgag	atctgacgac	accgccgtat	attactgtgt	gagacaacat	300
cggggtaaca	cggtcgcccc	ctggggcagg	ggaaccctgg	tcaccgtctc	gagtggaggc	360
ggcggttcag	gcgagagtg	ctctggcggg	ggcggaagtg	cacagcctgt	gctgactcag	420
ccccctccg	cgcccggttc	gcctggacag	tcagtcacca	tctcctgcac	tggaaccagc	480
agtgcagttg	gtagttatga	gtatgtctcc	tggtaccaac	aacaccaggg	caaagcccc	540
agactcatga	tttctgaggt	caataagcgg	ccctcagggg	tccctaatacg	cttctctggc	600
tccaagtctg	gcaacacggc	ctccctgacc	gtctctgggc	tccaggctga	cgatgaggct	660
gattactact	gcagctcata	tgcaggcagc	aacaattggg	tggtcggcgg	agggaccaag	720
gtcaccgtcc	taggt					735

<210> 62

<211> 750

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1015A02 scFv

<400> 62

caggtgcagc	tgcaggagtc	gggcccagga	ctggtgaagc	cttcacagac	cctgtccctc	60
aaatgcaatg	tctctggtgg	ctccattggt	actggtgatt	actattggag	ttggatccgc	120
cagccccag	ggaagggcct	ggagtggatt	ggctacatcc	atagcagtgg	gagcacttat	180
tacaagccgt	ccctcaggag	tcgacttacc	gtatcgatgg	atacgtccag	gaatcagttc	240
tccctgaagc	tgacctctgt	gactgccgca	gacacggcac	tgtattactg	tgtcagagag	300
tgggccaatg	gtgaccactg	gagtgcattt	gacctctggg	gccaagggaac	cctggtcacc	360
gtctcgagtg	gaggcggcgg	ttcaggcgga	ggtggctctg	gcggtggcgg	aagtgcacag	420
gctgtgctga	ctcagccgtc	ctcagcgtct	gggacccccg	ggcagagggg	cactatcccc	480
tgttctggaa	gcagctccaa	catcggaggt	aatactgtta	attggtacca	acaactccca	540
ggaacggccc	ccaaactcct	catctatggt	aatgatcagc	ggccgtcagg	ggtccctgac	600
cgattctctg	gctccaagtc	tggcacctca	gcctccctgg	ccatcactgg	gctccagtct	660
gaggatgagg	ctgattatta	ctgtgcagca	tgggatgaca	gcctgattgg	ttatgtcttc	720
ggaactggga	cccagctcac	cgttttargt				750

<210> 63

<211> 735

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1015A07 scFv

<400> 63

gaagtgcagc	tggcgagtc	tggcgctgag	gtgaataagc	ctggggcctc	agtaaaggtc	60
tcctgcaaga	tttctggaga	cagcttcacc	gcctatttta	ttcactggct	gcgacaggcc	120
cctggagaag	ggcttgagtg	gatgggatgg	ttcaatccta	tcagcggtag	cgccgactct	180
ccacagaagt	ttcacggcag	ggtcgccatg	acccgtgaca	cgtccatcag	tactgcctac	240
atggagttga	ccaggctggc	atctgacgac	acggccattt	attattgtgc	gagacaacat	300
cactctaata	cgttcgaccc	ctggggccaa	ggaaccctgg	tcaccgtctc	gagtggaggc	360
ggcggttcag	gcgagagggtg	ctctggcggt	ggcggaagtg	cacagtctgc	cctgactcag	420
cctgcctcca	tgtctgggtc	tcctggacag	tcgatcacca	tctcctgcac	tggaaccagc	480
agtgcagttg	gtgggtataa	ctatgtctcc	tggtaccaac	agcaccagg	caaagcccc	540
aaactcatga	tttatgcggt	cactaatcgg	ccctcagggg	tttctaatac	cttctctgcc	600
tccaagtctg	gcaacacggc	ctccctgacc	atctctgggc	tccaggctga	ggacgaggct	660
gattattact	gcagctcata	tacaagcagc	aacacttggg	tggtcggcgg	agggaccaag	720
gtcaccgtcc	taggt					735

<210> 64

<211> 735

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1015E01 scFv

<400> 64

gaagtgcags	tgggycagkc	tggsgctgas	gtgaakaagc	ctggsgcctc	agtaaaggtc	60
tcctgcawga	tttctggaga	cagcttcacc	gcctatttta	ttcactggct	gcgacaggcc	120
cctggagaag	ggcttgagtg	gatgggatgg	ttcaatccta	tcagcggtag	cgccgactct	180
ccacagaagt	ttcacggcag	ggtcgccatg	acccgtgaca	cgtccatcag	tactgcctac	240
atggagttga	ccaggctggc	atctgacgac	acggccattt	attattgtgc	gagacaacat	300
cactctaata	cgttcgaccc	ctggggccaa	ggaaccctgg	tcaccgtctc	gagtggaggc	360
ggcggttcag	gcgagagggtg	ctctggcggt	ggcggaagtg	cacagtctgc	cctgactcag	420
cctgcctcca	tgtctgggtc	tcctggacag	tcgatcacca	tctcctgcac	tggaaccagc	480
agtgcagttg	gtgggtataa	ctatgtctcc	tggtaccaac	agcaccagg	caaagcccc	540
aaactcatga	tttatgcggt	cactaatcgg	ccctcagggg	tttctaatac	cttctctgcc	600
tccaagtctg	gcaacacggc	ctccctgacc	atctctgggc	tccaggctga	ggacgaggct	660
gattattact	gcagctcata	tacaagcagc	aacacttggg	tggtcggcgg	agggaccaag	720
gtcaccgtcc	taggt					735

<210> 65

<211> 747

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ADN que codifica T1006F07 scFv

<400> 65

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaacca 300
tccttttcagc agtggggcca ctactcctac ggtatggacg tctggggcca ggggacaatg 360
gtcaccgtct cgagtggagg cggcggttca ggcggagggt gctctggcgg tggcggaagt 420
gcacagtctg tgctgactca gccaccgtca gtgtccgtgt cccaggaca ggcagccaga 480
atcacctgct ctggagataa gttgggggat aaatatgctt cgtggtatca acagaggcca 540
ggccagtccc ctgttttggg catctatcaa gataacaaaa ggcctcagg gatccctgag 600
cgattctctg gctccaattc tgggaacaca gccactctga aaatcagcgg gaccaggct 660
atggatgagg ctgactatta ctgtctggcg tgggacagca gcgctgattg ggtcttcggc 720
ggagggacca aggtcaccgt cctaggt 747
```

<210> 66

<211> 281

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

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

Leu	Val	Arg	Glu	Arg	Gly	Pro	Gln	Arg	Val	Ala	Ala	His	Ile	Thr	Gly	
	115						120					125				
Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Asn	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Lys	Asn	Glu	
	130						135				140					
Lys	Ala	Leu	Gly	Arg	Lys	Ile	Asn	Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly	
145					150					155					160	
His	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Val	Ile	
				165					170					175		
His	Glu	Lys	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gln	Thr	Tyr	Phe	Arg	Phe	
			180					185					190			
Gln	Glu	Glu	Ile	Lys	Glu	Asn	Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Val	Gln	
		195					200					205				
Tyr	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Met	Lys	
	210						215				220					
Ser	Ala	Arg	Asn	Ser	Cys	Trp	Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly	Leu	Tyr	
225					230					235					240	
Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp	Arg	Ile	
				245					250					255		
Phe	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Glu	His	Leu	Ile	Asp	Met	Asp	His	Glu	Ala	
			260					265					270			
Ser	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe	Leu	Val	Gly								
	275						280									

Lisboa, 4 de Dezembro de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou o seu fragmento compreendendo:

(a) a sequência de aminoácidos do domínio VH da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos do domínio VH expresso pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570; e

(b) a sequência de aminoácidos do domínio VL da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos do domínio VL expresso pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570,

em que o referido anticorpo ou o seu fragmento liga imunoespecificamente o TR4.

2. Anticorpo ou o seu fragmento compreendendo:

(a) a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VH da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VH expressas pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570; e

(b) a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VL da SEQ ID N°: 43 ou a sequência de aminoácidos das 3 CDR de VL expressas pelo hibridoma do Depósito ATCC n° PTA-3570,

em que o referido anticorpo ou o seu fragmento liga imunoespecificamente o TR4.

3. Anticorpo ou o seu fragmento da reivindicação 1 ou 2 que liga o TR4 expresso na superfície de uma célula.

4. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o anticorpo ou o seu fragmento é seleccionado do grupo consistindo de:

(a) uma molécula de imunoglobulina inteira;

(b) um scFv;

(c) um anticorpo monoclonal;

(d) um anticorpo humano;

(e) um anticorpo quimérico;

(f) um anticorpo humanizado;

(g) um fragmento Fab;

(h) um fragmento Fab';

(i) um F(ab')₂;

(j) um Fv; e

(k) um Fv ligado por dissulfureto.

5. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, o qual compreende um domínio constante da cadeia pesada de imunoglobulina seleccionado do grupo consistindo de:

(a) um domínio constante de IgM humana;

- (b) um domínio constante de IgG humana; e
 - (c) um domínio constante de IgA humana.
6. Anticorpo da reivindicação 5, em que o domínio constante da cadeia pesada de imunoglobulina humana é um domínio constante de IgG1, um domínio constante de IgG2, um domínio constante de IgG3 ou um domínio constante de IgG4.
7. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, o qual compreende um domínio constante da cadeia leve de imunoglobulina seleccionado do grupo consistindo de:
- (a) um domínio constante da kappa humana; e
 - (b) um domínio constante da lambda humana.
8. Anticorpo expresso pela linha de células do Depósito ATCC PTA-3570.
9. Molécula de ácido nucleico que codifica o anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8.
10. Vector compreendendo a molécula de ácido nucleico da reivindicação 9.
11. Célula hospedeira compreendendo o vector da reivindicação 10 ou a molécula de ácido nucleico da reivindicação 9.

12. Linha de células manipulada para expressar o anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 8.
13. Linha de células da reivindicação 12, em que as células são células NSO ou células CHO.
14. Anticorpo que pode ser obtido por expressão da linha celular da reivindicação 12 ou 13.
15. Método de preparação de um anticorpo compreendendo:
 - (a) expressar o anticorpo codificado pela molécula de ácido nucleico da reivindicação 9; e
 - (b) recuperar o referido anticorpo.
16. Anticorpo que pode ser obtido pelo método da reivindicação 15.
17. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14 e 16 em que o anticorpo ou o seu fragmento tem uma constante de dissociação (K_D) inferior ou igual a 10^{-9} M.
18. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 e 17 em que o anticorpo ou o seu fragmento está marcado.
19. Anticorpo ou o seu fragmento da reivindicação 18, o qual está marcado com uma etiqueta radioactiva.

20. Anticorpo ou o seu fragmento da reivindicação 19, em que a etiqueta radioactiva é ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{177}Lu , ^{166}Ho ou ^{153}Sm .
21. Anticorpo ou o seu fragmento da reivindicação 18, o qual está marcado com uma enzima, uma etiqueta fluorescente, uma etiqueta luminescente ou uma etiqueta bioluminescente.
22. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 e 17 em que o anticorpo ou o seu fragmento está biotinilado.
23. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 e 17, em que o anticorpo ou o seu fragmento está conjugado com um agente terapêutico ou citotóxico.
24. Anticorpo ou o seu fragmento da reivindicação 23, em que o agente terapêutico ou citotóxico é seleccionado do grupo consistindo de:
- (a) um antimetabolito;
 - (b) um agente alquilante;
 - (c) um antibiótico;
 - (d) um factor de crescimento;
 - (e) uma citocina;
 - (f) um agente antiangiogénico;

(g) um agente antimitótico;

(h) uma antraciclina;

(i) toxina; e

(j) um agente apoptótico.

25. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14 e 16 a 24, em que o anticorpo ou o seu fragmento está ligado a um suporte sólido.
26. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14 e 16 a 25, em que o anticorpo ou o seu fragmento liga imuno especificamente o TR4 numa transferência de Western ou num ELISA.
27. Célula que produz o anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 e 17.
28. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14 e 16 a 26 que inibe a aptidão do TRAIL para ligar TR4.
29. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 a 26 e 28, em que o anticorpo ou o seu fragmento é um agonista de TR4.
30. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 a 26 e 28 a 29, em que o

anticorpo ou o seu fragmento estimula a apoptose de células que expressam TR4.

31. Anticorpo ou o seu fragmento da reivindicação 30, em que o anticorpo ou o seu fragmento estimula a apoptose de células que expressam TR4

(a) melhor do que uma concentração igual do polipéptido TRAIL estimula a apoptose de células que expressam TR4; ou

(b) igualmente bem na presença ou ausência de reagentes de reticulação de anticorpos.

32. Anticorpo ou o seu fragmento da reivindicação 30 ou 31, em que o anticorpo ou o seu fragmento não é hepatotóxico.

33. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 a 26, 28 a 30 e 31, em que o anticorpo ou o seu fragmento regula positivamente a expressão do receptor de TRAIL.

34. Composição farmacêutica compreendendo o anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 a 26 e 28 a 33.

35. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 a 26, 28 a 29 e 30 a 33 para utilização num método de tratamento, prevenção ou melhoria de um cancro, em que o método compreende administrar o referido anticorpo ou o seu fragmento a um animal.

36. Anticorpo da reivindicação 35 ou o seu fragmento para a utilização da reivindicação 35, em que o animal é um humano.
37. Anticorpo da reivindicação 35 ou o seu fragmento para a utilização da reivindicação 35 ou 36, em que o cancro é cancro do cólon, cancro da mama, cancro do útero, cancro pancreático, cancro do pulmão, cancro gastrointestinal, cancro do fígado, sarcoma de Kaposi ou mieloma múltiplo.
38. Anticorpo da reivindicação 35 ou o seu fragmento para a utilização da reivindicação 35 ou 36, em que o cancro é um cancro do sistema nervoso central.
39. Anticorpo da reivindicação 35 ou o seu fragmento para a utilização da reivindicação 38, em que o cancro do sistema nervoso central é um meduloblastoma, um neuroblastoma ou um glioblastoma.
40. Anticorpo da reivindicação 35 ou o seu fragmento para a utilização de qualquer uma das reivindicações 35 a 39, em que o método compreende administrar o anticorpo ou o seu fragmento em associação com um agente quimioterapêutico.
41. Anticorpo da reivindicação 35 ou o seu fragmento para a utilização da reivindicação 40, em que o agente quimioterapêutico é seleccionado do grupo consistindo de:
- (a) irinotecano;
- (b) paclitaxel (TAXOL)[®]; e

(c) gencitabina.

42. Anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 a 26, 28 a 29 e 30 a 33 para se utilização num método de inibição do crescimento ou de morte de células que expressam TR4, em que o referido método compreende administrar o anticorpo ou o seu fragmento a um animal no qual é desejada essa inibição de crescimento ou morte das células que expressam o receptor TR4.

43. Método de detecção da expressão de um polipéptido de TR4 compreendendo:

(a) analisar a expressão de um polipéptido de TR4 numa amostra biológica de um indivíduo utilizando o anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 a 26 e 28 a 33; e

(b) comparar o nível de um polipéptido de TR4 com um nível padrão de um polipéptido receptor de TRAIL.

44. Método de detecção, diagnóstico, prognóstico ou acompanhamento de cancros e outros distúrbios hiperproliferativos compreendendo:

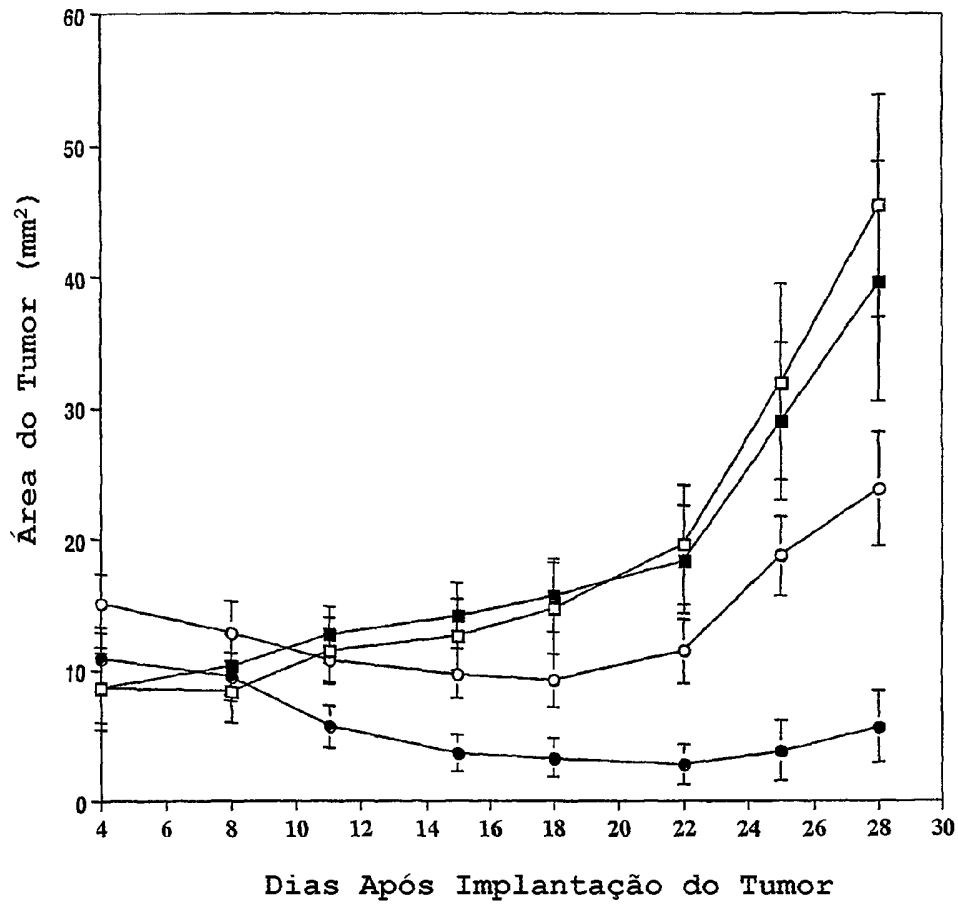
(a) analisar a expressão de um polipéptido de TR4 numa amostra biológica de um indivíduo utilizando o anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 a 26 e 28 a 33; e

(b) comparar o nível de um polipéptido de TR4 com um nível padrão do polipéptido de TR4.

45. Kit compreendendo o anticorpo ou o seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 14, 16 a 28 e 28 a 33.
46. Kit da reivindicação 45 compreendendo um anticorpo de controlo.
47. Kit da reivindicação 45 ou 46, em que o anticorpo ou o seu fragmento está acoplado ou conjugado com uma etiqueta detectável.

Lisboa, 4 de Dezembro de 2013

Efeito de T1014A04 no crescimento do
tumor SW480 em ratinhos Suíços Nu/Nu



n=6

—□— PBS —■— T1014A04
 —○— Topotecano (0,3mg/kg) —●— Topo (0,3mg/kg + 14A04)

FIG. 1

Efeito de T1014A04 no crescimento do
tumor SW480 em ratinhos Suíços Nu/Nu

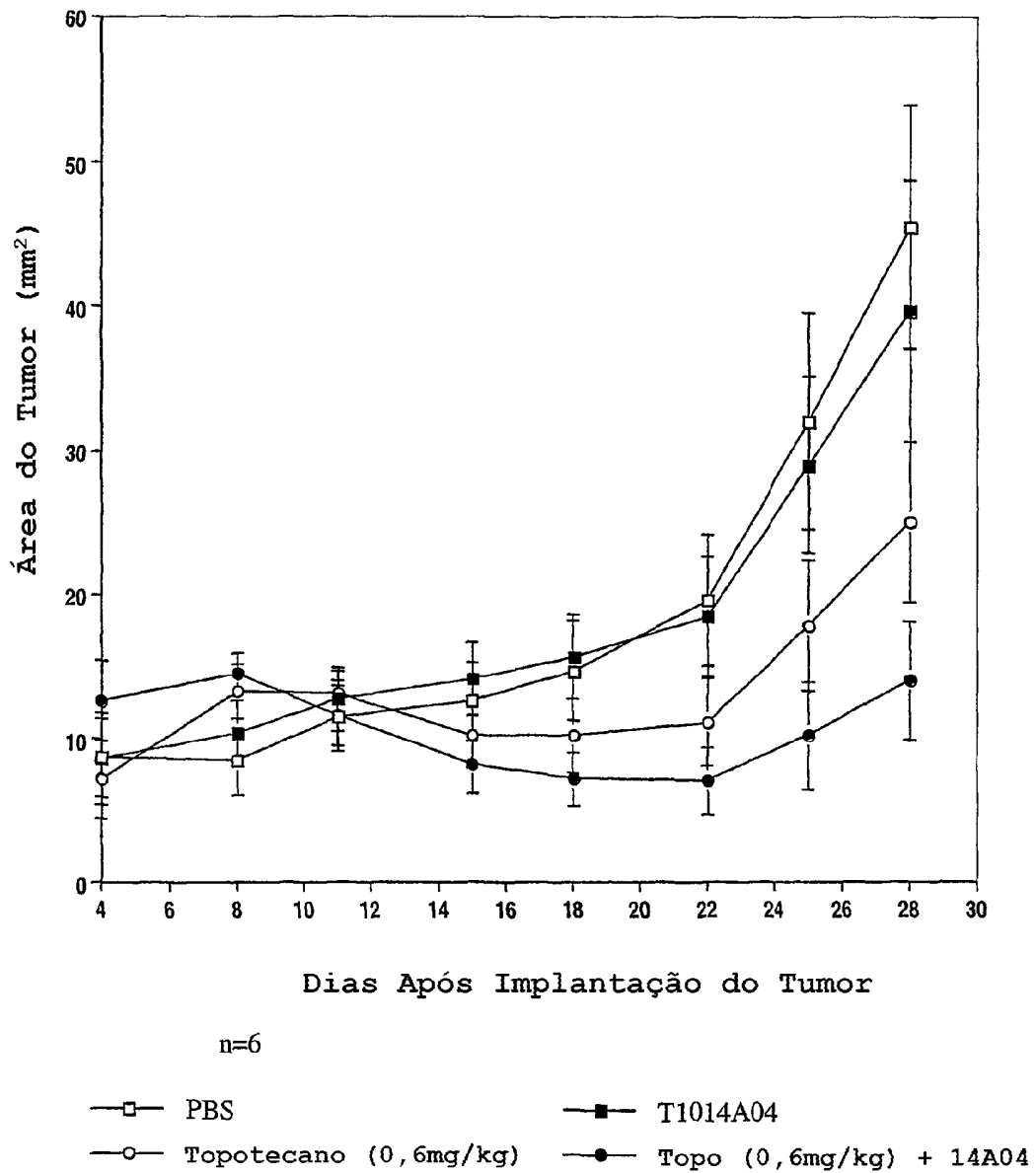


FIG. 2

**Efeito do tratamento com 14G03 crescimento
de tumores SW480 *in vivo* após 28 dias**

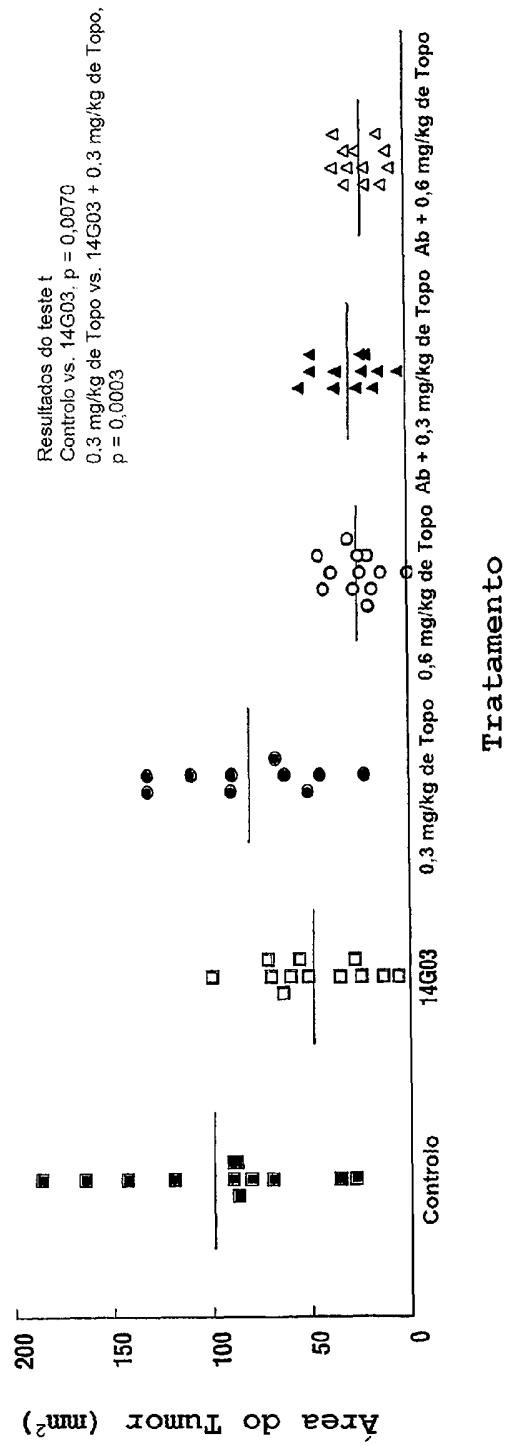


FIG. 3