

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

(22) Data de pedido: <b>2005.12.02</b>	(73) Titular(es): <b>BAC IP B.V.</b> <b>HUIZERSTRAATWEG 28 1411 GP NAARDEN NL</b>
(30) Prioridade(s): <b>2004.12.02 EP 04078282</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2007.08.15</b>	(72) Inventor(es): <b>WILHELMUS JOSEPHUS JOHANNA HERMANS</b> NL <b>MARK RONALD TEN HAAFT</b> NL <b>ANJA OVERWEEL</b> NL
(45) Data e BPI da concessão: <b>2013.03.06</b> <b>092/2013</b>	(74) Mandatário: <b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA</b> <b>AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA</b> PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO DE PURIFICAÇÃO POR IMUNOAFINIDADE, O QUAL COMPREENDE A UTILIZAÇÃO DE UM AGENTE DE LIGAÇÃO QUE SE LIGA A UM EPÍTOPO QUE ESTÁ PRESENTE PELO MENOS DUAS VEZES NA MOLÉCULA ALVO. NOUTRA FORMA DE REALIZAÇÃO O MÉTODO UTILIZA PELO MENOS DOIS AGENTES DE LIGAÇÃO DIFERENTES, CADA UM DOS QUAIS SE LIGA A EPÍTOPOS DIFERENTES NA MOLÉCULA ALVO.

**RESUMO****"MÉTODO DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE"**

A invenção refere-se a um método de purificação por imunoafinidade, o qual compreende a utilização de um agente de ligação que se liga a um epítopo que está presente pelo menos duas vezes na molécula alvo. Noutra forma de realização o método utiliza pelo menos dois agentes de ligação diferentes, cada um dos quais se liga a epítomos diferentes na molécula alvo.

## DESCRIÇÃO

### "MÉTODO DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE"

#### Campo da invenção

A invenção refere-se a um método para purificação por afinidade e a um agente de ligação para ser utilizado nesse processo.

#### Antecedentes da invenção

A utilização de agentes de ligação na purificação por afinidade é conhecida a partir da EP-A-434317. Este documento divulga que é possível imobilizar agentes de ligação específicos pequenos num veículo de fase sólida. Os agentes de ligação são especialmente constituídos pelas proteínas correspondentes do domínio VH e VL, mantidas em conjunto pela sua interação natural. Ao serem imobilizados estes agentes de ligação pequenos mantêm a afinidade para o seu ligando alvo. Um exemplo da tecnologia divulgada é a imobilização de uma Fv de anti-lisozima sobre agarose e a sua utilização como um imunoadsorvente. O imunoadsorvente compreendendo Fv de anti-lisozima imobilizada foi empacotado numa coluna e nesta coluna foi carregada uma mistura de lisozima e outra proteína. A coluna foi lavada para remover a proteína não ligada e subsequentemente foi eluída a proteína ligada.

Neste tipo de sistemas de imunoafinidade a força, especificidade e capacidade de ligação do imunoadsorvente são parâmetros importantes.

A força e especificidade de ligação referem-se à ligação entre o agente de ligação e o alvo. Especialmente, o agente de ligação é um anticorpo ou seu fragmento, e a ligação é altamente específica para o alvo. De modo desejável, a ligação específica ao alvo é maximizada e ligação não específica é minimizada. A ligação com uma especificidade apenas muito limitada está subjacente aos sistemas de purificação comerciais que se baseiam na proteína A e proteína L. Sabe-se que estes se ligam a uma vasta gama de moléculas de imunoglobulina tais como imunoglobulinas de humano, rato e ratazana.

A força de ligação deve ser equilibrada entre uma boa ligação de tal forma que a coluna é facilmente carregada com o material alvo e nenhum material alvo é eluído antes da eluição, e o desejo de utilizar condições de eluição suaves para evitar danos desnecessários às moléculas alvo. As condições de eluição muito rigorosas são indesejadas porque podem levar à desnaturação, fragmentação ou outros defeitos do material alvo. Além disso, as condições suaves são benéficas para o material da coluna e aumentam a vida útil do mesmo.

A capacidade do imunoabsorvente indica a quantidade de material alvo que pode ser ligado pelo material imunoabsorvente nas condições de ligação. Assim que é alcançada a capacidade máxima do material imunoabsorvente, a carga adicional de alvo não resultará em ligação mas originará a perda de material alvo no eluente. Isto resulta numa perda de rendimento na purificação da proteína ou requer a inclusão de passos de processamento adicionais (repetidos).

Por exemplo, na EP-A-434317 alguns destes objetivos são abordados através da utilização de domínios variáveis

possuindo afinidade reduzida para o antigénio, levando à eluição ou dessorção em condições mais suaves. A ligação não específica é reduzida diminuindo o tamanho do agente de ligação I até ao mínimo necessário para ligação.

McNahon et al. (2000, *Journal of Immunological methods* 241:1-10) divulgam uma IgM monoclonal murídea anti-IgG de cabra designada M11. Os autores descrevem que este monoclonal era mono-reativo antes da purificação, enquanto era poli-reativo a muitas proteínas diferentes após purificação.

Lambin et al. (1993, *Journal of Immunological methods* 165:99-111) divulgam um método para purificar até um grau elevado uma fração de IgG4 contendo predominantemente anticorpo anti-pólen com atividade bloqueadora numa coluna de imunoafinidade compreendendo anticorpos monoclonais humanos.

Bird et al. (1984, *Journal of Immunological methods* 71:97-105) divulgam a utilização de anticorpos monoclonais de murídeos específicos para subclasses humanas (específicos para anti-IgG1; anti-IgG2; anti-IgG3; anti-IgG4) e restringidos a subclasses humanas (anti-IgG2, 3 e 4, não-IgG1; anti-IgG1, 2 e 4, não-IgG3; anti-IgG1, 2 e 3, não-IgG4) para padronizar procedimentos de imunoafinidade para permitir o isolamento de preparações de subclasses policlonais puras.

Monestier et al. (1989, *Hybridoma* 8(6):631-638) divulgam um método para a purificação de anticorpos de IgM de murídeo. Os autores divulgam a imunização de ratas com um anticorpo monoclonal IgM-kappa de murídeo (TEPC 183) e três semanas depois com um anticorpo monoclonal IgM-lambda de murídeo (MOPC 104E), para gerar anticorpos monoclonais de

ratazana contra IgM de murídeo. Foram obtidos dois anticorpos monoclonais de ratazana que se ligam a ambos, TEPC 183 e MOPC 104E. Foi observado que a ligação era independente da cadeia leve.

A WO 2004/041862 divulga polipéptidos antifator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único dirigidos contra TNF-alfa. Além disso, foi divulgada a sua utilização em diagnóstico e terapia.

A WO 2004/041867 divulga um método de administração de moléculas terapêuticas de proteína através de vias de administração diferentes de forma a evitar a inativação. A aplicação divulga uma construção polipeptídica compreendendo pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra a região constante de IgE.

Ewert et al. (2002, *Biochemistry* 41:3628-3636) apresentam as propriedades biofísicas dos domínios VHH de camelídeo em comparação com as propriedades de domínios VH3 humanos. Os autores concluem que os fragmentos de VHH de camelídeo são caracterizados por uma estabilidade favorável e pela sua aptidão para fundir de forma reversível sem agregação, permitindo desse modo que os fragmentos recuperem a afinidade de ligação após renaturação térmica.

Pérez et al. (2001, *Biochemistry* 40:74-83) investigam a estabilidade térmica dos anticorpos de cadeia pesada de camelídeos.

Muieldermans e Lauwereys (1999, *Journal of Molecular Recognition* 12:131-140) apresentam uma revisão dos anticorpos apenas de cadeia pesada de camelídeos. Os autores discutem o anticorpo apenas de cadeia única contra os anticorpos tradicionais e indicam que preveem que os

anticorpos de domínio único de camelídeos serão aplicados num número de aplicações biotecnológicas ou médicas.

Van der Linden et al. (2000, Journal of Immunological methods 240:185-195) abordam a questão de saber se os lamassão são um fonte prática de fragmentos VHH específicos para antigénio e concluíram que os fragmentos VHH de anticorpo específicos para antigénio são facilmente acessíveis a partir do anticorpo de lama gerado contra a gonadotrofina coriónica humana.

Embora estas medidas possam, em certa medida, melhorar as características de capacidade, especificidade e afinidade do imunoadsorvente, continua a haver uma procura de materiais imunoadsorventes ainda mais melhorados.

#### Sumário da invenção

Nós determinamos surpreendentemente que um material imunoadsorvente compreendendo um agente de ligação específico, o qual é preferencialmente um anticorpo ou um seu fragmento, que se liga a pelo menos dois epítomos num alvo, tem a afinidade elevada desejada, enquanto a eluição pode ser ainda realizada em condições suaves. Quando utilizado como um material para cromatografia em coluna verificou-se que origina uma alta capacidade da coluna.

Por conseguinte, a invenção refere-se a um método de purificação de uma imunoglobulina, em que:

a) o método compreende o passo de ligar a imunoglobulina a um material imunoadsorvente que compreende pelo menos um agente de ligação mono-específico;

- b) o agente de ligação tem afinidade para pelo menos dois epítomos na imunoglobulina que estão espacialmente separados por pelo menos 30 angstrom; e,
- c) o agente de ligação mono-específico é um domínio variável de um anticorpo que pode ser obtido a partir de um camelídeo que consiste apenas de cadeias pesadas e que está naturalmente desprovido de cadeias leves.

Noutro aspeto a invenção refere-se a um método de purificação de uma molécula alvo por imunoafinidade, em que a molécula alvo é uma imunoglobulina, método esse que compreende a utilização de um material imunoabsorvente compreendendo pelo menos dois agentes de ligação diferentes, em que os agentes de ligação compreendem um agente de ligação com afinidade de ligação para um epítomo (um) na molécula alvo e um agente de ligação com afinidade de ligação para um epítomo diferente (dois) na molécula alvo.

#### Descrição da invenção

A molécula alvo é definida como uma molécula que deve ligar-se a um agente de ligação tal como um anticorpo. Os exemplos de moléculas alvo são proteínas que requerem purificação, proteínas que são para ser identificadas.

A afinidade de ligação (KD) é definida no contexto de ligação específica e é representada por uma afinidade de pelo menos  $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Preferencialmente, a afinidade de ligação (medida no agente de ligação isolado e alvo) é de pelo menos  $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ , mais preferido de pelo menos  $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ .

Material imunoabsorvente é aqui entendido como a combinação de um veículo e um agente de ligação que está imobilizado no veículo. O veículo pode ser qualquer material que possa

ser utilizado para a imobilização de um agente de ligação. Os exemplos adequados são materiais de matriz, para reter o agente de ligação, superfícies celulares nas quais o agente de ligação é apresentado e polímeros que podem estar ligados covalentemente ao agente de ligação. O especialista na técnica de cromatografia de afinidade está bem ciente de veículos adequados tais como, por exemplo, Sepharose. O agente de ligação está preferencialmente imobilizado sobre o veículo por uma ligação covalente.

Um epítipo é definido como a porção da molécula alvo que é ligada pelo agente de ligação. Se o agente de ligação é um anticorpo, aquele é a porção de uma molécula alvo que desencadeia uma resposta imunológica ao imunizar uma espécie com esta molécula. De uma forma geral, é o sítio da molécula alvo onde ocorre a ligação a um anticorpo.

De forma preferida, o epítipo está naturalmente presente na molécula alvo. Opcionalmente, o(s) epítipo(s) é/são uma sequência que foi incluída artificialmente na molécula alvo. Opcionalmente, um sem-número de epítipos iguais ou diferentes são incluídos na molécula alvo para facilitar a sua purificação e deteção.

O agente de ligação é um componente que se liga especificamente à molécula alvo com a afinidade de ligação desejada. O agente de ligação é um agente de ligação mono-específico. Uma composição compreendendo um agente de ligação mono-específico, tal como os materiais imunoabsorventes da presente invenção, é entendida como uma composição possuindo uma população homogénea do agente de ligação. Entende-se que o agente de ligação mono-específico é específica para um único epítipo ou ligando. No entanto, inclui-se expressamente na invenção que o material imunoabsorvente pode compreender mais do que um tipo de

agente de ligação mono-específico, consistindo cada de uma população homogénea. No entanto, em geral, no contexto da presente invenção, um material imunoadsorvente não compreenderá mais do que 4, 6, 8, 10 ou 20 agentes de ligação mono-específicos diferentes. É extremamente preferido que o agente de ligação seja um anticorpo ou um seu fragmento. Nesse caso, o agente de ligação mono-específico será assim um anticorpo monoclonal ou um seu fragmento, o qual pode ser obtido a partir de um hibridoma ou expressado a partir de uma sequência de codificação clonada. O termo agente de ligação mono-específico como aqui utilizado exclui assim anticorpos policlonais e antissoros. Um exemplo de um fragmento adequado que pode ser utilizado é a parte de ligação do anticorpo, referida como CDR (região determinante de complementaridade). Tais fragmentos podem ser adequadamente inseridos na molécula suporte natural ou sintético tal como um péptido sintético. A invenção refere-se a um método de purificação por imunoafinidade, o qual compreende a utilização de um agente de ligação, que se liga a uma molécula alvo em pelo menos duas posições. Isto é referido como ligação multivalente. Numa forma de realização, o agente de ligação liga-se a um epítopo que está presente pelo menos duas vezes na molécula alvo. Noutra forma de realização, o método utiliza pelo menos dois agentes de ligação diferentes, cada um dos quais se liga a epítomos diferentes na molécula alvo.

Por conseguinte, a invenção refere-se a um método de purificação de uma molécula alvo por imunoafinidade, o qual compreende a utilização de um material imunoadsorvente compreendendo um agente de ligação, o qual compreende quer

a) Um agente de ligação com afinidade de ligação para um epítopo que está presente pelo menos duas vezes na molécula alvo

b) ou compreende um agente de ligação com afinidade de ligação para um epítopo (um) na molécula alvo e um agente de ligação diferente com afinidade de ligação para um epítopo diferente (dois) na molécula alvo.

A seguir são apresentados outros passos preferidos deste método.

Numa forma de realização alternativa, a invenção refere-se a um método de purificação de uma molécula alvo por imunoafinidade, o qual compreende a utilização de um agente de ligação de acordo com (a) ou (b) acima, em combinação com pelo menos um agente de ligação que exhibe ligação monovalente para a molécula alvo. Tais combinações de agente de ligação múltiplo são especialmente adequadas para serem utilizadas se o agente de ligação individual tiver uma afinidade de ligação inferior a  $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ , para o alvo.

Opcionalmente, o método da invenção é uma combinação de (a) e (b) acima.

Numa forma de realização preferida, a invenção refere-se a um método de purificação de uma molécula alvo, em que o método compreende o passo de ligação da molécula alvo a um material imunoabsorvente que compreende pelo menos um agente de ligação mono-específico, e em que o agente de ligação tem afinidade para pelo menos dois epítopos na molécula alvo que estão espacialmente separados.

Preferencialmente, a separação espacial dos pelo menos dois epítopos na molécula alvo é de tal forma que a ligação de um primeiro epítopo na molécula alvo a um agente de ligação não interfere substancialmente com a ligação de um segundo ou mais epítopos a um agente de ligação. Isto significa que

a ligação de um primeiro epítopo na molécula alvo a um agente de ligação não reduz ou "bloqueia" substancialmente a ligação de um segundo ou mais epítomos a um agente de ligação. A ausência de bloqueio substancial é aqui entendido como significando que a ligação de um primeiro epítopo na molécula alvo a um agente de ligação não reduz a ligação de um segundo ou mais epítomos a um agente de ligação em mais do que 50, 40, 30, 20, 10 ou 5%. A ausência de bloqueio substancial pode ser determinada em ensaios de bloqueio cruzado correntes (ver por exemplo "Using Antibodies" E. Harlow e D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press NY, 1999) ou como descrito no Exemplo 5 aqui.

A separação espacial dos pelo menos dois epítomos na molécula alvo é, desse modo, preferencialmente de tal forma que pelo menos dois epítomos na molécula alvo estejam disponíveis para se ligarem a um agente de ligação no material imunoabsorvente. A separação espacial dos pelo menos dois epítomos é, desse modo, de tal forma que resulta numa ligação multivalente. A ligação multivalente resulta numa velocidade de dissociação significativamente menor ( $k_{\text{diss}}$ ) da molécula alvo do material imunoabsorvente compreendendo o(s) agente(s) de ligação e em valores de  $K_D$  significativamente mais altos. Preferencialmente, a presença de pelo menos dois epítomos espacialmente separados na molécula alvo produz pelo menos um aumento de 5, 10, 50, 100, 500 ou 1000 vezes na afinidade ou valor de  $K_D$  para o material imunoabsorvente compreendendo um agente de ligação em comparação com a afinidade ou valor de  $K_D$  de uma molécula alvo compreendendo apenas uma única cópia do mesmo epítopo. Entende-se aqui que 120 fM é uma afinidade ou valor de  $K_D$  mais alto do que, por exemplo, 6,3 nM. A presença de pelo menos dois epítomos espacialmente separados na molécula alvo produz, ou melhor, induz avidéz

para o material imunoadsorvente compreendendo um agente de ligação em comparação com uma molécula alvo compreendendo apenas uma única cópia do epítopo. Avidéz é aqui entendida como referindo-se à força de ligação de uma molécula alvo com múltiplos sítios de ligação por um complexo maior de agentes de ligação, isto é, a força de ligação da ligação multivalente. Afinidade, por outro lado, refere-se a sistemas receptor-ligando monovalentes simples.

Assim, numa forma de realização preferida, a avidéz do material imunoadsorvente para a molécula alvo é pelo menos 5, 10, 50, 100, 500 ou 1000 vezes superior à afinidade mais baixa de um agente de ligação para um epítopo individual na molécula alvo. A afinidade baixa refere-se aqui à situação em que o material imunoadsorvente compreende mais do que um tipo de agente de ligação para epítopos imunologicamente distintos na molécula alvo e em que cada tipo individual de agente de ligação pode ter uma afinidade diferente para o seu epítopo. Na situação em que um único tipo de agente de ligação liga um epítopo que se repete na molécula alvo a afinidade mais baixa é a afinidade do agente de ligação para uma molécula de ensaio compreendendo apenas uma única cópia do epítopo.

A separação espacial dos pelo menos dois epítopos na molécula alvo é, desse modo, mais preferencialmente de tal forma que a capacidade de ligação dinâmica do material imunoadsorvente compreendendo um agente de ligação para a molécula alvo é aumentada em pelo menos 10, 20, 50, 100 ou 200% em comparação com a capacidade de ligação dinâmica do material para uma molécula alvo compreendendo apenas uma única cópia do epítopo. A capacidade de ligação dinâmica (DBC) é aqui definida como a área do pico de eluição dividida pela área de pico total (escoamento + eluição) e

este multiplicado pela quantidade de molécula alvo (ver Exemplo 3).

Outra característica importante da presente invenção é que apesar da ligação multivalente da molécula alvo ao material imunoabsorvente conduzir a afinidades de ligação ou avides elevadas para a molécula alvo, a libertação das referidas moléculas pode ser contudo obtida em condições de eluição suaves. Assim, numa forma de realização preferida, a avides de um material imunoabsorvente compreendendo um agente de ligação para a molécula alvo é pelo menos  $1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ,  $1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$  ou  $1 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$ . Preferencialmente, à mesma pelo menos 90% da molécula alvo pode ser eluída a partir do material imunoabsorvente a um pH de 2,5, 2,75, 3,0, 3,25, 3,5 ou maior. No entanto, preferencialmente as afinidades individuais de um agente de ligação para um epítopo na molécula alvo são inferiores a  $1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ,  $1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$  ou  $1 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$ .

As características definidas acima de ligação da molécula alvo ao material imunoabsorvente podem ser conseguidas quando os pelo menos dois epítomos na molécula alvo estão espacialmente separados por pelo menos 10, 20, 25, 30, 40, 50 ou 60 Ångstrom.

Nos métodos da invenção, os pelo menos dois epítomos na molécula alvo podem ser pelo menos dois epítomos imunologicamente distintos. Nesse caso são necessários pelo menos dois agentes de ligação distintos no material imunoabsorvente, preferencialmente um para cada epítopo imunologicamente distinto.

Alternativamente, os métodos da invenção, os pelo menos dois epítomos na molécula alvo podem ser pelo menos dois epítomos imunologicamente idênticos que estão repetidos na

molécula alvo. Nesse caso é necessário apenas um único tipo de agente de ligação no material imunoadsorvente. As moléculas alvo com repetições de epítomos são, por exemplo, proteínas homo-multiméricas tais como, por exemplo, imunoglobulinas compreendendo 2 cadeias leves e 2 pesadas.

O método compreende preferencialmente um passo de seleção do agente de ligação. Esta seleção é preferencialmente feita em condições que imitam as condições de carga e eluição para encontrar um agente de ligação que ligue com afinidade suficiente para ligar a molécula alvo durante a carga e que também possa ser eluída facilmente.

Numa forma de realização da invenção, o agente de ligação deve ter afinidade de ligação para um epítomo que ocorre pelo menos duas vezes na molécula alvo. Através desta seleção são selecionados agentes de ligação, especialmente anticorpos ou seus fragmentos, que podem proporcionar ligação multivalente com uma molécula alvo. Na prática, dois agentes de ligação individuais, especialmente moléculas de anticorpo, podem ligar-se a epítomos diferentes da mesma molécula alvo, levando à ligação multivalente da molécula alvo. Esta multivalência aumenta a afinidade de ligação e a capacidade do imunoadsorvente com níveis surpreendentemente altos. Sem se pretender ficar limitado por qualquer teoria, julga-se que a ligação multivalente é essencial para conseguir a afinidade, ou antes avidéz, elevada, a alta capacidade de ligação dinâmica e a eluição suave que são os objetivos da presente invenção.

Os exemplos de tais anticorpos ou seus fragmentos são anticorpos que reconhecem especificamente um epítomo que está presente na cadeia leve kappa ou lambda dos anticorpos humanos. Neste exemplo o anticorpo humano é a molécula

alvo. Os anticorpos humanos compreendem duas cadeias leves kappa que compreendem os epítomos.

Noutra forma de realização da invenção no passo de seleção são selecionados pelo menos dois agentes de ligação, compreendendo um agente de ligação com afinidade de ligação para um epítomo (um) na molécula alvo e um agente de ligação com afinidade de ligação para um epítomo diferente (dois) na molécula alvo. Na prática, o material adsorvente compreenderá estes dois agentes de ligação diferentes, especialmente anticorpos ou seus fragmentos, que podem ligar-se simultaneamente à mesma molécula alvo, levando novamente à ligação multivalente da molécula alvo.

Como mencionado acima, a ligação multivalente da molécula alvo, isto é, cada molécula alvo liga-se ao material imunoadsorvente através de pelo menos duas ligações agente de ligação-epítomo, é um aspeto preferido da presente invenção.

Entender-se-á que a ligação multivalente ocorrerá de forma ótima se a estrutura tridimensional da molécula alvo for de tal forma que permite esta ligação múltipla. Na prática, isto significa que está preferencialmente presente uma certa distância entre os dois epítomos na molécula alvo. A aptidão da molécula alvo para ligação multivalente pode ser deduzida a partir da sua estrutura cristalina 3D.

A seleção do anticorpo ou fragmento é preferencialmente seguida da sua produção em quantidades maiores. Os sistemas de produção adequados incluem *Saccharomyces Cerevisiae* ou outras leveduras, bolores ou sistemas de expressão bacterianos.

Preferencialmente, aquela é seguida de um passo em que o agente de ligação é posto em contacto com o material imunoabsorvente. O imunoabsorvente e o agente de ligação podem estar ligados covalentemente ou através de outras interações. Preferencialmente, o agente de ligação está covalentemente acoplado a um material imunoabsorvente. Existem muitos protocolos conhecidos para imobilizar proteínas ou fragmentos em material adsorvente.

Entender-se-á que quando é feita referência ao imunoabsorvente compreendendo "um" agente de ligação, isto pretende também referir-se à situação em que um material imunoabsorvente é carregado com muitas moléculas individuais de agente de ligação.

Os exemplos de material imunoabsorvente adequado incluem materiais transportadores porosos de fase sólida tais como agarose, poliestireno, vidro de poro controlado, celulose, dextranos, terra-de-infusórios, polímeros sintéticos tais como Sepharose™, sílica amorfa porosa. Os materiais transportadores podem estar em qualquer formato adequado tal como partículas, pós, folhas, esferas, filtros e semelhantes. Outras especificações de materiais transportadores adequados são, por exemplo, divulgadas na EP-A-434317.

Estão disponíveis métodos para imobilizar ligandos de forma rápida, fácil e segura através de um grupo funcional escolhido. A escolha correta do método de acoplamento depende da substância a ser imobilizada. Por exemplo, os seguintes derivados de Sepharose™ comercialmente conhecidos permitem a imobilização conveniente de proteínas nos mesmos: a Sepharose™ 4B ativada com CnBr permite que ligandos contendo grupos amino primários sejam rapidamente imobilizados por uma reação espontânea.

As AH-Sepharose™ 4B e CH-Sepharose™ 4B têm ambas um braço espaçador com seis carbonos de comprimento e permitem o acoplamento através de grupos carboxilo e amino respetivamente. Os espaçadores flexíveis são adequados para serem utilizados em situações onde a flexibilidade das moléculas alvo é limitada ou onde a estrutura tridimensional do alvo requer alguma flexibilidade do agente de ligação para permitir uma ligação ótima.

A CH-Sepharose™ 4B ativada proporciona um braço espaçador com seis carbonos e um éster ativo para acoplamento espontâneo através de grupos amino.

Estes são apenas alguns exemplos de vias de imobilização adequadas.

Opcionalmente, o material imunoabsorvente é colocado numa coluna para facilitar separações cromatográficas fáceis.

Num passo seguinte preferido, o material imunoabsorvente é posto em contacto com uma composição compreendendo o alvo. Frequentemente, a composição será uma composição aquosa compreendendo muitas outras proteínas além do alvo a ser purificado. As condições deste passo de contacto são de tal forma que ocorre a ligação do agente de ligação à molécula alvo.

Preferencialmente, neste passo é utilizado um tampão de carga possuindo um pH em torno de 6,5 a 8. Um tampão adequado é um tampão de PBS.

É preferido que o material carregado seja lavado até terem eluído os agentes de ligação não específicos.

A dessorção da molécula alvo é o passo seguinte. Este é preferencialmente realizado mudando as condições de forma que o anticorpo ou fragmento já não liga a molécula alvo.

A eluição pode ser conseguida mudando as condições em relação ao pH, sal, temperatura ou qualquer outra medida adequada. Um método de eluição preferido para dessorção é a eluição com um tampão possuindo um pH inferior a 3.

Mais especificamente a invenção refere-se a um método para a purificação de uma molécula alvo por imunoafinidade compreendendo os passos de:

- a) seleccionar um anticorpo ou seu fragmento, que se liga a um epítopo que está presente pelo menos duas vezes na molécula alvo;
- b) ligar o anticorpo ou seu fragmento ao material imunoadsorvente;
- c) carregar o material imunoadsorvente com uma composição compreendendo a molécula alvo, preferencialmente em condições às quais ocorre a ligação multivalente do agente de ligação à molécula alvo;
- d) lavar o imunoadsorvente carregado para remover agentes de ligação não específicos; e,
- e) eluir a molécula alvo aplicando condições de eluição.

O agente de ligação pode ser proveniente de qualquer organismo fonte adequado ou pode ser preparado sinteticamente ou por organismos geneticamente modificados. É importante que o fragmento retenha a afinidade de ligação como definida acima no contexto desta invenção.

Os exemplos de fragmentos adequados são os fragmentos Fab, fragmentos Fv.

Numa forma de realização preferida, os agentes de ligação são anticorpos, mais preferida tais anticorpos ou seus fragmentos são derivados de anticorpos naturalmente desprovidos de cadeias leves. Tais anticorpos são, por exemplo, obtidos por imunização de lamas ou tubarões e purificação dos anticorpos assim gerados. Estes anticorpos compreendem apenas cadeias pesadas e são desprovidos de cadeias leves. A vantagem da utilização destes anticorpos é que são excepcionalmente estáveis mesmo a altas temperaturas, pequenos e facilmente produzidos em organismos hospedeiros tais como *Saccharomyces cerevisiae*. Estes anticorpos são descritos em mais pormenor na EP-A-656946.

De uma maneira mais geral, o agente de ligação compreende preferencialmente o domínio variável derivado de imunoglobulina que compreende um sítio de ligação de antigénio completo para um epítipo na molécula alvo numa única cadeia polipeptídica. Assim, tais agentes incluem especificamente mas se limitam a:

- 1) anticorpos que podem ser obtidos a partir de camelídeos e tubarões que consistem apenas de cadeias pesadas e que são naturalmente desprovidos de cadeias leves;
- 2) domínios variáveis dos anticorpos definidos em 1), geralmente referidos como domínios VHH;
- 3) formas manipuladas dos anticorpos definidos em 1) tais como, por exemplo, anticorpos "camelidizados" nos quais as sequências estruturais de um domínio VHH de camelídeo (ou tubarão) são enxertadas com CDRs obtidos de outras fontes;
- 4) formas manipuladas de domínios variáveis tipo imunoglobulina nos quais as sequências estruturais de uma variedade de moléculas tipo imunoglobulina são combinadas com CDRs específicos para uma dada molécula alvo como descrito, por exemplo, em WO 04/108749.

A seguir é dada uma definição de CDR e sequências estruturais. Entende-se ainda que a sequência de aminoácidos estrutural de um domínio variável derivado de imunoglobulina que compreende um sítio de ligação de antígeno completo para um epítipo na molécula alvo numa única cadeia polipeptídica tem preferencialmente pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 ou 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estrutural de qualquer uma de SEQ ID NO 1 - 33. Preferencialmente, o domínio variável derivado de imunoglobulina tem uma afinidade para o epítipo como definida aqui acima.

Um agente de ligação preferido é um fragmento de anticorpo de domínio único derivado de um anticorpo camelídeo. Aqui, derivado de um anticorpo camelídeo significa apenas que as sequências de aminoácidos estruturais do fragmento são como definidas acima mas que o fragmento pode ser concebido e sintetizado, em vez de ser obtido diretamente ou gerado num organismo camelídeo.

Nós determinamos que o material imunoadsorvente da invenção, compreendendo um agente de ligação que se liga especificamente à cadeia leve kappa de anticorpos humanos, exhibe afinidade e capacidade muito boas e precisa apenas de condições de eluição suaves.

Por conseguinte, numa forma de realização específica, a invenção refere-se a um material imunoadsorvente compreendendo um agente de ligação que tem afinidade de ligação para a cadeia leve kappa de anticorpos humanos.

A invenção refere-se ainda à utilização desse material na purificação de anticorpos humanos.

Numa forma de realização, a invenção refere-se a um agente de ligação que é selecionado do grupo de moléculas VHH de ligação à cadeia leve kappa selecionadas de SEQ ID NO 1 - 15 ou um agente de ligação compreendendo um domínio variável derivado de imunoglobulina compreendendo uma região determinante de complementaridade (CDR) 1, 2 e/ou 3 exibindo pelo menos 80, 85, 90, 95, 98% de identidade de aminoácidos com as CDRs das moléculas VHH de SEQ ID NO 1 - 15. Preferencialmente, os domínios variáveis derivados de imunoglobulina têm uma afinidade para a cadeia leve kappa de anticorpos humanos que é pelo menos  $10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^7 \text{ M}^{-1}$  ou  $10^8 \text{ M}^{-1}$ . As CDRs 1, 2 e 3 podem exibir cada individualmente as identidades definidas acima ou as CDRs podem exibir coletivamente as identidades definidas acima.

As regiões determinantes de complementaridade (CDR) 1, 2 e/ou 3 das moléculas VHH são aqui definidas como representadas nas Figuras 3 e 4. Mais geralmente, as CDRs dos domínios de cadeia pesada variável de camélideo são aqui definidas como descritas por Vu et al. (1997, Mol Immunol. 34(16-17):1121-31). As sequências de VHH diferentes das sequências CDR na SEQ ID NO 1 - 33 ou como definidas por Vu et al. (1997, *supra*) são aqui definidas como sequências estruturais VHH.

Noutra forma de realização mais específica, a invenção refere-se a um material imunoabsorvente compreendendo um anticorpo ou seu fragmento ativo possuindo a sequência de aminoácidos especificada abaixo como Sequência ID 1.

**Sequência ID 1:**

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTISRYAMSWFRQAPGKEREFVAVARRSGDGAFYADSVQGRFTV  
SRDDAKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCAIDSDTFYSGSYDYWGQGTQVTVSS

Noutra forma de realização, a invenção refere-se a um anticorpo ou fragmento possuindo afinidade de ligação para um anticorpo humano, em que as sequências compreendem a sequência de acordo com a sequência ID nº 1 ou são essencialmente homólogas à mesma. No contexto da invenção essencialmente homólogo significa que a molécula homóloga exibe a afinidade de ligação desejada de pelo menos  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . Os exemplos de sequências homólogas são sequências que foram modificadas na parte estrutural mas não na parte de ligação ao antigénio do anticorpo de acordo com a sequência ID 1.

Ainda noutra forma de realização, a invenção refere-se a um agente de ligação que é selecionado do grupo de moléculas VHH de ligação à cadeia leve lambda selecionadas de SEQ ID NO 16 - 33 ou um agente de ligação compreendendo um domínio variável derivado de imunoglobulina compreendendo Regiões Determinantes de Complementaridade (CDR) 1, 2 e/ou 3 exibindo pelo menos 80, 85, 90, 95, 98% de identidade de aminoácidos com as CDRs das moléculas VHH de SEQ ID NO 16 - 33. Preferencialmente, os domínios variáveis derivados de imunoglobulina têm uma afinidade para a cadeia leve lambda de anticorpos humanos que é pelo menos  $10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^7 \text{ M}^{-1}$  ou  $10^8 \text{ M}^{-1}$ . As CDRs 1, 2 e 3 podem exibir cada individualmente as identidades definidas acima ou as CDRs podem exibir coletivamente as identidades definidas acima.

Ainda numa outra forma de realização, o material imunoabsorvente compreende pelo menos dois agentes de ligação diferentes, que ligam cada um epítipo imunologicamente distinto de um domínio Fc de IgG humana, de acordo com o que os epítopos imunologicamente distintos do domínio Fc de IgG humana, estão espacialmente separados como aqui definidos acima.

Mais uma vez noutra forma de realização, o material imunoabsorvente compreende pelo menos dois agentes de ligação diferentes, que ligam cada um epítipo imunologicamente distinto de albumina de soro humano, de acordo com o que os epítipos imunologicamente distintos da albumina estão espacialmente separados como aqui definidos acima.

Noutra forma de realização, a presente invenção proporciona métodos e materiais imunoabsorventes que são extremamente adequados para a adsorção ou isolamento e/ou purificação de imunoglobulinas a partir de preparações em bruto, em particular de imunoglobulinas humanas dos tipos IgM, IgA, IgE e muito em particular dos isotipos IgG.

Os materiais imunoabsorventes compreendem como agentes de ligação de imunoglobulina, cadeias pesadas naturalmente desprovidas de uma cadeia leve, preferencialmente VHH de camélídeo, que são específicas para um epítipo que está presente pelo menos duas vezes na imunoglobulina alvo, os quais podem ser alvos idênticos ou diferentes.

Numa forma de realização preferida, o alvo pode compreender um epítipo presente numa cadeia leve dos isotipos kappa ou lambda, alvos esses que estão sempre presentes em duplicado numa imunoglobulina intacta.

Noutra forma de realização, aquele pode ser um epítipo que está presente duas vezes na parte Fc da imunoglobulina, ou dois epítipos diferentes que estão presentes na parte Fc e simultaneamente acessíveis para interação com a molécula de ligação VHH.

Ainda noutra forma de realização, os materiais imunoabsorventes podem compreender combinações de

anticorpos de ligação de kappa ou lambda com anticorpos de ligação de Fc, preferencialmente anticorpos VHH camelídeos, normalmente desprovidos de uma cadeia leve.

A utilização de agentes de ligação de imunoglobulina específicos para epítomos presente pelo menos duas vezes na imunoglobulina alvo resulta numa diminuição surpreendente da velocidade de dissociação de 10 vezes até mais de 1000 vezes nalguns casos, como se demonstra na secção de exemplos para os anticorpos de ligação de kappa. A diminuição da velocidade de dissociação é útil para processos de isolamento e purificação, já que a capacidade de ligação dinâmica dos materiais imunoabsorventes (ou taxa de retenção) é dramaticamente aumentada pela menor dissociação. Em segundo lugar, as imunoglobulinas podem ser ainda eluídas em condições suaves, o que é crucial para manter a sua integridade estrutural e propriedades de ligação de antigénio.

Neste documento e nas suas reivindicações, o verbo "compreender" e suas conjugações são utilizados no seu sentido não limitativo para significar que os itens que seguem a palavra estão incluídos, mas não estão excluídos os itens não especificamente mencionados. Além disso, a referência a um elemento pelo artigo indefinido "um" ou "uma" não exclui a possibilidade de que esteja presente mais do que um elemento, a menos que o contexto exija claramente que seja um e apenas um elemento. Assim, o artigo indefinido "um" ou "uma" significa geralmente "pelo menos um".

A invenção é ilustrada pelos exemplos que se seguem.

#### Descrição das figuras

Figura 1 Alinhamentos dos VHHs de ligação à cadeia leve lambda humana e kappa humana e consenso para as regiões CDR.

Figura 2 Sensorgramas de medições de afinidade Biacore; curvas de ligação de Fab e IgG em Biacore num circuito integrado sensor revestido com VHH kappa-1-Hu (A; ligação e dissociação, B; apenas dissociação, indicando o efeito na velocidade de dissociação (kdiss) induzida pela avidéz.

Figura 3 Sequências de aminoácidos da CDR de moléculas VHH de ligação à cadeia leve kappa humana.

Figura 4 Sequências de aminoácidos da CDR de moléculas VHH de ligação à cadeia leve lambda humana.

### Exemplos

Exemplo 1: Geração de ligandos VHH de Lama contra cadeias leves kappa de anticorpos humanos.

O protocolo que se segue é tomado como um exemplo de como os fragmentos VHH específicos podem ser isolados, clonados, expressados, em seguida acoplados sobre a matriz desejada.

Apesar dos fragmentos VHH particulares descritos neste exemplo terem sido derivados de um repertório imunológico, eles também poderiam ter sido selecionados de uma biblioteca de VHH não imunizada (ver EP1051493, Unilever) ou uma biblioteca de VHH não imunizada sintética/semissintética (ver W000/43507, Unilever).

Um lama foi imunizado com IgM policlonal preparada a partir de soro humano por técnicas de precipitação e filtração em gel e diluída em soro fisiológico tamponado com fosfato pH 7,4 (PBS). Para aumentar a especificidade da resposta imunológica, o lama recebeu vários reforços após a

imunização inicial (dias 0, 28 e 49) com 250 µg do antigénio mencionado acima em specol (ID-DLO, Lelystad, Países Baixos) (Boersma et al., 1992). Uma amostra de sangue de cerca de 150 mL foi colhida para heparina 6 dias após a última imunização. As células sanguíneas periféricas foram obtidas via uma centrifugação em Ficoll-Paque. A partir de cerca de  $2 \times 10^8$  linfócitos foi isolado o ARN total essencialmente como descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). O ADN que codifica fragmentos de VHH específicos pode ser depois isolado utilizando métodos semelhantes aos descritos em WO 94/04678 (Casterman et al.) e ligado, por exemplo, num vetor de expressão episomal de *Saccharomyces cerevisiae* como anteriormente descrito por Frenken et.al. (2000). A partir destas bibliotecas de expressão de VHH podem ser selecionados fragmentos VHH com a especificidade de ligação ao antigénio desejada (cadeias leves kappa ou lambda de anticorpos humanos) por rastreio direto dos sobrenadantes de cultura de colónias individuais de *S. cerevisiae* (Frenken et.al. 2000).

Alternativamente podem ser utilizados métodos de seleção baseados em técnicas de apresentação tipo apresentação em fago e apresentação em levedura para isolar clones que produzem VHH anti-cadeia leve kappa a partir dos repertórios imunológicos.

Para o rastreio, placas de ligação Nunc Maxisorp foram revestidas com antigénios de anticorpo humano e subsequentemente bloqueadas com leite em pó a 4% (p/v) em PBS. Os fragmentos VHH ligados foram detetados quer por um mAb anti-His de rato em combinação com um conjugado policlonal de cabra anti-rato-HRP (Bio-Rad, 172-1011) ou um soro policlonal de coelho anti-VHH de lama em combinação com um conjugado policlonal de suíno-anti-IgG de coelho-HPO

(Dako, P217). O rastreamento inicial foi realizado em placas Maxisorp revestidas com um anticorpo monoclonal de IgG1 humana que possuía uma cadeia leve kappa ou um mAb de IgG1 humana que possuía uma cadeia leve lambda. Os fragmentos VHH de lama que exibiram ligação apenas a IgG1 kappa foram ainda testados em ELISA com diferentes anticorpos monoclonais humanos (por exemplo IgG, IgA, IgM) para confirmar a especificidade de ligação para a cadeia leve kappa humana. Durante o processo de rastreamento puderam ser identificados fragmentos VHH adicionais que exibiram especificidade de ligação para a cadeia leve lambda humana. A especificidade de ligação de um dos fragmentos VHH anti-kappa humana (VHH kappa-1-Hu) como determinado por ELISA é dada no Quadro 1 e aqui comparada com dois outros fragmentos VHH que se ligam especificamente à porção Fc dos anticorpos de IgG humana (VHHs Fc-1-Hu e Fc-2-Hu, respectivamente). Estes fragmentos VHH foram obtidos a partir de uma biblioteca imunológica de VHH proveniente de um lama imunizado com fragmentos Fc humanos preparados a partir de IgG policlonal de soro humano. Como demonstrado no Quadro 1, o VHH kappa-1-Hu reconhece um epítipo que está presente nas cadeias leves kappa de anticorpos humanos e, portanto, liga-se a um epítipo que está presente duas vezes na molécula alvo, por exemplo, no caso de anticorpos de IgG, IgA e IgE ou dez vezes no caso de anticorpos de IgM. Ambos os fragmentos VHH Fc-1-Hu e Fc-2-Hu mostram ser específicos para um epítipo que está presente no domínio Fc de todas as 4 subclasses de IgG humana, estando o referido epítipo presente apenas uma vez na molécula alvo de IgG.

A sequência destes anticorpos é apresentada na sequência ID nº 1 a 15 para os VHHs de ligação à cadeia leve kappa, nº 16 a 31 para os VHHs de ligação a lambda. O consenso para ambos os agentes de ligação a kappa e lambda é mostrado na Figura 1.

Quadro 1 Especificidade de ligação dos fragmentos VHH anti-cadeia leve kappa humana e anti-Fc de IgG humana como determinada por ELISA.

Anticorpo:		Fragmento VHH:		
Espécie	Isotipo / Subclasse	Kappa-Hu	Fc-1-Hu	Fc-2-Hu
Humano	IgG <sub>1</sub> lambda	-	+	+
	IgG <sub>2</sub> lambda	-	+	+
	IgG <sub>3</sub> lambda	-	+	+
	IgG <sub>4</sub> lambda	-	+	+
	IgG <sub>1</sub> kappa	+	+	+
	IgG <sub>2</sub> kappa	+	+	+
	IgG <sub>3</sub> kappa	+	+	+
	IgG <sub>4</sub> kappa	+	+	+
	IgG, fragmentos Fab	+	-	-
	IgG, fragmentos Fc	-	+	+
	IgM (policlonal)	+	-	-
IgA (policlonal)	+	-	-	
Bovino	IgG (policlonal)	-	-	-
Rato	IgG (policlonal)	-	-	-

Produção de anticorpo e purificação por cromatografia de afinidade de metal imobilizado (IMAC)

Os fragmentos de anticorpo VHH foram produzidos à escala de fermentação de 1 litro ou 10 litros (balões agitados) utilizando uma estirpe geneticamente modificada de *Saccharomyces cerevisiae* e purificados utilizando cromatografia de troca iónica sobre SP sepharose de caudal rápido (Amersham Biosciences). Os anticorpos purificados foram submetidos a diálise contra três alterações de tampão de PBS, pH 7,4 ou o tampão de acoplamento necessário, 48 horas a 4°C, utilizando tubo de corte de 3,5 kDa (Spectra/Por 3; Spectrum Medical Industries). As

concentrações das amostras purificadas foram determinadas por OD<sub>280</sub>. Todas as amostras purificadas foram conservadas a -20 °C quando não estavam em utilização.

### Exemplo 2 Medições da afinidade

As constantes de afinidade de ligação dos fragmentos VHH kappa-1-Hu, Fc-1-Hu e Fc-2-Hu foram determinadas utilizando análise de ressonância plasmónica superficial (SPR) num BiaCore 3000. Para este efeito, os fragmentos VHH purificados foram imobilizados sobre a superfície de um circuito integrado sensor CM5 e subsequentemente incubados com diferentes concentrações de Fab humano e/ou anticorpos de IgG humana em tampão de HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH7,4; NaCl 0,15 M; EDTA 3 mM; 0,005% de Tensioativo P20). A ligação foi deixada decorrer durante 3 minutos a 30 µL/min seguida de um passo de dissociação de 15 minutos a 30 µL/min. Foram ajustadas curvas de ligação de acordo com um modelo de ligação de Langmuir 1:1 utilizando o software Biacore. No Quadro 2 é dada uma visão geral dos dados de afinidade calculados. No que diz respeito ao fragmento anti-kappa-1-Hu o efeito de avidéz é claramente demonstrado pelas grandes diferenças nas velocidades de dissociação entre Fab e moléculas de IgG. Uma vez que o fragmento anti-kappa-1-Hu está imobilizado sobre a superfície de um circuito integrado sensor, a referida superfície pode interagir simultaneamente com dois epítomos idênticos presentes numa molécula de IgG. Em comparação com a interação monovalente com fragmentos Fab humanos, a velocidade de dissociação ( $k_{diss}$ ) para a IgG é significativamente menor (> 1000 vezes) resultando num valor de  $K_D$  para a IgG de cerca de 120 fM que compara com 6,3 nM para os fragmentos Fab. O último valor situa-se na mesa gama que os valores de  $K_D$  para o dois VHHs anti-Fc-Hu

(6,4 e 2,2 nM para a IgG, respectivamente) indicando interações monovalentes.

Quadro 2 Dados de afinidade Biacore de VHHs anti-kappa-1-Hu e anti-Fc-Hu (VHHs imobilizados sobre o circuito integrado sensor).

VHH	Antigénio	$k_{ass}$ (1/MS)	$k_{diss}$ (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Avidez
kappa-1-Hu	Fab-Hu	$1,24 \times 10^5$	$7,78 \times 10^{-4}$	$1,60 \times 10^8$	$6,27 \times 10^{-9}$	Não
kappa-1-Hu	IgG-Hu	$4,18 \times 10^5$	$5,29 \times 10^{-8}$	$7,90 \times 10^{12}$	$1,27 \times 10^{-13}$	Sim
Fc-1-Hu	IgG-Hu	$2,15 \times 10^5$	$1,39 \times 10^{-3}$	$1,55 \times 10^6$	$6,44 \times 10^{-9}$	Não
Fc-2-Hu	IgG-Hu	$8,30 \times 10^5$	$1,78 \times 10^{-3}$	$4,66 \times 10^8$	$2,15 \times 10^{-9}$	Não

Este efeito na velocidade de dissociação ( $k_{diss}$ ) induzida pela avidéz é ainda ilustrado pela Figura 2, a qual compara as curvas de ligação de Fab e IgG em Biacore (sensorgramas).

Exemplo 3: Materiais e métodos gerais para acoplamento e avaliação por cromatografia *Acoplamento a sepharose 4 de Caudal Rápido ativada com N-hidroxissuccinimida (NHS)*

Após purificação, os anticorpos foram submetidos a diálise contra tampão de acoplamento com NHS. Este tampão contém HEPES 0,1 M, pH 8,3. Para uma eficiência de acoplamento ótima, a proporção recomendada de volumes da solução de acoplamento/NHS sepharose é de 0,5 : 1. Os anticorpos tinham concentrações diferentes, 0,5-15 mg/mL, a proporção de anticorpo/NHS sepharose dos anticorpos variou entre 1 : 1 e 10 : 1. Quando é imobilizada uma mistura de 2 ligandos numa matriz foi utilizada uma proporção 1:1 dos ligandos. O seguinte procedimento foi utilizado para acoplar os anticorpos a sepharose 4 de Caudal Rápido ativada com NHS (General Electric Healthcare). Subsequentemente, a matriz foi lavada duas vezes com tampão de acoplamento com NHS. A

NHS sepharose foi misturada com a solução de anticorpo e deixada de um dia para o outro a 4°C em agitação por rotação vertical ou 1 hora à temperatura ambiente. Após incubação, o material de gel foi filtrado sobre um filtro de vidro sinterizado e os grupos por reagir do material de gel foram bloqueados com Tris (0,1 M, pH 8,0) 1 hora à temperatura ambiente. O meio acoplado foi lavado utilizando pH baixo e alto alternado (3× 10 vc PBS pH 2 e 3× 10 vc PBS pH 7,4). A eficiência de acoplamento foi determinada utilizando a fração não ligada. Esta é determinada medindo o valor de OD<sub>280</sub> da solução de acoplamento antes e após acoplamento. A eficiência de acoplamento foi também determinada olhando para o padrão de proteína na SDS-PAGE da solução de acoplamento antes e após acoplamento.

#### *Experiências de cromatografia*

Foram preparadas colunas a partir da matriz de anticorpo acoplado utilizando colunas HR 5/5 (GE Health). Foi utilizado um volume de coluna de 400 µL. Todas as experiências de cromatografia foram realizadas num Akta explorer 100. Foi utilizado um sistema de dois tampões, tampão A1 o tampão de carga foi PBS pH 7,4, tampão B o tampão de eluição por exemplo PBS com a adição de HCl 8 M para produzir pH 2,1 ou Glicina-HCl 0,1 M a pH 2 ou 3. Foram utilizados vários programas. A detecção da proteína foi realizada em linha seguindo o sinal de OD<sub>214</sub> e OD<sub>280</sub>. As frações foram recolhidas com um volume de 1 mL. As frações foram neutralizadas imediatamente com 20 µL de Tris (2 M).

#### *Determinação da capacidade de ligação dinâmica do matriz acoplada a anticorpo*

Para determinar a capacidade de ligação dinâmica, a coluna foi carregada com a molécula alvo. Foi utilizado um caudal de 150 cm/h. A quantidade de molécula alvo no escoamento e eluição foram calculadas por integração da área do escoamento e pico de eluição. A capacidade dinâmica é a área do pico de eluição dividida pela área de pico total (escoamento + eluição) e esta multiplicada pela quantidade de molécula alvo.

#### Exemplo 4: Capacidades de ligação dinâmicas de diferentes matrizes de VHH para a IgG humana

Os fragmentos VHH (ligandos) kappa-1-Hu, Fc-1-Hu e Fc-2-Hu foram immobilizados sobre NHS sepharose como descrito atrás. As densidades de ligando foram 20 mg de ligando por mL de matriz. A capacidade de ligação dinâmica foi determinada utilizando procedimentos como descritos acima. A coluna foi carregada com uma quantidade de IgG Humana superior à capacidade de ligação dinâmica esperada. A eluição foi realizada utilizando tampões de Glicina 0,1M com valores de pH entre 2 e 4.

Como se pode ver no Quadro 3, a capacidade de ligação dinâmica (DBC) mais elevada para a IgG humana é encontrada para a matriz de kappa-1-Hu e é quase 2 vezes maior em comparação com as matrizes de Fc-1-Hu e Fc-2-Hu. As medições de afinidade mostraram que a afinidade de ligação (KD) deste anticorpo para as moléculas de IgG humana (contendo 2 cadeias leves kappa idênticas) é de cerca de 120 fM. Isto é significativamente superior à afinidade de ligação efetiva da kappa-1-Hu para o seu epítipo presente nas cadeias leves kappa como determinado com os fragmentos de ligação monovalente Fab (6,3 nM). O último valor situa-se mais na gama de ambos os fragmentos VHH específicos para o Fc humano testados e composições geralmente conhecidas da

técnica anterior. Isto mostra que a utilização de materiais imunoabsorventes de acordo com a invenção leva a uma maior capacidade de ligação em comparação com os sistemas que não incluem a característica de ligação multivalente.

Outra característica importante da presente invenção é que apesar de os ligandos de ligação multivalente levarem a afinidades de ligação elevadas para a molécula alvo, a libertação das referidas moléculas pode ser ainda obtida em condições de eluição suaves. Como se demonstra no Quadro 3, o pH ótimo de eluição para a matriz de Fc-2-Hu é inferior (pH 2) em comparação com as matrizes de kappa-1-Hu e Fc-1-Hu (ambas pH 3). A força de ligação do fragmento Fc-2-Hu ao seu epítipo na IgG humana é quase 3 vezes maior em comparação com Fc-1-Hu e kappa-1-Hu (2,2 nM contra 6,4 nM e 6,3nM, respetivamente). Apesar de a ligação multivalente da matriz de kappa-1-Hu aumentar a capacidade de ligação dinâmica para a IgG humana em comparação com, por exemplo, a matriz de Fc-1-Hu, esta característica de avidéz claramente não afeta as condições para obter uma libertação eficiente da IgG ligada. As referidas condições são comparáveis àquelas dos sistemas que não incluem a característica of ligação multivalente (por exemplo matriz de Fc-1-Hu).

Os resultados como mencionados neste exemplo são medidos com uma altura de leito baixa e um tempo de residência curto. Alturas de leito maiores aumentarão o tempo de residência e a capacidade dinâmica. A capacidade dinâmica da coluna de kappa-1-Hu descrita a uma altura de leito de 15 cm e um caudal linear de 150cm/h é de 30 a 40 mg de IgG Humana/mL de matriz. Isto é cerca de duas vezes superior à capacidade de sistemas conhecidos que não incluem a característica de ligação multivalente, a qual é específica para a presente invenção.

Além disso, o exemplo demonstra que o princípio multivalente da presente invenção permite uma combinação única de alta capacidade de ligação por um lado e condições de eluição suaves por outro lado.

**Quadro 3** Comparação da capacidade de ligação dinâmica (DBC) de matrizes anti-IgG Humana.

Matriz	Densidade de Ligando (mg/mL)	DBC (mg IgGHu/mL)	pH de eluição que origina >90% de liberação da IgG ligada	KD para IgGHu (M-1)
kappa-1-Hu	20	24	3	$1,27 \times 10^{-13}$
Fc-1-Hu	20	14	3	$6,44 \times 10^{-9}$
Fc-2-Hu	20	15	2	$2,15 \times 10^{-9}$

Exemplo 5: Capacidades de ligação dinâmicas de matrizes para IgG humana compreendendo VHHs que se ligam a epítomos diferentes presentes na molécula alvo

Este exemplo demonstra a característica de maior capacidade de ligação induzida pela ligação multivalente utilizando pelo menos dois ligandos de VHH diferentes, em que cada ligando reconhece um epítomo diferente na molécula alvo, neste caso anticorpos de IgG humana.

Para este efeito foram utilizados dois ligandos anti-Fc de IgG humana (Fc-1-Hu e Fc-2-Hu), em que cada ligando se liga a um epítomo diferente presente no domínio Fc dos anticorpos de IgG humana como demonstrado pela análise de ligação Biacore (ver Quadro 4). Nesta experiência Biacore, ligandos anti-Fc de IgG humana purificados foram imobilizados sobre a superfície de um circuito integrado sensor CM5 e subsequentemente incubados com fragmentos Fc humanos. Este passo de captura de Fc humano foi seguido de

incubação com ligando VHH Fc-1-Hu ou Fc-2-Hu. O Quadro 4 mostra que o ligando VHH Fc-2-Hu pode ligar-se aos fragmentos Fc humanos quando capturado pelo ligando VHH Fc-1-Hu imobilizado e vice versa (51 RU e 181 RU, respectivamente) o que demonstra que cada ligando se liga a um epítipo diferente presente no domínio Fc dos anticorpos de IgG humana. Não foram obtidos sinais de ligação significativos nesta experiência utilizando pares ligandos idênticos, o que indica que cada ligando individual se liga a um epítipo no domínio Fc de anticorpos de IgG humana que está presente ou disponível apenas uma vez.

Quadro 4 Sinais de ligação de VHHs anti-Fc-Hu em fragmentos Fc humanos capturados em Biacore.

Experiência Biacore:			Sinal de Ligação (RU)
VHH Imobilizado	Alvo de captura (100 µg/mL)	VHH anti-Fc-Hu (100 µg/mL)	
Fc-1-Hu	Fc Humano	Fc-1-Hu	6,0
Fc-1-Hu	Fc Humano	Fc-2-Hu	51,0
Fc-2-Hu	Fc Humano	Fc-2-Hu	9,6
Fc-2-Hu	Fc Humano	Fc-1-Hu	181,9

Isto ilustra ainda mais que apesar dos anticorpos de IgG consistirem de duas cadeias pesadas e leves idênticas, os ligandos dirigidos contra os anticorpos podem reconhecer epítipos que são formados por uma combinação de cadeias idênticas tais como presentes no domínio Fc dos referidos anticorpos. Outra característica que pode ocorrer é que o ligando liga-se a um parte da cadeia pesada do domínio Fc de tal forma que impede a ligação de outro ligando idêntico devido a impedimento estérico.

A este respeito, os domínios de cadeia leve dos anticorpos (por exemplo anti-cadeias leves kappa humanas) como

demonstrados no Exemplo 4, provaram ser epítomos ideais para gerar ligandos específicos contra para permitir a ligação multivalente a um epítomo que está presente duas vezes no caso de anticorpos. Os referidos ligandos são claramente não afetados por esta característica de impedimento estérico.

Foram construídos três lotes diferentes de matrizes Fc anti-IgG humana (Fc-1-Hu, Fc-2-Hu e Fc-1-Hu/2) sobre NHS sepharose utilizando métodos como anteriormente descritos. Para cada matriz a densidade de ligando final foi de 2 mg de ligando por mL de matriz. A capacidade de ligação dinâmica foi determinada utilizando o procedimento como anteriormente descrito. A coluna foi carregada com uma quantidade de IgG humana superior à capacidade de ligação dinâmica esperada. Como se pode observar no Quadro 5, a capacidade de ligação dinâmica para a matriz mista Fc-1/2-Hu é superior a cada uma das matrizes individuais. A capacidade de ligação dinâmica para a matriz mista (2,45 mg IgG humana/mL de matriz) é 1,5 vezes superior ao valor médio das matrizes individuais (1,65 mg de IgG humana / mL de matriz) que no máximo poderia ser esperado quando não ocorresse qualquer ligação multivalente na matriz mista. Com base no princípio da ligação multivalente da presente invenção, estes resultados demonstram que podem ser obtidas matrizes com alta capacidade de ligação utilizando combinações de diferentes ligandos, em que cada ligando liga-se a um epítomo diferente presente na molécula alvo.

Quadro 5 Comparação da capacidade de ligação dinâmica (DBC) de matrizes mistas anti-IgG humana.

Matriz Mista	Densidade de Ligando (mg/mL)	DBC (mg IgGHu/mL)
Fc-1-Hu	2	1,95
Fc-2-Hu	2	1,35

Matriz Mista	Densidade de Ligando (mg/mL)	DBC (mg IgGHu/mL)
Fc-1-Hu / Fc-2-Hu	2	2,45

Exemplo 6: Capacidades de ligação dinâmicas de matrizes para albumina de soro humano compreendendo VHHs que se ligam a epítomos diferentes presentes na molécula alvo

Este exemplo demonstra a característica de maior capacidade de ligação induzida pela ligação multivalente utilizando pelo menos dois ligandos VHH diferentes, em que cada ligando reconhece um epítomo diferente na molécula alvo, neste caso albumina de soro humano.

Para este efeito foram utilizados três ligandos VHH específicos (HSA-1, HSA-2 e HSA-3) diferentes anti-albumina de soro humano (HSA). Estes ligandos VHH foram obtidos a partir de uma biblioteca imunológica de VHH proveniente de um lama imunizado com albumina de soro humano. A análise de ligação em Biacore de acordo com métodos como anteriormente descritos revelou que os ligandos HSA-2 e 3 se ligam ao mesmo epítomo presente na HSA, enquanto que o ligando HSA-1 se liga a um epítomo diferente permitindo uma ligação multivalente de HSA quando o ligando VHH HSA-1 é utilizado em combinação com o ligando VHH HSA-2 ou 3.

Foram construídos cinco lotes diferentes de matrizes anti-HSA (HSA-1, HSA-2, HSA-3, HSA-1/2 e HSA-2/3) sobre NHS sepharose utilizando métodos como anteriormente descritos. Para cada matriz a densidade de ligando final foi 2 mg de ligando por mL de matriz. A capacidade de ligação dinâmica foi determinada utilizando o procedimento como anteriormente descrito. A coluna foi carregada com uma quantidade de HSA superior à capacidade de ligação dinâmica esperada. Como se pode ver no Quadro 6, a capacidade de

ligação dinâmica para a matriz mista HSA-1/2 é maior do que para cada matriz individual e para a matriz mista HSA-1/3. A capacidade de ligação dinâmica da matriz mista HSA-1/2 é 2,14 mg de HSA/mL de matriz, o que é cerca de 1,5 vezes superior em comparação com o valor médio esperado de 1,48 mg de HSA/mL de matriz se não ocorresse qualquer ligação multivalente na matriz mista  $((1,72 + 1,23) / 2 = 1,48)$ . A capacidade de ligação dinâmica de HSA para a matriz mista HSA-2/3 é 0,83 mg de HSA/mL de matriz. Isto está em consonância com o valor médio esperado de 0,85 mg de HSA/mL de matriz, uma vez que ambos os ligandos se ligam ao mesmo epítipo presente na HSA e, por conseguinte, não podem induzir a ligação multivalente que leva a uma maior capacidade de ligação como demonstrado pela presente invenção.

Quadro 6 Comparação da capacidade de ligação dinâmica (DBC) de matrizes mistas anti-HSA.

Matriz Mista	Densidade de Ligando (mg/mL)	DBC (mg de HSA/mL)
HSA-1	2	1,72
HSA-2	2	1,23
HSA-3	2	0,46
HSA-1/2	2	2,14
HSA-2/3	2	0,83

### Referências

Boersma, W.J.A., Bogaerts, W.J.C., Bianchi, A.T.J., Claassen, E., 1992. Adjuvant properties of stable water-in-oil emulsions: evaluation of the experience with specol. Res. Immunol. 143, 503-512.

Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Frenken G.J., Richard H.J. van der Linden, Pim W.J.J. Hermans, J. Wil Bos a, Robin C. Ruuls, Bernard de Geus, C. Theo Verrips, 2000, *Journal of Biotechnology* 78, 11-21.

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Unilever N.V. / BAC Unilever N.V.

<120> Método para purificação por afinidade

<130> P6004885 pct / T7116

<160> 33

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln 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 Arg Thr Ile Ser Arg Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

Ala Val Ala Arg Arg Ser Gly Asp Gly Ala Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Ile Asp Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 2

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



Ala Ile Asp Ser Ser Thr Asp Tyr Thr Gly Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 4

<211> 121

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 4

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

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

Ala Val Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

Ala Val Ala Arg Arg Thr Gly Asp Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Ser Ala  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ile Asp Ser Ser Thr Phe Tyr Thr Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 5





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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Val Asp  
 20 25 30

Ile Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Arg Val  
 35 40 45

Gly Ser Met Tyr Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Val Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

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

Ile Thr Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Gln Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Ala Gly Ser Phe Tyr Trp Gly Ser Gly Thr  
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

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

Ser Val Ala Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

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

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

Leu Gln Leu Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Pro Tyr Gly Leu Gly Arg Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Val Asp  
20 25 30

Ile Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Arg Val  
35 40 45

Ala Ser Met Phe Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Val Asp Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Ala Gly Ser Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

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

Thr Val Ala Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Gly Lys Glu Arg Glu Phe  
35 40 45

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

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

Phe Leu Gln Met Ser Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Ala Gly Ser Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
100 105 110

Ser

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 11



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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Asp Val Ser Asp Asp Asn Thr Gly Lys Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 13

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ile His  
 20 25 30

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

Ala Ser Ile Ile Trp Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Gly Thr Thr  
 50 55 60

Phe Tyr Gly Asp Ser Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Asn Asp Asn  
 65 70 75 80

Ala Arg Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp  
 85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr Ser Leu Val Asn Pro Thr Arg  
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 14

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 14



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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ile His  
 20 25 30

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

Ala Ser Ile Ile Trp Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Gly Thr Thr  
 50 55 60

Phe Tyr Gly Asp Ser Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Asn Asp Asn  
 65 70 75 80

Ala Arg Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp  
 85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr Ser Leu Glu Asn Pro Thr Arg  
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 16

<211> 128

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Asp 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 Leu Asp Tyr Tyr  
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Tyr



&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lama glama

&lt;400&gt; 18

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
 35 40 45

Ser Cys Met Ser Ser Ser Asp Gly Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Tyr  
 50 55 60

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

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala  
 85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Thr Thr Asp Pro  
 100 105 110

Ser Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lama glama

&lt;400&gt; 19



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

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Gly Ile  
 35 40 45

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

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

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

Ala Ala Arg His Tyr Gly Leu Cys Val Val Asp Arg Tyr Tyr Tyr Asp  
 100 105 110

Met Gly Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 21

<211> 130

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly



Gln Val Gln Leu Gln Asp 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 Leu Asp Asn Tyr  
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Tyr Tyr Glu Asp Pro Val  
 50 55 60

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

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

Ala Ala Arg Leu Phe Gly Val Ala Thr Met Asp Pro Ser Tyr Phe Asp  
 100 105 110

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

<210> 23

<211> 119

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 23



Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
 20 25 30

Val Ala Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Asn Val Arg Gln Lys Ser Gly His Asn Ile Ser Ala Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 25

<211> 120

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 25

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
 20 25 30

Val Ala Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Asn Val Arg Gln Asn Ser Gly His Asn Ile Ser Ala Trp Gly Gln  
                           100  105  110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
                   115  120

<210> 26

<211> 119

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn  
                           20  25  30

Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gln Arg Glu Trp Val  
                   35  40  45

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

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

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

Ala Asn Ile Asn Ser Arg Val Gly Arg Ile Ser Ala Arg Gly Gln Gly  
                   100  105  110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
           115

<210> 27

<211> 124

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 27



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

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ile  
 35 40 45

Ser Cys Val Ser Ser Ser Asp Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

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

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

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

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

<210> 29

<211> 123

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 29

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

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

Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser  
 35 40 45

Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly His Thr Tyr Ser Val Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

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

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

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

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

<210> 30

<211> 128

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 30

Gln Val Gln Leu Gln Asp 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 Leu Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Ser Asp Gly Trp Thr Tyr Tyr  
 50 55 60

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

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala  
 85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Leu Phe Gly Val Ala Thr Thr Asp Pro  
 100 105 110

Ser Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 31

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 31

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

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Gly Ile  
 35 40 45

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

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

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

Ala Ala Arg Gln Tyr Gly Leu Cys Val Val Asp Arg Tyr Tyr Tyr Asp  
 100 105 110

Met Gly Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 32

<211> 124

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln 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 Leu Asp Asp Tyr  
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Phe  
35 40 45

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

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

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

Ala Thr Arg Leu Phe Gly Ile Cys Thr Val Asp Ala Gly Tyr Phe Gly  
100 105 110

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

<210> 33

<211> 121

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 33



**REIVINDICAÇÕES**

1. Método de purificação de uma imunoglobulina, em que:
  - a) o método compreende o passo de ligar a imunoglobulina a um material imunoabsorvente que compreende pelo menos um agente de ligação mono-específico;
  - b) o agente de ligação tem afinidade para pelo menos dois epítopos na imunoglobulina que estão espacialmente separados por pelo menos 30 angstrom; e
  - c) o agente de ligação mono-específico é um domínio variável de um anticorpo que pode ser obtido a partir de um camélídeo que consiste apenas de cadeias pesadas e que está naturalmente desprovido de cadeias leves.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a avidéz do material imunoabsorvente para a imunoglobulina é pelo menos 50 vezes superior à afinidade mais baixa de um agente de ligação para um epítipo individual.
3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o material imunoabsorvente compreende um primeiro agente de ligação com afinidade de ligação para um primeiro epítipo na imunoglobulina e um segundo agente de ligação com afinidade de ligação para um segundo epítipo na imunoglobulina e em que o primeiro e segundo epítopos são epítopos imunologicamente distintos.
4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que os pelo menos dois epítopos são pelo menos dois epítopos

imunologicamente idênticos que estão repetidos na imunoglobulina.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o agente de ligação compreende um domínio variável derivado de imunoglobulina que compreende um sítio de ligação de antigénio completo para um epítopo na imunoglobulina numa única cadeia polipeptídica e de acordo com o que as sequências de aminoácidos estruturais do domínio variável têm pelo menos 50% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estrutural de qualquer uma de SEQ ID NO 1 - 33.
6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que os pelo menos dois epítopos estão fora das CDR da imunoglobulina.
7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que pelo menos um epítopo está presente na cadeia leve da imunoglobulina.
8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que os pelo menos dois epítopos são epítopos de uma imunoglobulina humana.
9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que os epítopos são epítopos de uma cadeia leve de imunoglobulina humana do isotipo kappa ou lambda.
10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o agente de ligação é selecionado do grupo de moléculas VHH de ligação à cadeia leve kappa selecionadas das SEQ ID NO 1 - 15 ou um agente de ligação compreendendo um domínio variável derivado de imunoglobulina

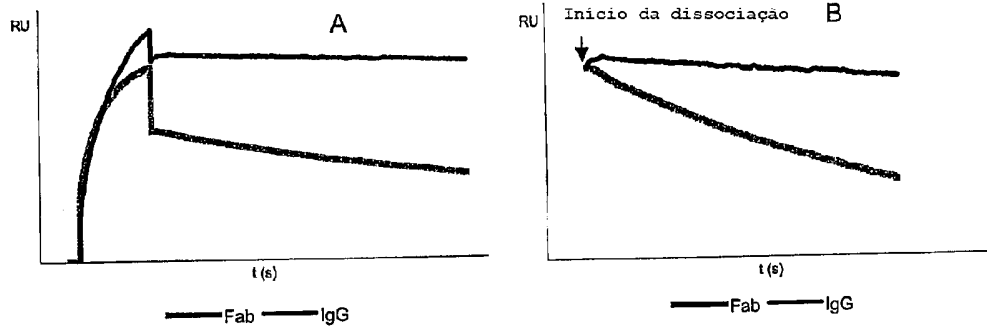
compreendendo uma Região Determinante de Complementaridade (CDR) 1, 2 e/ou 3 exibindo pelo menos 80, 85, 90, 95, 98% de identidade de aminoácidos com as CDRs das moléculas VHH de SEQ ID NO 1 - 15.

11. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o agente de ligação é selecionado do grupo de moléculas VHH de ligação à cadeia leve lambda selecionadas das SEQ ID NO 16 a 33 ou um agente de ligação compreendendo um domínio variável derivado de imunoglobulina compreendendo uma Região Determinante de Complementaridade (CDR) 1, 2 e/ou 3 exibindo pelo menos 80, 85, 90, 95, 98% de identidade de aminoácidos com as CDRs das moléculas VHH de SEQ ID NO 16 - 33.
12. Método de acordo com a reivindicação 8, em que os pelo menos dois epítomos são pelo menos dois epítomos imunologicamente distintos de um domínio Fc de IgG humana.

Figura 1

	Strutura-I	CDR-I	Strutura-II	CDR-II	Strutura-III	CDR-III	Strutura-IV				
HuFab kappa 1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	RYAMS	WFRQAPG-KEREFVA	VARR-----SGDGFAYDSVQ	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	DSDFYSGSYD	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CEAAGLTF	GYAMA	WFRQAPG-KEREFVA	LIIRW-----SGTYYSDSAK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	DESDRFGEY-DY	WGRGTQVTWSS		
HuFab kappa 3	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	RYAMS	WFRQAPG-KEREFVA	VARR-----SGDGFAYDSAE	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	DSSTDYTGTYD	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 4	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	RYAVS	WFRQAPG-KEREFVA	VARR-----TGDGFAYDSAE	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	DSSTFVTSYD	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 5	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	RYALS	WFRQAPG-KEREFVA	VRRM-----SGDGFAYDSAQ	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	DSDFYSGSYD	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 6	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASDRYFS	SHYMA	WFRQAPG-KEREFVA	RVDK-----SGSTAYADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	WAGS-----FY	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 7	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	VDIMY	WFRQAPG-KQREYV	SMYS-----DGTYYVDSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	G-----FY	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 8	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	GYSYA	WFRQAPG-KERELVA	SINR-----SGDNTYIIDSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	WAGS-----FY	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 9	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASRTFS	YTYVA	WFRQAPG-KEREFVA	QINW-----DGTYYVDSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VFLQMSLKPEDTAVYICAI	GSN-----	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	THYMA	WFRQAPG-QEREFVS	SISW-----NGAVNYLDSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	GRN-----	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 11	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	THYMA	WFRQAPG-QEREFVS	SISW-----GGDYYYSDSAE	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	DYSDNDTKG	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 12	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	IHLMA	WFRQAPG-KEREFVA	VIIR-----SIIWTGTYIYAGTTFYGD	SAE GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	TSLENPTRY-DY	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 13	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	IHLMA	WFRQAPG-KEREFVA	SIIWTGTYIYAGTTFYGD	SAE GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	TSLENPTRY-DY	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	IHLMA	WFRQAPG-KEREFVA	SIIWTGTYIYAGTTFYGD	SAE GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	TSLENPTRY-DY	WGOGTQVTWSS		
HuFab kappa 15	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTIS	IHLMA	WFRQAPG-KEREFVA	SIIWTGTYIYAGTTFYGD	SAE GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	TSLENPTRY-DY	WGOGTQVTWSS		
HuFab lambda 1	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	YYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISSDGS	SDCYTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS
HuFab lambda 2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	YYAIG	WFRQAPGKEREGIS	CISS-----SDSDTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 3	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	YYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISSDGS	SDCYTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS
HuFab lambda 4	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----SNGTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 5	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREGIS	CISS-----NVGTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 6	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISSDGS	SDCYTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS
HuFab lambda 7	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	YYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----GNSYTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 8	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	INFAA	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----SGTNYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 9	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	INVAI	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----GGTNYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	INVAI	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----SNGTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 11	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----SNGTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 12	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----SDTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 13	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISSDGS	SDCYTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS
HuFab lambda 14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----NVGTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 15	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----SAGTYIADSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 16	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----DGLIIEYSGSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 17	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----DGLIIEYSGSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	
HuFab lambda 18	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREGVS	CISS-----DGLIIEYSGSVK	GRETVSRDDAKNT	-----VYLQMSLKPEDTAVYICAI	RUEGVATWDP	SYF--DS	WGOGTQVTWSS	

Figura 2



**Figura 3 Resultados de Alinhamento VHhs kappa-Hu, CDRI, 2 e 3**

Alinhamento: Alinhamento global de Proteína contra molécula de referência		Parâmetros: BLOSUM 62		CDR-3		Início	Fim	Condiz	Não Condiz	%Identidade
<b>Grupo-I</b>										
kappa-1-Hu	CDR-1	CDR-2	CDR-3	SDTFYSGSY--DY	1	33	30	3	100	
kappa-5-Hu	RYAMS	VARRSGDGF-YADSVQD	SDTFYSGSY--DY	1	33	30	3	90		
kappa-4-Hu	RYALS	VARRSGDGF-YSDSAQD	SSTFYTGSY--DY	1	33	26	7	78		
kappa-3-Hu	RYAVS	VARRTGDGF-YSDSAED	SSTDYTGTY--DY	1	33	26	7	78		
kappa-2-Hu	RYAMS	VARRSGDGF-YSDSAED	PSDRFGEY---DY	1	32	16	18	47		
kappa-12-Hu	GVAMA	IIRWSGSTTY-YSDSAKD	VSDNTGKY--DY	1	33	15	18	45		
kappa-12-Hu	NYAMA	VIRRGGDYTY-YSDSAED								
<b>Grupo-II</b>										
kappa-10-Hu	CDR-1	CDR-2	CDR-3	QINWNGDSTN-YADSVKKG	1	24	15	9	100	
kappa-11-Hu	VYTVV	SISWNGAVTN-YLDSVKG	-----SN	1	24	15	9	62		
kappa-6-Hu	THTMA	RVDWSSGGSTE-YADSVKKG	-----RN	1	24	13	11	54		
kappa-8-Hu	SHTMA	SINRSGDNTY-IEDSVKPK	-----PY	1	30	12	18	40		
kappa-8-Hu	GYSVA		YGLGRY----DS	1						
<b>Grupo-III</b>										
kappa-13-Hu	CDR-1	CDR-2	CDR-3	GDSAETSIVNPTRYDY	1	38	37	1	100	
kappa-14-Hu	IHLMA	SIIWTGGTTY-YAGTTFY	GDSAETSIVNPTRYDY	1	38	37	1	97		
kappa-15-Hu	IHLMA	SIIWTGGTTY-YAGTTFY	GDSAETSLENPTRYDY	1	38	37	1	97		
<b>Grupo-IV</b>										
kappa-7-Hu	VDIMY	SMYSDGTTT--YVDSVKW	AGS-----FY	1	26	25	1	100		
kappa-9-Hu	VDIMY	SMFSDGTTT--YVDSVKW	AGS-----FY	1	26	25	1	96		

**Figura 4 Resultados de Alinhamento VHHs Lambda-Hu, CDR1, 2 e 3**

Alinhamento: Alinhamento global de Proteína contra molécula de referência  
 Parâmetros: Matriz de pontuação: BLOSUM 62

Grupo-I	CDR-1	CDR-2	CDR-3	Início	Fim	Condiz	Não Condiz	%Ident.
lambda-1-Hu	YIAIG	CISSDSSDGYTYADSVK	RLFGVATDPSYF---DS	1	40	38	2	100
lambda-15-Hu	DYIAG	CISSDSSDGYTYADSVK	RLFGVATDPSYF---DS	1	40	36	4	95
lambda-3-Hu	YIAIG	CMSSDSSDGYTYADSVK	RLYGIATDPSYF---DS	1	40	36	4	90
lambda-4-Hu	DYIAG	CISS-----SNGYTYEEDSVK	RLFGVATDPSYF---GS	1	36	31	9	77
lambda-12-Hu	DYIAG	CISS-----SNGYTYEEDSVK	SLFGVATDPSYF---GS	1	36	30	10	75
lambda-7-Hu	NYIAG	CISS-----GNSYTYEEDFPVK	RLFGVATDPSYF---DS	1	36	29	11	72
lambda-6-Hu	YIAIG	CISSDSSDGYTYADSVK	RHYGLCVVDPDYK-GY	1	42	30	12	71
lambda-17-Hu	DYIAG	CISS-----SAGNTYEDSVK	RLFGICTVDAGYF---GS	36	26	14	14	65
lambda-13-Hu	DYIAG	CVSS-----SDDTYADSVK	RLMGLCAVDEAYF---TS	1	35	24	16	60
lambda-14-Hu	DYIAG	CISS-----SDGHTYSVDSVK	RRWGLCTVDVVPYF---HS	1	36	24	16	60
lambda-2-Hu	YIAIG	CISS-----SDSDTYEEDSVK	RHYGLCVVDRAYAM-GY	1	38	24	18	57
lambda-16-Hu	DYIAG	CISS-----NVGSTYYADSVK	RQYGLCVVDRYYDM-GY	1	38	23	19	54
lambda-5-Hu	DYIAG	CISS-----NVGSTYYADSVK	ARHYGLCVVDRYYDMGY	1	39	23	20	53
Grupo-II	CDR-1	CDR-2	CDR-3	Início	Fim	Condiz	Não Condiz	%Ident.
lambda-8-Hu	INFAA	IVTS-----SGTNYADSVK	NEGTALTNL-----SA	1	31	31	0	100
lambda-11-Hu	INVMA	IVTS-----SGTNYADSVK	NINRVGRI-----SA	1	31	21	10	67
lambda-9-Hu	INVAY	GIMS-----GGTNYADSVK	NVRQKSGHNI-----SA	1	32	18	14	56
lambda-10-Hu	INVAY	GIMS-----GGTNYADSVK	NVRQNSGHNI-----SA	1	32	18	14	56
Grupo-II	CDR-1	CDR-2	CDR-3	Início	Fim	Condiz	Não Condiz	%Ident.
lambda-18-Hu	SYDMG	FISG-----DGGIIEYSGSVK	YRLTADAYNF-----RY	1	33	33	0	100