



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) BR 112015029643-2 B1

(22) Data do Depósito: 30/05/2014

(45) Data de Concessão: 12/12/2023

(54) Título: PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DE RECEPTOR DE ONCOSTATINA M, SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO E SEU USO, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO E CÉLULA HOSPEDEIRA PROCARIÓTICA RECOMBINANTE

(51) Int.Cl.: C07K 16/28.

(30) Prioridade Unionista: 30/05/2013 US 61/829,082.

(73) Titular(es): KINIKSA PHAMACEUTICALS, LTD..

(72) Inventor(es): HEATHER A. ARNETT; SABINE S. ESCOBAR; CHADWICK T. KING; AI CHING LIM; SARAVANAKUMAR NARAYANAN; PAUL H. WEINREB; NELS E. PEDERSON.

(86) Pedido PCT: PCT US2014040360 de 30/05/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/194274 de 04/12/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/11/2015

(57) Resumo: PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DE RECEPTOR DE ONCOSTATINA M, SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO E SEU USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO E CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE. A presente invenção refere-se a proteínas de ligação de antígeno de receptor antioncostatina M (Beta) (OSMR), por exemplo, anticorpos e fragmentos funcionais, derivados, muteínas e variantes dos mesmos. Proteínas de ligação de antígeno OSMR interferem com ligação de OSM e/ou IL-31 a OSMR. Em algumas modalidades, proteínas de ligação de antígeno anti-OSMR são ferramentas úteis no estudo de doenças e distúrbios associados com OSMR e são particularmente úteis em métodos para tratar doenças e distúrbios associados com OSMR e ligação de OSM e/ou IL-31 a OSMR.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DE RECEPTOR DE ONCOSTATINA M, SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO E SEU USO, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO E CÉLULA HOSPEDEIRA PROCARIÓTICA RECOMBINANTE**".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade do Ped. Provisório US 61/829.082, depositado em 30 de maio de 2013, cujo conteúdo é aqui incorporada como referência em sua totalidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Oncostatina M (OSM) e Interleucina-31 (IL-31) são membros da superfamília IL-6 e compartilham uma subunidade do receptor, receptor- β de oncostatina M (OSMR) (Dillon et al., *Nat. Immunol.* 5(7): 752-60, 2004). Todos os membros desta família, exceto 31-IL, compartilham a cadeia comum da glicoproteína 130 (gp130) em seus complexos de receptores multiméricos. Sinais OSM através de um complexo de receptor heterodimérico contendo OSMR e gp130, enquanto IL-31 utiliza um receptor tipo gp130, IL-31R, em combinação com OSMR (Dillon et al., *supra*; Dreuw et al., *J. Biol. Chem.* 279(34): 36112-20, 2004). Em geral, OSMR e gp130 são expressos razoavelmente ubiqüamente entre os tipos de tecidos e células, e podem ser induzidos sob uma variedade de condições de estimulação. A expressão de IL-31R parece ser relativamente mais restrita e fortemente regulada. Em humanos e camundongos semelhantes, a expressão de RNAm de IL-31R é detectável em baixos níveis nos tecidos como traqueia, músculo esquelético, timo e medula óssea (Dillon et al., *supra*). Embora o nível de expressão seja totalmente diferente, IL-31R e OSMR são coexpressos em uma infinidade de tecidos, incluindo pele e células epiteliais intestinais, sugerindo que esses tecidos devem responder a IL-31.

(Dillon et al., *supra*; Dambacher et al., Gut 56(9): 1257-65, 2007). Enquanto OSMR é expresso constitutivamente no pulmão nas células epiteliais, a expressão de IL-31R está em níveis insignificantes a baixos no tecido pulmonar, mas regulados para cima em vários métodos de desafio das vias respiratórias (Dillon et al., *supra*; Jawa et al., J. Interferon Cytokine Res. 28(4): 207-19, 2008).

[0003] Secretado principalmente pelos linfócitos T, macrófagos e neutrófilos, OSM e IL-31 são ambos regulados para cima em uma variedade de estados de doença que envolve a inflamação. OSM é implicado em diversas funções biológicas incluindo formação de osso, degradação de cartilagem, a absorção de colesterol, dor e inflamação (Cawston et al., Arthritis Rheum. 41(10):1760-71, 1998; Hasegawa et al., Rheumatology (Oxford) 38(7): 612-7, 1999; Levy et al., J. Hepatol. 32(2): 218-26, 2000; Manicourt et al., Arthritis. Rheum. 43(2): 281-8, 2000; de Hooge et al., Am J. Pathol. 160(5):1733-43, 2002; Luzina et al., Arthritis Rheum 48(8): 2262-74, 2003; Morikawa et al., J. Neurosci. 24(8): 1941-7, 2004; Kong et al., J. Lipid Res. 46(6): 1163-71, 2005). OSM demonstrou ser um potente modulador da matriz extracelular (ECM) em uma variedade de contextos, sugerindo que OSM é capaz de mediar opostas consequências patológicas aparentemente, incluindo fibrose (excesso de ECM) e degradação da cartilagem (um colapso de ECM). Dependendo do tipo de tecido e o meio ambiente, ambos estes efeitos foram observados quando OSM foi superexpresso ou exogenamente administrado em pulmões ou articulações de camundongos, respectivamente (Richards et al., Biochem. Soc. Trans. 30(2): 107-11, 2002; Hui et al., Arthritis Rheum. 48(12): 3404-18, 2003; Rowan et al., Am. J. Pathol. 162(6): 1975-84, 2003). Além disso, OSM anteriormente demonstrou ser regulado para cima em patologias humanas onde esses tipos de consequências existem (Cawston et al., *supra*; Hasegawa et al., *supra*; Levy et al., *supra*; Manicourt et al., *su-*

pra; Luzina et al., supra). Predominantemente, uma citocina de ação local, OSM é regulada para cima no líquido sinovial de articulações de pacientes com artrite reumatoide (RA) (Cawston et al., *supra*; Manicourt et al., *supra*), fluido de lavagem broncoalveolar (BAL) de pacientes com doença pulmonar intersticial associada à esclerodermia (Luzina et al., *supra*), fibrose pulmonar idiopática (IPF), e nos fígados de pacientes com cirrose (Levy et al., *supra*). O impacto proposto em ECM por OSM pode ser atribuído em parte pela capacidade de OSM deslocar o equilíbrio entre metaloproteinases de matriz (MMPs) e inibidores de tecido das MMPs (TIMPs). TIMPs se ligam a MMPs em uma razão 1:1 com uma alta afinidade que resulta em uma perda de atividade proteolítica de MMP. TIMP-1 e TIMP-3 anteriormente demonstraram ser regulados diferencialmente por OSM, resultando em um aumento em TIMP-1 e uma diminuição em TIMP-3 (Gatsios et al., Eur. J. Biochem. 241(1): 56-63, 1996). Além de regular a digestão de componentes da matriz extracelular, MMPs também estão implicados na clivagem e subsequente ativação de várias proteínas, incluindo TGF- β , uma potente citocina pró-fibrótica (Leask et al., FASEB J. 18(7): 816-27, 2004). OSM também foi relatado como sendo capaz de induzir diretamente a transcrição do colágeno tipo I *in vitro* (Hasegawa et al., J. Rheumatol. 25(2): 308-13, 1998).

[0004] A expressão de OSM e IL-31 foi encontrada na pele de pacientes com psoríase e dermatite atópica, e mutações em OSMR e IL-31R foram associadas à amiloidose cutânea sistêmica. A superexpressão transgênica em todo o sistema de IL-31 induziu uma resposta inflamatória pruriginosa na pele de camundongos. OSM e IL-31 sinalizam através de OSMR em neurônios onde demonstraram promover respostas nociceptivas e pruriginosas.

[0005] Coletivamente, essas ligações para doenças humanas e a capacidade de OSM e IL-31 em promover um diversificado leque de

patologias, incluindo pelo menos inflamação, remodelação da matriz extracelular, dor, e prurido, sugere que o bloqueio de OSMR é um alvo útil para intervenção terapêutica em muitas doenças e distúrbios associados com OSMR.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0006] A invenção fornece proteínas de ligação de antígeno anti-OSMR, por exemplo, anticorpos e fragmentos funcionais dos mesmos, tendo propriedades passíveis de produção comercial e uso terapêutico em seres humanos. As proteínas de ligação de antígeno anti-OSMR são úteis em métodos para tratar doenças e distúrbios associados com OSMR e, particularmente, aqueles associados com a ligação do OSM ou IL-31 para OSMR. São fornecidos aqui anticorpos de ligação de OSMR que se ligam a OSMR com alta afinidade e efetivamente bloqueiam ligação de OSM e/ou IL-31 para OSMR, desse modo reduzindo sinalização mediada por OSMR na célula.

[0007] Em um primeiro aspecto, a proteína de ligação de antígeno OSMR comprehende a) um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, ou SEQ ID NO:29; b) um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, ou SEQ ID NO:11; ou c) o domínio variável de cadeia leve de a) e o domínio variável de cadeia pesada de b).

[0008] Proteínas de ligação de antígeno preferenciais do primeiro aspecto incluem aquelas compreendendo um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:27 e um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID

NO:9; aquelas compreendendo um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:28 e um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:10; e aquelas compreendendo um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:29 e um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:11.

[0009] Proteínas de ligação de antígeno OSMR compreendendo um domínio variável de cadeia pesada tendo o parentesco de sequência acima definido para SEQ ID NO:9 pode opcionalmente conter um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:9. Nessas modalidades, o domínio variável de cadeia pesada opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:53.

[0010] Proteínas de ligação de antígeno OSMR compreendendo um domínio variável de cadeia pesada tendo o parentesco de sequência acima definido para SEQ ID NO:10 pode opcionalmente conter um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:10. Nessas modalidades, o domínio variável de cadeia pesada opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:54.

[0011] Em um segundo aspecto, uma proteína de ligação de antígeno OSMR compreende a) um domínio variável de cadeia leve tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, ou SEQ ID NO:29; b) um domínio variável de cadeia pesada tendo não mais que dez ou não mais

que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, ou SEQ ID NO:11; ou c) o domínio variável de cadeia leve de a) e o domínio variável de cadeia pesada de b).

[0012] Proteínas de ligação de antígeno preferenciais do segundo aspecto incluem aquelas compreendendo um domínio variável de cadeia leve tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:27 e um domínio variável de cadeia pesada tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:9; aquelas compreendendo um domínio variável de cadeia leve tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:28 e um domínio variável de cadeia pesada tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:10; e aquelas compreendendo um domínio variável de cadeia leve tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:29 e um domínio variável de cadeia pesada tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:11.

[0013] Proteínas de ligação de antígeno OSMR compreendendo um domínio variável de cadeia pesada tendo o parentesco de sequência acima definido para SEQ ID NO:9 pode opcionalmente conter um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:9. Nessas modalidades, o domínio variável de cadeia pesada opcionalmente compre-

ende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:53.

[0014] Proteínas de ligação de antígeno OSMR compreendendo um domínio variável de cadeia pesada tendo o parentesco de sequência acima definido para SEQ ID NO:10 pode opcionalmente conter um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:10. Nessas modalidades, o domínio variável de cadeia pesada opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:54.

[0015] Em um terceiro aspecto, a proteína de ligação de antígeno OSMR contém um domínio variável de cadeia leve compreendendo a) um LCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:30; um LCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:33; e um LCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:36; b) um LCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:31; um LCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:34; e um LCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:37; ou c) um LCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:32; um LCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:35; e um LCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:38; e um domínio variável de cadeia pesada compreendendo d)

um HCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:12; um HCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:15; e um HCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:18; e) um HCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:13; um HCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:16; e um HCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:19; ou f) um HCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:14; um HCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:17; e um HCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:20.

[0016] Proteínas de ligação de antígeno OSMR preferenciais do terceiro aspecto incluem aquelas compreendendo o domínio variável de cadeia leve de a) e o domínio variável de cadeia pesada de d); aquelas compreendendo o domínio variável de cadeia leve de b) e o domínio variável de cadeia pesada de e); e aquelas compreendendo o domínio variável de cadeia leve de c) e o domínio variável de cadeia pesada de f).

[0017] Proteínas de ligação de antígeno OSMR compreendendo o domínio variável de cadeia leve de a) e o domínio variável de cadeia pesada de d) pode opcionalmente conter um domínio variável de ca-

cadeia pesada que compreende um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:9. Nessas modalidades, o domínio variável de cadeia pesada opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:53.

[0018] Proteínas de ligação de antígeno OSMR compreendendo o domínio variável de cadeia leve de b) e o domínio variável de cadeia pesada de e) pode opcionalmente conter um domínio variável de cadeia pesada que compreende um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:10. Nessas modalidades, o domínio variável de cadeia pesada opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:54.

[0019] Em um quarto aspecto da invenção, a proteína de ligação de antígeno OSMR do primeiro, segundo, ou terceiro aspecto se liga a OSMR humano com uma afinidade de menos de ou igual a 1×10^{-10} M.

[0020] Em um quinto aspecto da invenção, a proteína de ligação de antígeno OSMR do primeiro, segundo, terceiro, ou quarto aspecto inibe a ligação de OSM humano para OSMR humano e/ou IL-31 humano para OSMR humano.

[0021] Em um sexto aspecto da invenção, uma proteína de ligação de antígeno OSMR do primeiro, segundo, terceiro, quarto, ou quinto aspecto reduz a sinalização de OSMR mediada por OSM humano e/ou mediada por IL-31 humano em células expressando OSMR humano.

[0022] Em um sétimo aspecto da invenção, a proteína de ligação de antígeno OSMR do sexto aspecto reduz a sinalização de OSMR mediada por IL-31 e/ou mediada por OSM de macaco cynomolgus em células expressando OSMR de macaco cynomolgus.

[0023] Em um oitavo aspecto da invenção, uma proteína de ligação de antígeno OSMR do primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto,

sexto ou sétimo aspecto é um anticorpo, como um anticorpo humano. Anticorpos preferenciais incluem aqueles anticorpos que compreendem uma cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:24 e uma cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:6; aqueles que compreendem uma cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID:25 e uma cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:7; e aqueles que compreendem uma cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID:26 e uma cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:8.

[0024] Anticorpos adicionais incluem aqueles anticorpos que compreendem uma cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:24 e uma cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:50; aqueles que compreendem uma cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID:25 e uma cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:51; e aqueles que compreendem uma cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID:26 e uma cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:52.

[0025] Em um nono aspecto, a invenção fornece ácidos nucleicos ou ácidos nucleicos isolados que codificam um ou mais componentes de polipeptídeo de uma proteína de ligação de antígeno OSMR, por exemplo, uma cadeia leve de anticorpo ou cadeia pesada de anticorpo. Em modalidades preferenciais, o ácido nucleico codifica um polipeptídeo compreendendo:

[0026] a) um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 95% de identidade à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, ou SEQ ID NO:29;

- [0027] b) um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 95% de identidade à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, ou SEQ ID NO:11;
- [0028] c) um domínio variável de cadeia leve tendo não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, ou SEQ ID NO:29;
- [0029] d) um domínio variável de cadeia pesada tendo não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, ou SEQ ID NO:11;
- [0030] e) um domínio variável de cadeia leve compreendendo:
- [0031] i) um LCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:30; um LCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:33; e um LCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:36;
- [0032] ii) um LCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:31; um LCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:34; e um LCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:37; ou
- [0033] iii) um LCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:32; um LCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR2 esta-

belecida em SEQ ID NO:35; e um LCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:38; ou

[0034] f) um domínio variável de cadeia pesada compreendendo:

[0035] i) um HCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:12; um HCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:15; e um HCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:18;

[0036] ii) um HCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:13; um HCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:16; e um HCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:19; ou

[0037] iii) um HCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:14; um HCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:17; e um HCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:20.

[0038] Em certas modalidades, o ácido nucleico ou ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:53 ou SEQ ID NO:54.

[0039] Em certas modalidades, o ácido nucleico ou ácido nuclei-

co isolado codifica um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, ou SEQ ID NO:52.

[0040] Em certas modalidades do nono aspecto, o ácido nucleico ou ácido nucleico isolado codifica uma cadeia leve de anticorpo e é pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é 100% idêntica à sequência de nucleotídeo estabelecida em SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, ou SEQ ID NO:23. Em outras modalidades do nono aspecto, o ácido nucleico ou ácido nucleico isolado codifica uma cadeia pesada de anticorpo e é pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é 100% idêntica à sequência de nucleotídeo estabelecida em SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:5.

[0041] Em certas modalidades, a cadeia pesada é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo estabelecida em SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, ou SEQ ID NO:49.

[0042] Em um décimo aspecto, a invenção fornece um vetor de expressão compreendendo um ou mais ácidos nucleicos ou ácidos nucleicos isolados do oitavo aspecto. Em certas modalidades, o vetor de expressão codifica uma cadeia leve de anticorpo, uma cadeia pesada de anticorpo, ou uma cadeia leve e uma cadeia pesada de anticorpo.

[0043] Em um décimo primeiro aspecto, a invenção fornece uma célula hospedeira recombinante compreendendo um ou mais ácidos nucleicos ou ácidos nucleicos isolados do nono aspecto operacionalmente ligados a um promotor, incluindo células hospedeiras recombinantes compreendendo um ou mais vetores de expressão do décimo aspecto da invenção. Em modalidades preferenciais, a célula hospedeira recombinante secreta um anticorpo que se liga a OSMR. Células hospedeiras preferenciais são células hospedeiras de mamífero, incluindo linhagens de células CHO.

[0044] Em um décimo segundo aspecto, a invenção fornece mé-

todos para tratar de um distúrbio autoimune, um distúrbio inflamatório, ou um distúrbio associado com deposição de matriz extracelular ou remodelação, o referido método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de ligação de antígeno OSMR de qualquer um do primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sexto, sétimo ou oitavo aspecto a um paciente em necessidade do mesmo. Em modalidades preferenciais, uma proteína de ligação de antígeno OSMR é um anticorpo compreendendo uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia leve como estabelecida em SEQ ID NO:27 e uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia pesada como estabelecida em SEQ ID NO:9 (por exemplo, Ab1), um anticorpo compreendendo uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia leve como estabelecida em SEQ ID NO:28 e uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia pesada como estabelecida em SEQ ID NO:10 (por exemplo, Ab2), ou um anticorpo compreendendo uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia leve como estabelecida em SEQ ID NO:29 e uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia pesada como estabelecida em SEQ ID NO:11 (por exemplo, Ab3). Em algumas modalidades, uma proteína de ligação de antígeno OSMR é um anticorpo compreendendo uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia leve como estabelecida em SEQ ID NO:27 e uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia pesada como estabelecida em SEQ ID NO:53, ou um anticorpo compreendendo uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia leve como estabelecida em SEQ ID NO:28 e uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia pesada como estabelecida em SEQ ID NO:54. Em modalidades preferenciais, uma proteína de ligação de antígeno OSMR inibe a ligação de OSM para OSMR ou IL-31 para OSMR. Em modalidades particularmente preferenciais, o

distúrbio autoimune, distúrbio inflamatório, ou distúrbio associado com deposição de matriz extracelular ou remodelação é fibrose, degradação da cartilagem, artrite, artrite reumatoide, esclerodermia, doença pulmonar intersticial associada à esclerodermia, fibrose pulmonar idiopática, cirrose, psoríase, dermatite atópica, amiloidose cutânea sistêmica, amiloidose cutânea primária, inflamação, inflamação pruriginosa, prurigo nodular, e dor.

[0045] Em um décimo terceiro aspecto, a invenção fornece um método para preparar uma proteína de ligação de antígeno OSMR de qualquer um do primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo aspecto pelo cultivo de uma célula hospedeira recombinante do décimo primeiro aspecto e isolar uma proteína de ligação de antígeno OSMR da referida cultura.

[0046] Em um décimo quarto aspecto, a invenção fornece proteínas de ligação de antígeno OSMR de qualquer um do primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo ou oitavo aspecto que compete de forma cruzada com um anticorpo selecionado do grupo que consiste em:

[0047] a) um anticorpo compreendendo uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID:24 e uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:6;

[0048] b) um anticorpo compreendendo uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID:25 e uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:7;

[0049] c) um anticorpo compreendendo uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID:26 e uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:8.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0050] Os títulos de seção aqui são apenas com fins organizacionais e não devem ser interpretados como limitando o assunto descrito. Todas as referências citadas dentro do corpo desta especificação estão expressamente incorporadas como referência em suas totalidades.

[0051] Técnicas padrão podem ser utilizadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeo, cultura e transformação de tecidos, purificação de proteínas, etc. Reações enzimáticas e técnicas de purificação podem ser realizadas de acordo com as especificações do fabricante ou como são comumente realizadas na técnica ou como descrito aqui. Os seguintes procedimentos e técnicas fornecidos aqui são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais conhecidos na técnica e conforme descrito em várias referências mais gerais e específicas que são citadas e discutidas durante toda a presente especificação. Ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold Spring Harbor, N.Y., que é incorporado aqui como referência para qualquer finalidade. Salvo se definições específicas forem fornecidas, a nomenclatura utilizada em conexão com, e os procedimentos e técnicas de, química analítica, química orgânica sintética e química farmacêutica e medicinal aqui descritos é a conhecida e comumente usada na técnica. As técnicas convencionais podem ser usadas para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação e liberação e tratamento dos pacientes.

OSMR

[0052] As proteínas de ligação de antígeno descritas aqui se ligam para OSMR. OSM e IL-31 sinalizam através de OSMR. OSMR é um membro da família de receptor de citocina tipo I. OSMR heterodimeriza com glicoproteína 130 (também conhecida como gp130, transdutor de sinal de interleucina 6 (IL6ST), IL6-beta ou CD130) para for-

mar o OSMR tipo II. OSMR também heterodimeriza com receptor A de IL-31 (IL31RA) para formar o receptor de IL-31 e, assim, transduzir eventos de sinalização induzidos por OSM e IL-31. Em modalidades exemplares, uma proteína de ligação de antígeno OSMR se liga a OSMR e impede a sinalização mediada por OSM e/ou IL 31 em células expressando OSMR.

[0053] Sequências OSMR humanas são conhecidas na técnica. Em vários aspectos, sequências de proteína OSMR humanas são fornecidas no GenBank N.ºs de Acesso AAI25210, AAI25211, NP_003990, e EAW55976. Uma sequência de aminoácidos de OSMR humano exemplar (SEQ ID NO: 1) é fornecida na Tabela 1. A proteína é composta de vários domínios: Aminoácidos 1-27 correspondem à sequência sinal que pode ser clivada durante o processamento da proteína em células de mamíferos; aminoácidos 28-740 correspondem ao domínio extracelular; e aminoácidos 741-761 correspondem ao domínio transmembrana. Em modalidades preferenciais, as proteínas de ligação de antígeno descritas aqui se ligam ao domínio extracelular de OSMR em impedem a interação de OSM e/ou IL-31 com OSMR.

[0054] Sequências OSM humanas são conhecidas na técnica. Em vários aspectos, sequências de proteína OSM humanas são fornecidas no GenBank N.ºs de Acesso CAG30420, CAG46504, NP_065391, P13725, AAC05173, EAW59864, e AAH11589. Uma sequência de aminoácidos de OSM humano exemplar (SEQ ID NO: 39) é fornecida na Tabela 1. Aminoácidos 1-25 correspondem à sequência sinal; aminoácidos 26-220 correspondem à proteína madura; e aminoácidos 221-252 correspondem à sequência de pró-peptídeo.

[0055] Sequências IL-31 humanas são conhecidas na técnica. Em vários aspectos, sequências de proteína IL-31 humanas são fornecidas no GenBank N.ºs de Acesso NP_001014358, AAS86448, AAI32999, AAI33001, Q6EBC2, e EAW98310. Uma sequência de aminoácidos de

IL-31 humana exemplar (SEQ ID NO: 41) é fornecida na Tabela 1. Aminoácidos 1-23 correspondem à sequência sinal putativa.

[0056] Sequências IL31RA humanas são conhecidas na técnica. Em vários aspectos, sequências de proteína IL31RA humanas são fornecidas no GenBank N.^os de Acesso AAS86447, NP_001229567, e CBL94051. Uma sequência de aminoácidos de IL31RA humano (v4, isoforma 3) exemplar (SEQ ID NO: 43) é fornecida na Tabela 1. Aminoácidos 1-32 correspondem à sequência sinal; e aminoácidos 533-553 correspondem à sequência transmembrana.

[0057] Sequências gp130 humanas são conhecidas na técnica. Em vários aspectos, sequências de proteína gp130 humanas são fornecidas no GenBank N.^os de Acesso AAI17403, AAI17405, EAW54936, NP_002175, ABK41905, e AAA59155. Uma sequência de aminoácidos de gp130 humano exemplar (SEQ ID NO: 45) é fornecida na Tabela 1. A proteína é composta de vários domínios: Aminoácidos 1-22 correspondem à sequência sinal; aminoácidos 23-619 correspondem ao domínio extracelular; aminoácidos 620-641 correspondem ao domínio transmembrana; e aminoácidos 642-918 correspondem ao domínio citoplasmático.

Tabela 1

Sequência de aminoácidos de OSMR humano (SEQ ID NO:1) MALFAVFQTTFFLTLLSLRTYQSEVLAERLPLTPVSLKVSTNSTRQSLHLQWTVHNL-PYHQELKMVFQIQISRIETSNVIWGNYSTTVKWNQVLHWSWESELPLECATHFVRIKS-LVDDAKFPEPNFWSNWSSWEEVSVDQDGTGQDILFVFPKDKLVEEGTNVTICYVSRNI-QNNVSCYLEGKQIHGEQLDPHVTAFLNNSVPFIRNKGTNIYCEASQGNVSEGMKGIVLFVSKVLEEPKDFSCETEDFKTLHCTWDPGTDTALGWSKQPSQSFTLFESFSGEKL-KLCIHKNCNWQITQDSQETYNTLIAENYLRKRSVNILFNLTDRVYLMNPFSVNFEN-VNATNAIMTWKVHSIRNNFTYLCQIELHGEGKMMQYNVSIKVNGEYFLSELEPATEY-MARVRCADASHFWKWSEWSGQNFTTLEAAPSEAPDVWRIVSLEPGNHTVTLFWK-PLSKLHANGKILFYNVVVENLDKPSSSELHSIPAPANSTKLILDRCSYQICVIANNVGAS-PASVIVISADPENKEVEEERIAGTEGGFSLWKQPQGDVIGYVVWDWCDHTQDVL-GDFQWKVNGPNTTSTVISTDAFRPGVRYDFRIYGLSTKRIACLLEKKTGYSQELAPSDN-PHVLDLTSHSFTLSKDYSTESQPGFIQGYHVYLKSARQCHPRFEKAVALSDGSEC-

CKYKIDNPEEKALIVDNLKPESFYEFFITPFTSAGEGPSATFTKVTPDEHSSMLIHILL-PMVFCVLLIMVMCYLKSQLKETCYPDIPDPYKSSILSLIKFKENPHLIIMNVSDCIP-DAIEVVSKPEGTKIQFLGTRKSLTELETLPNYLYLLPTEKNHSGPGPCICFENLTYN-QAASDSGSCGHVPVSPKAPSMLGLMTSPENVLKALEKNYMNSLGEIPAGETSLNY-VSQLASPMFGDKDSLPTNPVEAPHCSEYKMQMAVSLRALPPPTENSSLSSITLLD-PGEHYC
Sequência de aminoácidos de OSM humano (SEQ ID NO:39) MGVLLTQRTLLSLVALLFPMASMASMAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLLD-PYIRIQGLDVPKLREHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQR-LPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNIILGRNNIYCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGAQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYYHRFMHSVGRVFSKGESPNSRRHSPHQAL-RKGVRRTSRKGKRLMTRGQLPR
Sequência de aminoácidos de IL-31 humano (SEQ ID NO:41) MASHSGPSTSVLFLFCLGGWLASHTLPVRLRPSDDVQKIVEELQSLSKMLKDVE-EEKGVLVSQNYTLPCLSPDAQPPNNIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDEIEHLDKLIFQDAPETNISVPTDTHECKRFILTISQQFSECMDLALKSLTSGAQQQATT
Sequência de aminoácidos de IL31RA humano (SEQ ID NO:43) MKLSPQPSCVNLMGMWTALWMLPSLCKFSLAALPAK PENISCVYYYRKN-LTCTWSPGKETSYTQYTVKRTYAFGEKHDNCTNSSTSEN RASC SFFLPRITIPDNYTIE-VEAENGDGVIKSHMTYWRLENIAKTEPPKIFRVKPVLGIKRM IQIEWIKPELAPVSS-DLKTYLRFRTVNSTS WMEVNFAKNRKDKNQTYNLTGLQPFTEYVIALRCAVKESKFWS-DWSQEKMGMTEEEAPCGLELWRVLKPAEADGRRPVLLWKKARGAPVLEKTLGYNI-WYYPESNTNLTEMNTTNQQLELHLGGESFWVSMISYNLSGKSPVATLRIPAIQEKS-FQCIEVMQACVAEDQLVVKWQSSALDVNTWMIEWFPDVSEPTTLSWESVSQATNW-TIQQDKLKPFWCYNISVYPMHLHKVGEPSIQAYAKEGVSEG PETKVENIGVKTVTIW-KEIPKSERKGIIICNYTIFYQAEGGKGFSKTVNSSILQYGLESLKRKTSYIVQVMASTSAGGTNGTSINFKTLFSVFEIILITS LIGGGLLILIITVAYGLKKPNKLTHLCWPTVPNPAESSI-ATWHGDDFKDKLNLKESDDSVNTEDRILKPCSTPSDKLVIDKLVNFNVLQEIFTDE-ARTGQENNLLGGEKNGTRILSSCPTSI
Sequência de aminoácidos de gp130 humano (SEQ ID NO:45) MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDPCGYISPESPVQLHSNFTAVCVLKEK-CMDYFHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNILTGFQLEQN-VYGITIISGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWDGGRETHLETNFTLKSEWATHKFA-DCKAKRDPTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEAENALGKVTS DHINFDPVYKVKPNNPHNLS-VINSEELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLK-PFT EYVFRICMKEDGKG YWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFWYKIDPSHT-QGYRTVQLVWKLTPPFEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNATKLTVNLTN-DRYLATLTVRNLLVGKSDAAVLTIPACDFQATHPVMDLKAFPKDNMLWWEWTTPRESVK-KYILEWCVLSKAPCITDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLTIVTPVYADGPGSPE-

SIKAYLKQAPPSKGPTVRTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETA-VNVDSSSHTEYTLSSLTSDEGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVV-PVCLAFLLTLLGVLFCKFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFSKD-QMYSDSNFTDVSVVEIVANDKKPFPEDLKSLSDFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSS-RPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEER-PEDLQLVDHVDDGGDGILPRQQYFKQNCSQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVR-LKQQISDHISQSCSGSQMKMFQEVAADAFGPGETGQVERFETVGMEAATDEG-MPKSYLPQTVRQGGYMPQ

[0058] Em particular, modalidades da presente invenção, proteínas de ligação de antígeno aqui descritas se ligam ao OSMR de humanos e macaco cynomolgus com alta afinidade, incluindo aqueles que se ligam com alta afinidade e bloqueiam a interação de IL-31 e/ou OSM de macaco cynomolgus para OSMR de macaco cynomolgus. Estas características permitem estudos de toxicologia informativos em primatas não humanos.

[0059] Uma sequência de proteína OSMR de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) é conhecida na técnica e é fornecida no GenBank N.º de Acesso XP_001083745. Uma sequência de aminoácidos de OSMR de macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) exemplar (SEQ ID NO:2) é fornecida na Tabela 2. A proteína é composta de vários domínios: Aminoácidos 1-27 correspondem à sequência sinal que pode de ser clivada durante o processamento da proteína em células de mamíferos; aminoácidos 28-737 correspondem ao domínio extracelular; e aminoácidos 738-757 correspondem ao domínio transmembrana. Em modalidades preferenciais, as proteínas de ligação de antígeno descritas aqui se ligam ao domínio extracelular de OSMR em impedem a interação de OSM e/ou IL-31 com OSMR.

[0060] Uma sequência de proteína OSM de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) é conhecida na técnica e é fornecida no GenBank N.º de Acesso NP_001181403. Uma sequência de aminoácidos de OSM de macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) exemplar (SEQ ID NO:40) é fornecida na Tabela 2. Aminoácidos 1-196 correspondem ao

OSM de cynomolgus maduro.

[0061] Uma sequência de proteína IL-31 de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) é conhecida na técnica e é fornecida no GenBank N.º de Acesso XP_001096743. Uma sequência de aminoácidos de IL-31 de macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) exemplar (SEQ ID NO:42) é fornecida na Tabela 2. Esta sequência representa IL-31 de macaco cynomolgus maduro.

[0062] Uma sequência de aminoácidos de IL31RA de macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) exemplar (SEQ ID NO: 44) é fornecida na Tabela 2. Aminoácidos 1-19 correspondem à sequência sinal; e aminoácidos 520-540 correspondem ao domínio transmembrana.

[0063] Uma sequência de proteína gp130 de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) é conhecida na técnica e é fornecida no GenBank N.º de Acesso NP_001252920. Uma sequência de aminoácidos de gp130 de macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) exemplar (SEQ ID NO: 46) é fornecida na Tabela 2. A proteína é composta de vários domínios: Aminoácidos 1-22 correspondem à sequência sinal; aminoácidos 23-619 correspondem ao domínio extracelular; aminoácidos 620-641 correspondem ao domínio transmembrana; e aminoácidos 642-918 correspondem ao domínio citoplasmático.

Tabela 2

<p>Sequência de aminoácidos de OSMR de macaco Cynomolgus (SEQ ID NO:2)</p> <p>MALFVVFTTFFLILLSSLRTYQSEVLAERLPLTPVSLKVSTNSIHQLHQLQWTWHL-PYHQELKMVFQIQISRIETSNVVVGNYSTPVKWNQVLHWSWESELPLECATHFVRINKS-VIDDASFPEPNFWNSNWSSWEEVSVQDYLGRGTLFVFPKDKLVEEGSNVTICYVSRNI-QNNVSCYLEGKQIHGEQLDPHVTAFLNLSVPFIRNRGTNIYCEASQGNVSKGIEGI-VLFVSKVLEEPKDFSCESQDFKTLHCTWDPGTDALGWSKQPSQSYTLFESFSGEKL-KLCTHKNCNWQITQDSQEMYNFTLIAENYLRKRSVNILFNLTHRVLQYLMNPFSVNFEN-VNATNAIMTWKVHSMRNNFTYLCQIELHGEGKMMQYDVSINVNGEYFLSELEPATEY-MARVRCADASHFWKWTEWSGQNFTTLEAAPSEAPDVWRSVNSEPGNHTVTLFWK-PLSKLHANGKILFYNVVVENLDKPSRSELRSIPAPANSTKLILDRCSYQICVTANNVGAS-PASIVVISADPENKEVEEERIAGTEGGFSLWKPQPGDVIGYVVWCDHPQDVLQWKN-VGPNTTSTVISTDAFRPGVRYDFRIYGLSTKRIACLEKKTGYSQELAPSDNPHVLVD-</p>

<p>MLTSHSFTLSWKDYSTESQPGFIQGYHVYLKSKARQCHPRFQKAVLSDGSEC-CRYKIDNPEEKALIVDNLKPESFYEFFVTPFTSAGEGPNATFTKVTTPDEHSSMLIRILL-PMVFCVLLIMIVCYLKSQWIKETCYPDIPDPYKSSILSLIKFKENPHLTIMNVSDCIP-DAIEVVSKPEGTKIQLLGTRKSLTETELTKPNLYLLPTEKNHSGPGPCICFENFTYN-QAASDAGSCGHVPVPPKAPPSMLGLMTSPENVLKALEKNYMNLSLGEVPAGETSLNY-VSQLASPMMSGDKDSLPTNPVEPPHCSEYKMQMAVPLRLALPPPTENSSLSSITLLD-PGEHYR</p>
<p>Sequência de aminoácidos de OSM de macaco Cynomolgus (SEQ ID NO:40) AAMGSCSKEYRMILLGQLQKQTDLMQDTSRLLDPYIRIQGLDIPKLREHCRESPGA-FPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGRILHRLADLEQHLPKAQDLERSGLNIE-DLEKLQMARPNVLGLRNNVYCMAQLLDNSDMTEPTKAGRGTQPQPTPTPTS-DVFQRKLEGCSFLRGYHRFMHSVGRVFSKGESPNSRRAAQQATT</p>
<p>Sequência de aminoácidos de IL-31 de macaco Cynomolgus (SEQ ID NO:42) TLPVHFLQPSDIQKIVEELQSLSKMILLKDVKEDKGVLVSQNYTLPCLTPDAQPPNIIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDEIIIHLDKLIFQDAPETNISVPTDHECKRFLTIS-QQFSECMDLALKSLTSGAQQAQQATT</p>
<p>Sequência de aminoácidos de IL31RA de macaco Cynomolgus (SEQ ID NO:44) MMWTWALWMFPLLCKFGGLAALPAKOPENISCVYYYRKNLCTWSPGKETSYT-QYTAKRKYAFGKKHDNCTTSSSTSENRASCSSFLPRITPDNYTIEVEAENGDGVIKSDM-TCWRLEDIAKTEPPEIFSVKPVLGKRMIRIEWIKPELAPVSSDLKYALRFRTVNSTSW-MEVNFAKNRKTDTNQTYNLMGLQAFTEYVALRCAVKESKFWSDWQSKEKMGMTAAA-PCGLELWRVLPTEVDGRRPVRLWKKARGAVPLEKTLGYNIWYFPENNNTNLTE-TVNTTNQQLEHLGGESYWVSMISYNLSGKSPVTTLRIPAIQEKSFRCEVMQACLAED-QLVVKWQSSALDVNTWMIEWFPDMSEHPTLSWESVSQATNWTIQQDKLKPFW-CYNISVYPMHLHKVGEPYSIQAYAKEGIPSKGPETKVENIGVKTVTITWKEIPKSERKGII-NYTIFYQAEGGTGFSKTVNSSILQYGLESLKRKTSYTVRVMASTSAGGINGTSINFKTLS-FSVFEIILITSLIGGGLLILIILTVAJGLKKPNKLTHLCWPSVPNPAESSIATWRGDDFKD-KLNLKESDDSVNTEDRILKPCSTPSDKLVIDKSVVNFGNVLQEMFTDEARTGQENNL-GGEKNENRILSSCPTSI</p>
<p>Sequência de aminoácidos de gp130 de macaco Cynomolgus (SEQ ID NO:46) MLTLQTWVVQALFIFLTTESIGELLDPCGYISPESPVQLHSNFTAVCVLKEK-CMDYFHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDISSLNIQLTCNILTGFQLEQN-VYGITIISGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWNRGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDPTSCTVDYSTVFVNIEVWVEAENALGKVTSVDHINFDPVYKVKPNNPHNLSVIN-SEELSSILKLTWTNPSIKSVIRLKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDASTRSSFTVQDLKPF-TEYVFRICCMKEDGKGYWSDWSEEANGITYEDRPSKAPSFWYKID-PSHAQGYRTVQLMWKTLPPFEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNDTKLTVNLTN-DRYVATLTARNLVGKSDAAVLTIPACDFQATHPVMDLKAFPKDNMLWVEWTPRESVK-KYILEWCVLSDKAPCIADWQQEDGTVHRTHLRGNLAESKCYLTIVTPVYADGPGSPE-</p>

SIKAYLKQAPPSKGPTVRTKKVGKNEAVLEWDQLPVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETAVN-
 VDSSHTEYTLSSLTSDELYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLA-
 FLLTLLGVLFNFKNRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFSSKDQMYSDGN-
 FTDVSVVEIEANDKKPFPEDLKSLDFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSRPSISSSDE-
 NESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVD-
 GSDDILPRQQYFKQNCSQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHIS-
 QSCGSGEMKMFQEVAADPFGPGTEGQVERFETIGMEAIDEGLPKSYLPQTWR-
 QGGYMPQ

Proteínas de Ligação de Antígeno OSMR

[0064] A presente invenção fornece proteínas de ligação de antígeno que se ligam especificamente a OSMR. Modalidades das proteínas de ligação de antígeno compreendem peptídeos e/ou polipeptídeos que se ligam especificamente a OSMR. Esses peptídeos ou polipeptídeos podem opcionalmente incluir uma ou mais modificações pós-traducionais. Modalidades de proteínas de ligação de antígeno incluem anticorpos e fragmentos dos mesmos, como variadamente definidos aqui, e que se ligam especificamente a OSMR. Estes incluem anticorpos que se ligam especificamente a OSMR humano, incluindo aqueles que inibem OSM e/ou IL-31 de ligação e/ou ativação de OSMR.

[0065] As proteínas de ligação de antígeno da invenção se ligam especificamente para OSMR. "Se liga especificamente" como usado aqui significa que a proteína de ligação de antígeno se liga preferencialmente a OSMR em relação a outras proteínas. Em algumas modalidades "se liga especificamente" significa que uma proteína de ligação de antígeno OSMR tem uma maior afinidade para OSMR do que para outras proteínas. Proteínas de ligação de antígeno OSMR que se ligam especificamente a OSMR podem ter uma afinidade de ligação para OSMR humano de menos de ou igual a 1×10^{-7} M, menos de ou igual a 2×10^{-7} M, menos de ou igual a 3×10^{-7} M, menos de ou igual a 4×10^{-7} M, menos de ou igual a 5×10^{-7} M, menos de ou igual a 6×10^{-7} M, menos de ou igual a 7×10^{-7} M, menos de ou igual a 8×10^{-7} M, me-

nos de ou igual a 9×10^{-7} M, menos de ou igual a 1×10^{-8} M, menos de ou igual a 2×10^{-8} M, menos de ou igual a 3×10^{-8} M, menos de ou igual a 4×10^{-8} M, menos de ou igual a 5×10^{-8} M, menos de ou igual a 6×10^{-8} M, menos de ou igual a 7×10^{-8} M, menos de ou igual a 8×10^{-8} M, menos de ou igual a 9×10^{-8} M, menos de ou igual a 1×10^{-9} M, menos de ou igual a 2×10^{-9} M, menos de ou igual a 3×10^{-9} M, menos de ou igual a 4×10^{-9} M, menos de ou igual a 5×10^{-9} M, menos de ou igual a 6×10^{-9} M, menos de ou igual a 7×10^{-9} M, menos de ou igual a 8×10^{-9} M, menos de ou igual a 9×10^{-9} M, menos de ou igual a 1×10^{-10} M, menos de ou igual a 2×10^{-10} M, menos de ou igual a 3×10^{-10} M, menos de ou igual a 4×10^{-10} M, menos de ou igual a 5×10^{-10} M, menos de ou igual a 6×10^{-10} M, menos de ou igual a 7×10^{-10} M, menos de ou igual a 8×10^{-10} M, menos de ou igual a 9×10^{-10} M, menos de ou igual a 1×10^{-11} M, menos de ou igual a 2×10^{-11} M, menos de ou igual a 3×10^{-11} M, menos de ou igual a 4×10^{-11} M, menos de ou igual a 5×10^{-11} M, menos de ou igual a 6×10^{-11} M, menos de ou igual a 7×10^{-11} M, menos de ou igual a 8×10^{-11} M, menos de ou igual a 9×10^{-11} M, menos de ou igual a 1×10^{-12} M, menos de ou igual a 2×10^{-12} M, menos de ou igual a 3×10^{-12} M, menos de ou igual a 4×10^{-12} M, menos de ou igual a 5×10^{-12} M, menos de ou igual a 6×10^{-12} M, menos de ou igual a 7×10^{-12} M, menos de ou igual a 8×10^{-12} M, ou menos de ou igual a 9×10^{-12} M.

[0066] Métodos para medir a afinidade de ligação de uma proteína de ligação de antígeno são bem conhecidos na técnica. Métodos de uso comum para determinação de afinidade incluem Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) (Morton and Myszka "Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors" *Methods in Enzymology* (1998) 295, 268-294), Interferometria de Biocamada, (Abdiche *et al* "Determining Kinetics and Affinities of Protein Interactions Using a Parallel Real-time Label-free Biosensor, the

Octet" *Analytical Biochemistry* (2008) 377, 209-217), Ensaio de Exclusão Cinética (KinExA) (Darling and Brault "Kinetic exclusion assay technology: characterization of molecular interactions" *Assay and Drug Dev Tech* (2004) 2, 647-657), calorimetria isotérmica (Pierce et al "Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions" *Methods* (1999) 19, 213-221) e ultracentrifugação analítica (Lebowitz et al "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review" *Protein Science* (2002), 11:2067–2079). Exemplo 5 fornece métodos exemplares para determinação de afinidade.

[0067] Entende-se que quando é feita referência para as várias modalidades dos anticorpos de ligação OSMR aqui, também inclui fragmentos de ligação OSMR dos mesmos. Um fragmento de ligação OSMR compreende qualquer um dos fragmentos ou domínios de anticorpo descritos aqui que mantêm a capacidade de se ligar especificamente para OSMR. O fragmento de ligação OSMR pode ser em qualquer uma das estruturas aqui descritas.

[0068] Em certas modalidades terapêuticas, uma proteína de ligação de antígeno OSMR inibe a ligação de OSM e/ou IL-31 para OSMR e/ou inibe uma ou mais atividades biológicas associadas com a ligação de OSM e/ou IL-31 para OSMR, por exemplo, sinalização mediada por OSM e/ou IL-31. Essas proteínas de ligação de antígeno são referidas como "neutralizantes". Em certas modalidades, a proteína de ligação de antígeno OSMR neutralizante se liga especificamente a OSMR e inibe a ligação de OSM e/ou IL-31 para OSMR em qualquer quantidade entre 10% a 100%, como pelo menos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ou mais. Por exemplo, proteínas de ligação de antígeno OSMR podem

ser testadas para capacidade de neutralização determinando a capacidade de a proteína de ligação de antígeno ligar com bloqueio OSM e/ou IL-31 para OSMR, ver, por exemplo, os ensaios de bloqueio de OSMR humano e OSMR de cynomolgus dos Exemplos 2 e 3, respectivamente. Alternativamente, proteínas de ligação de antígeno OSMR podem ser testadas para capacidade neutralizante em um ensaio que mede o efeito da presença de uma proteína de ligação de antígeno OSMR em um ensaio medindo a função biológica mediada por OSM e/ou IL 31. Por exemplo, a capacidade de OSM induzir uma resposta biológica, como a estimulação da atividade de ativador de plasminogênio em células endoteliais aórticas bovinas, regulação da expressão de IL-6 em células endoteliais humanas, e estimulação da captação de LDL e regulação para cima de receptores de LDL de superfície celular em células HepG2. Alternativamente, a capacidade de IL-31 para induzir a inflamação na pele.

[0069] Modalidades das proteínas de ligação de antígeno compreendem uma estrutura, como variavelmente definida aqui, com uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Modalidades ainda incluem proteínas de ligação de antígeno compreendendo uma estrutura com um ou mais domínios variáveis de anticorpos, leves ou pesados. Modalidades incluem anticorpos que compreendem um domínio variável de cadeia leve selecionado do grupo que consiste em domínio variável de cadeia leve (LCv) Ab1, Ab2 LCv e Ab3 LCv (SEQ ID NOS:27-29, respectivamente) e/ou um domínio variável de cadeia pesada selecionado do grupo que consiste em domínio variável de cadeia pesada (HCv) Ab1, Ab2 HCv e Ab3 HCv (SEQ ID NOS:9-11, respectivamente) e fragmentos, derivados, muteínas e variantes dos mesmos.

[0070] Um domínio variável de cadeia pesada variante exemplar de SEQ ID NO:9 contém um aminoácido diferente de asparagina (por

exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:9. A sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:53 é um exemplo de um domínio variável de cadeia pesada variante de SEQ ID NO:9.

[0071] Um domínio variável de cadeia pesada variante exemplar de SEQ ID NO:10 contém um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:10. A sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:54 é um exemplo de um domínio variável de cadeia pesada variante de SEQ ID NO:10.

[0072] A cadeia leve exemplar compreendendo Ab1 LCv é uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:24.

[0073] A cadeia leve exemplar compreendendo Ab2 LCv é uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:25.

[0074] A cadeia leve exemplar compreendendo Ab3 LCv é uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:26.

[0075] A cadeia pesada exemplar compreendendo Ab1 HCv é uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:6.

[0076] A cadeia pesada exemplar compreendendo uma variante de Ab1 HCv é uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:50.

[0077] A cadeia pesada exemplar compreendendo Ab2 HCv é uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:7.

[0078] A cadeia pesada exemplar compreendendo uma variante de Ab2 HCv é uma cadeia pesada compreendendo a sequência de

aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:51.

[0079] A cadeia pesada exemplar compreendendo Ab3 HCv é uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:8.

[0080] A cadeia pesada exemplar compreendendo uma variante de Ab3 HCv é uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:52.

[0081] Exemplos adicionais de estruturas que são previstas incluem, entre outras: fibronectina, neocarzinostatina CBM4-2, lipocalinas, receptor de células T, domínio de proteína A (proteína Z), Im9, proteínas TPR, domínios de dedo de zinco, pVIII polipeptídeo pancreático aviário, GCN4, domínio WW domínio de homologia Src 3, domínios PDZ, beta-lactamase TEM-1, tioredoxina, nuclease estafilocócica, domínios de dedo PHD, CL-2, BPTI, APPI, HPSTI, ecotina, LACI-D1, LDTI, MTI-II, toxinas de escorpião, peptídeo de defensina-A de inseto, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, citocromo b-562, domínios do receptor de Ldl, gama-cristalina, ubiquitina, transferrina, e ou domínios tipo lectina tipo C. Estruturas de não anticorpo e suas utilizações como medicamentos são revisadas em Gebauer and Skerra, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13:245-255 (2009) e Binz et al., *Nat. Biotech.*, 23(10):1257-68 (2005) que são incorporados aqui como referência em suas totalidades.

[0082] Aspectos da invenção incluem anticorpos compreendendo os seguintes domínios variáveis: Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:9), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:10), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:29/SEQ ID NO:11), e combinações dos mesmos, bem como fragmentos, derivados, muteínas e variantes dos mesmos.

[0083] Também são incluídos anticorpos compreendendo os seguintes domínios variáveis: SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:53; e SEQ ID

NO:28/SEQ ID NO:54.

[0084] Anticorpos exemplares da invenção incluem Ab1 (SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:6), Ab2 (SEQ ID NO:25/SEQ ID NO:7), e Ab3 (SEQ ID NO:26/SEQ ID NO:8).

[0085] Anticorpos exemplares adicionais incluem: SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:50; SEQ ID NO:25/SEQ ID NO:51; e SEQ ID NO:26/SEQ ID NO:52.

[0086] Normalmente, cada domínio variável de uma cadeia leve ou pesada de antícorpo compreende três CDRs. o domínio variável de cadeia pesada compreende um CDR1 de cadeia pesada (HCDR1), um CDR2 de cadeia pesada (HCDR2), e um CDR3 de cadeia pesada (HCDR3). o domínio variável de cadeia leve compreende um CDR1 de cadeia leve (LCDR1), um CDR2 de (LCDR2), e um CDR3 de cadeia leve (LCDR3). Em certas modalidades, uma proteína de ligação de antígeno compreende um ou mais CDRs contidos dentro dos domínios variáveis preferenciais aqui descritos.

[0087] Exemplos desses CDRs incluem, entre outros:

[0088] os CDRs de Ab1 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:30), LCDR2 (SEQ ID NO:33), e LCDR3 (SEQ ID NO:36);

[0089] os CDRs de Ab2 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:31), LCDR2 (SEQ ID NO:34), e LCDR3 (SEQ ID NO:37);

[0090] os CDRs de Ab3 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:32), LCDR2 (SEQ ID NO:35), e LCDR3 (SEQ ID NO:38);

[0091] os CDRs de Ab1 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:12), HCDR2 (SEQ ID NO:15), e HCDR3 (SEQ ID NO:18);

[0092] os CDRs de Ab2 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:13), HCDR2 (SEQ ID NO:16), e HCDR3 (SEQ ID NO:19); e

[0093] os CDRs de Ab3 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:14), HCDR2 (SEQ ID NO:17), e HCDR3 (SEQ ID NO:20).

[0094] Em algumas modalidades, a proteína de ligação de antí-

geno comprehende: A) um polipeptídeo, por exemplo, uma cadeia leve, que comprehende um LCDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:30, 31, e 32; um LCDR2 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:33, 34, e 35; e/ou um LCDR3 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:36, 37, e 38; e/ou B) um polipeptídeo, por exemplo, uma cadeia pesada, que comprehende um HCDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:12, 13, e 14; um HCDR2 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:15, 16, e 17; e/ou um HCDR3 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:18, 19, e 20.

[0095] Em outras modalidades, a proteína de ligação de antígeno comprehende A) uma sequência de aminoácidos de cadeia leve que comprehende um LCDR1, LCDR2 e LCDR3 de qualquer Ab1 LCv, Ab2 LCv, e Ab3 LCv e B) uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada que comprehende um HCDR1, HCDR2 e HCDR3 de qualquer de Ab1 HCv, Ab2 HCv, e Ab3 HCv.

[0096] Em certas modalidades, os CDRs incluem não mais de uma, não mais de duas, não mais de três, não mais de quatro, não mais de cinco, ou não mais de seis adições, deleções, ou substituições de aminoácidos de um CDR exemplar aqui estabelecido.

[0097] Aspectos da invenção incluem anticorpos comprehendendo um domínio variável de cadeia leve selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NOS:27, 28, e 29. Aspectos da invenção incluem anticorpos comprehendendo um domínio variável de cadeia pesada selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NOS:9, 10, e 11. Outros aspectos da invenção incluem anticorpos comprehendendo A) um domínio variável de cadeia leve selecionado do grupo que consiste em SEQ ID

NOS:27, 28, e 29, e B) um domínio variável de cadeia pesada selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NOS:9, 10, e 11.

[0098] Os anticorpos da invenção podem compreender qualquer região constante conhecida na técnica. A região constante da cadeia leve pode ser, por exemplo, uma região constante da cadeia leve tipo kappa ou lambda, por exemplo, uma região constante da cadeia leve tipo kappa ou lambda humana. A região constante da cadeia pesada pode ser, por exemplo, uma região constante da cadeia pesada tipo alfa, delta, épsilon, gama ou mu, por exemplo, uma região constante da cadeia pesada tipo alfa, delta, épsilon, gama ou mu humana. Em uma modalidade, a região constante da cadeia leve ou pesada é um fragmento, derivado, variante, ou mutéína de uma região constante de ocorrência natural.

[0099] Aspectos da invenção incluem anticorpos compreendendo uma região variável da cadeia leve selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:27, 28, e 29 tendo não mais de uma, não mais de duas, não mais de três, não mais de quatro, não mais de cinco, não mais de seis, não mais de sete, não mais de oito, não mais de nove ou não mais de dez adições, deleções, ou substituições de aminoácidos. Aspectos da invenção incluem anticorpos compreendendo uma região variável da cadeia pesada selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:9, 10, e 11 tendo não mais de uma, não mais de duas, não mais de três, não mais de quatro, não mais de cinco, não mais de seis, não mais de sete, não mais de oito, não mais de nove ou não mais de dez adições, deleções, ou substituições de aminoácidos. Outros aspectos da invenção incluem anticorpos compreendendo a) compreendendo uma região variável da cadeia leve selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:27, 28, e 29, tendo não mais de uma, não mais de duas, não mais de três, não mais de quatro, não mais de cinco, não mais de seis, não mais de sete, não mais de oito, não mais de nove, não mais de dez adições, deleções, ou substituições de aminoácidos. Outros aspectos da invenção incluem anticorpos compreendendo b) compreendendo uma região variável da cadeia pesada selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:9, 10, e 11, tendo não mais de uma, não mais de duas, não mais de três, não mais de quatro, não mais de cinco, não mais de seis, não mais de sete, não mais de oito, não mais de nove, não mais de dez adições, deleções, ou substituições de aminoácidos.

nove, ou não mais de dez adições, deleções, ou substituições de aminoácidos e B) uma região variável da cadeia pesada selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:9, 10, e 11, tendo não mais de uma, não mais de duas, não mais de três, não mais de quatro, não mais de cinco, não mais de seis, não mais de sete, não mais de oito, não mais de nove, ou não mais de dez adições, deleções, ou substituições de aminoácidos.

[00100] Em uma variação, a proteína de ligação de antígeno comprehende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:27, 28, e 29. Em outra variação, a proteína de ligação de antígeno comprehende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:9, 10, e 11. Ainda em outra modalidade, a proteína de ligação de antígeno comprehende A) uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pe-

lo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% idêntica à sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:27, 28, e 29, e B) uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% idêntica à sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS:9, 10, e 11.

[00101] Proteínas de ligação de antígeno OSMR compreendendo um domínio variável de cadeia pesada tendo o parentesco de sequência acima definido para SEQ ID NO:9 pode opcionalmente conter um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:9. Nessas modalidades, o domínio variável de cadeia pesada opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:53.

[00102] Proteínas de ligação de antígeno OSMR compreendendo um domínio variável de cadeia pesada tendo o parentesco de sequência acima definido para SEQ ID NO:10 pode opcionalmente conter um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:10. Nessas modalidades, o domínio variável de cadeia pesada opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:54.

[00103] Em certas modalidades, a proteína de ligação de antígeno compreende um CDR3 de cadeia leve e/ou cadeia pesada. Em algumas modalidades, a proteína de ligação de antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em se-

quências estabelecidas e SEQ ID NOS:36, 37, 38, 18, 19, e 20. Em certas modalidades, a sequência de aminoácidos inclui não mais de uma, não mais de duas, não mais de três, não mais de quatro, não mais de cinco, ou não mais de seis adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência exemplar estabelecida em SEQ ID NOS:36, 37, 38, 18, 19, e 20. Assim, modalidades da invenção incluem proteína de ligação de antígeno compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo de sequências estabelecidas em SEQ ID NOS:36, 37, 38, 18, 19, e 20.

[00104] Em certas modalidades, a proteína de ligação de antígeno compreende um CDR2 de cadeia leve e/ou cadeia pesada. Em algumas modalidades, a proteína de ligação de antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em sequências estabelecidas e SEQ ID NOS:33, 34, 35, 15, 16, e 17. Em certas modalidades, a sequência de aminoácidos inclui não mais de uma, não mais de duas, não mais de três, não mais de quatro, não mais de cinco, ou não mais de seis adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência exemplar estabelecida em SEQ ID NOS:33, 34, 35, 15, 16, e 17. Assim, modalidades da invenção incluem proteína de ligação de antígeno compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pe-

lo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo de sequências estabelecidas em SEQ ID NOS:33, 34, 35, 15, 16, e 17.

[00105] Em certas modalidades, a proteína de ligação de antígeno compreende um CDR1 de cadeia leve e/ou cadeia pesada. Em algumas modalidades, a proteína de ligação de antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em sequências estabelecidas e SEQ ID NOS:30, 31, 32, 12, 13, e 14. Em certas modalidades, a sequência de aminoácidos inclui não mais de uma, não mais de duas, não mais de três, não mais de quatro, não mais de cinco, ou não mais de seis adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência exemplar estabelecida em SEQ ID NOS:30, 31, 32, 12, 13, e 14. Assim, modalidades da invenção incluem proteína de ligação de antígeno compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo de sequências estabelecidas em SEQ ID NOS:30, 31, 32, 12, 13, e 14.

[00106] As proteínas de ligação de antígeno da invenção comprehendem as estruturas de anticorpos tradicionais, incluindo anticorpos humanos e monoclonais, anticorpos biespecíficos, diabodies, minibodies, anticorpos de domínio, anticorpos sintéticos (por vezes referidos como "miméticos de anticorpo"), anticorpos químéricos, fusões de anticorpo (por vezes referidos como "conjugados de anticorpo") e fragmentos de cada um, respectivamente. As CDRs acima descritas, inclu-

indo várias combinações das CDRs, podem ser enxertados em qualquer uma das seguintes estruturas.

[00107] Como usado aqui, o termo "anticorpos" refere-se às várias formas de proteínas monoméricas ou multiméricas compreendendo uma ou mais cadeias polipeptídicas que se ligam especificamente a um antígeno, como variadamente descrito aqui. Em certas modalidades, os anticorpos são produzidos por técnicas de DNA recombinante. Em modalidades adicionais, os anticorpos são produzidos por clivagem química ou enzimática de anticorpos de ocorrência natural. Em outro aspecto, o anticorpo é selecionado do grupo que consiste em: a) um anticorpo humano; b) um anticorpo humanizado; c) um anticorpo quimérico; d) um anticorpo monoclonal; e) um anticorpo policlonal; f) um anticorpo recombinante; g) um fragmento de ligação de antígeno; h) um anticorpo de cadeia única; i) um diabody; j) um triabody, k) um tetrabody, l) um fragmento Fab; m) um fragmento de $F(ab')_2$; n) um anticorpo IgA, o) um anticorpo IgD, p) um anticorpo IgE, q) um anticorpo IgG1, r) um anticorpo IgG2, s) um anticorpo IgG3, t) um anticorpo IgG4, u) um anticorpo IgM.

[00108] Uma região ou domínio variável comprehende pelo menos três CDRs de cadeia pesada ou leve incorporadas dentro de uma região de estrutura (designada regiões de estrutura FR1, FR2, FR3 e FR4). Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD. Unidades estruturais tradicionais de anticorpo geralmente comprehendem um tetrâmero. Cada tetrâmero é normalmente composto de dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par tendo uma cadeia "leve" e uma cadeia "pesada". A parte amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos principalmente responsáveis pelo reconhecimento de antígeno. A parte carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante principalmente

responsável pela função efetora. Cadeias leves humanas são classificadas como cadeias leves kappa e lambda. Cadeias pesadas são normalmente classificadas como cadeias mu, delta, gama, alfa ou épsilon, e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tem várias subclasses, incluindo, entre outras IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tem subclasses, incluindo, entre outras IgM1 e IgM2. Modalidades da invenção incluem todas essas classes e subclasses de anticorpos que incorporam um domínio variável ou CDR das proteínas de ligação de antígeno, como descrito aqui.

[00109] Alguns anticorpos de ocorrência natural, como aqueles encontrados em camelos e lhamas, são dímeros que consistem em duas cadeias pesadas e não incluem cadeias leves. A invenção inclui anticorpos diméricos de duas cadeias pesadas, ou fragmentos dos mesmos, que podem se ligar a OSMR.

[00110] As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves normalmente apresentam a mesma estrutura geral das regiões de estrutura (FR) relativamente conservadas unidas por três regiões hipervariáveis, ou seja, as regiões determinantes de complementaridade ou CDRs. As CDRs são responsáveis principalmente pela ligação e reconhecimento do antígeno. As CDRs das duas cadeias de cada par são alinhadas pelas regiões de estrutura, permitindo a ligação a um epítopo específico. De N-terminal a C-terminal, ambas as regiões de cadeia leve e pesada compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A atribuição de aminoácidos para cada domínio está em conformidade com as definições de Kabat.

[00111] CDRs constituem os principais pontos de contato da superfície para ligação de antígeno. A CDR3 ou a cadeia leve e, particularmente, CDR3 da cadeia pesada podem constituir os determinantes mais importantes na ligação de antígeno dentro das regiões variáveis de cadeia leve e pesada. Em alguns anticorpos, o CDR3 da cadeia

pesada parece constituir a principal área de contato entre o antígeno e o anticorpo. Esquemas de seleção in vitro em que CDR3 sozinho é variada podem ser usadas para variar as propriedades de ligação de um anticorpo ou determinar quais resíduos contribuem para a ligação de um antígeno.

[00112] Anticorpos de ocorrência natural incluem tipicamente uma sequência sinal, que direciona o anticorpo para a via celular para a secreção de proteínas e que normalmente não está presente no anticorpo maduro. Um polinucleotídeo que codifica um anticorpo da invenção pode codificar uma sequência sinal de ocorrência natural ou uma sequência sinal heteróloga como descrito abaixo.

[00113] Em uma modalidade, a proteína de ligação de antígeno é um anticorpo compreendendo de uma a seis CDRs exemplares aqui descritas. Os anticorpos da invenção podem ser de qualquer tipo incluindo anticorpo IgM, IgG (incluindo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgD, IgA ou IgE. Em uma modalidade específica, a proteína de ligação de antígeno é um anticorpo de tipo IgG, por exemplo, um anticorpo IgG1.

[00114] Em algumas modalidades, por exemplo, quando a proteína de ligação de antígeno é um anticorpo com cadeias pesadas e leves completas, os CDRs são todos da mesma espécie, por exemplo, humana. Alternativamente, por exemplo, em modalidades em que a proteína de ligação de antígeno contém menos de seis CDRs das sequências descritas acima, CDRs adicionais podem ser também de outras espécies ou podem ser CDRs humanos diferentes daqueles descritos nas sequências exemplares. Por exemplo, regiões HCDR3 e LCDR3 das sequências apropriadas identificadas aqui podem ser usadas com HCDR1, HCDR2, LCDR1 e LCDR2 sendo, opcionalmente, selecionadas a partir de espécies alternativas ou sequências de anticorpo humano diferentes, ou combinações das mesmas. Por exemplo, os CDRs da invenção podem substituir as regiões CDR de anticorpos

quiméricos ou humanizados comercialmente relevantes.

[00115] Modalidades específicas utilizam componentes de estrutura das proteínas de ligação de antígeno que são componentes humanos. Em algumas modalidades, no entanto, os componentes de estrutura podem ser uma mistura de diferentes espécies. Como tal, se a proteína de ligação de antígeno é um anticorpo, esse anticorpo pode ser um anticorpo químico e/ou anticorpo humanizado. Em geral, "anticorpos químicos" e "anticorpos humanizados" referem-se aos anticorpos que combinam as regiões de mais de uma espécie. Por exemplo, "anticorpos químicos" tradicionalmente compreendem regiões variáveis de um camundongo (ou rato, em alguns casos) e as regiões constantes de um humano.

[00116] "Anticorpos humanizado" geralmente se referem aos anticorpos não humanos que tiveram as regiões de estrutura de domínio variável trocadas por sequências encontradas em anticorpos humanos. Geralmente, em um anticorpo humanizado, o anticorpo inteiro, exceto um ou mais CDRs, é codificado por um polinucleotídeo de origem humana ou é idêntico a um anticorpo exceto dentro de um ou mais CDRs. Os CDRs, alguns ou todos dos quais são codificadas por ácidos nucleicos originários de um organismo não humano, são enxertados na estrutura de folha beta de uma região variável de anticorpo humano para criar um anticorpo cuja especificidade é determinada pelos CDRs enxertados. A criação desses anticorpos é descrita em, por exemplo, WO 92/11018, Jones 1986, *Nature* 321:522-525, Verhoeven et al., 1988, *Science* 239:1534-1536. Anticorpos humanizados também podem ser gerados usando camundongos com um sistema imune geneticamente projetado (Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654). Nas modalidades exemplares aqui descritas, os CDRs identificados são humanos, e, assim, anticorpos humanizados e químicos neste contexto incluem alguns CDRs não humanos; por exemplo, anti-

corpos humanizados podem ser gerados que compreendem as regiões HCDR3 e LCDR3, com uma ou mais das outras regiões CDR sendo de origem de espécies diferentes.

[00117] Em uma modalidade, uma proteína de ligação de antígeno OSMR é um anticorpo multiespecífico, e nomeadamente um anticorpo biespecífico, também por vezes referido como "diabodies." Estes são os anticorpos que se ligam a dois ou mais抗ígenos diferentes ou epitopos diferentes em um único antígeno. Em certas modalidades, um anticorpo biespecífico se liga a OSMR e um antígeno em uma célula efetora humana (por exemplo, célula T). Esses anticorpos são úteis em direcionar uma resposta de células efetoras contra células expressando OSMR, como uma célula de tumor expressando OSMR. Em modalidades preferenciais, o antígeno da célula efetora humana é CD3. Patente US 7.235.641. Métodos para preparar anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Um desses métodos envolve projetar a porção Fc das cadeias pesadas como para criar "knobs" e "holes" que facilitam a formação de heterodímero das cadeias pesadas quando coexpressas em uma célula. U.S. 7.695.963. Outro método também envolve projetar a porção Fc da cadeia pesada, mas usa direção eletrostática para encorajar a formação de heterodímero enquanto desencoraja a formação de homodímero de cadeias pesadas quando coexpressa em uma célula. WO 09/089.004, que é aqui incorporado como referência em sua totalidade.

[00118] Em uma modalidade, a proteína de ligação de antígeno OSMR é um minibody. Minibodies são proteínas tipo anticorpo minimizadas compreendendo um scFv unido a um domínio CH3 (Hu *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56:3055-3061).

[00119] Em uma modalidade, a proteína de ligação de antígeno OSMR é um anticorpo de domínio; ver, por exemplo Patente US 6.248.516. Anticorpos de domínio (dAbs) são domínios de ligação fun-

cionais dos anticorpos, correspondentes às regiões variáveis das cadeias pesados (VH) ou leves (VL) de anticorpos humanos. dAbs têm um peso molecular de aproximadamente 13 kDa, ou menos de um décimo do tamanho de um anticorpo completo. dAbs são bem expressos em uma variedade de hospedeiros, incluindo bactérias, leveduras, e sistemas de células de mamíferos. Além disso, dAbs são altamente estáveis e mantêm a atividade mesmo depois de serem submetidos a condições adversas, como a liofilização ou desnaturação por calor. Ver, por exemplo, Patente US 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; US de Série 2004/0110941; Patente Europeia 0368684; Patente US 6.696.245, WO04/058821, WO04/003019 e WO03/002609.

[00120] Em uma modalidade, a proteína de ligação de antígeno OSMR é um fragmento de anticorpo, que é um fragmento de qualquer um dos anticorpos descritos aqui que mantém a especificidade de ligação para OSMR. Em várias modalidades, as proteínas de ligação de anticorpos compreendem, entre outros, um F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv, ou fragmentos Fv de cadeia única. No mínimo, um anticorpo, como referido aqui, compreende um polipeptídeo que pode se ligar especificamente a OSMR compreendendo o todo ou parte de uma região variável da cadeia leve ou pesada, como um ou mais CDRs.

[00121] Outros exemplos de fragmentos de anticorpos de ligação OSMR incluem, entre outros, (i) o fragmento Fab que consiste em domínios VL, VH, CL e CH1, (ii) o fragmento Fd que consiste em domínios VH e CH1, (iii) o fragmento Fv que consiste em domínios VL e VH de um anticorpo único; (iv) o fragmento dAb (Ward *et al.*, 1989, *Nature* 341:544-546) que consiste em uma única variável, (v) regiões CDR isoladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados (vii) moléculas Fv de cadeia única (scFv), em que um domínio VH e um domínio VL são ligados por um

ligante de peptídeo que permite que os dois domínios se associem para formar um sítio de ligação de antígeno (Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426, Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85:5879-5883), (viii) dímeros Fv de cadeia única biespecíficos (PCT/US92/09965) e (ix) "diabodies" ou "triabodies", fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos por fusão de gene (Tomlinson *et. al.*, 2000, *Methods Enzymol.* 326:461-479; WO94/13804; Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448). Os fragmentos de anticorpos podem ser modificados. Por exemplo, as moléculas podem ser estabilizadas pela incorporação de pontes dissulfeto, ligando os domínios VH e VL (Reiter *et al.*, 1996, *Nature Biotech.* 14:1239-1245). Aspectos da invenção incluem modalidades em que os componentes não CDR desses fragmentos são sequências humanas.

[00122] Em uma modalidade, a proteína de ligação de antígeno OSMR é um anticorpo totalmente humano. Nesta modalidade, como referido acima, estruturas específicas compreendem pesadas e leves completas mostradas compreendendo as regiões CDR. Modalidades adicionais utilizam uma ou mais das CDRs da invenção, com as outras CDRs, regiões de estrutura, regiões J e D, regiões constantes, etc., provenientes de outros anticorpos humanos. Por exemplo, as CDRs da invenção podem substituir as CDRs de qualquer número de anticorpos humanos, particularmente anticorpos comercialmente relevantes.

[00123] Os anticorpos de cadeia única podem ser formados ligando fragmentos de domínio variável de cadeia leve (região Fv) através de uma ponte de aminoácido (ligante de peptídeo curto), resultando em uma cadeia de polipeptídeo única. Esses Fvs de cadeia única (scFvs) foram preparados fundindo DNA que codifica um ligante de peptídeo entre DNAs que codificam os dois polipeptídeos de domínio variável (V_L e V_H). Os polipeptídeos resultantes podem enovelar novamente sobre si mesmos para formar os monômeros de ligação de antígeno, ou podem formar multíme-

ros (por exemplo, dímeros, trímeros ou tetrâmeros), dependendo do comprimento de um ligante flexível entre os dois domínios variáveis (Kortt *et al.*, 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt *et al.*, 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Combinando diferentes polipeptídeos compreendendo V_L e V_H , pode-se formar scFvs multiméricos que se ligam a diferentes epítopos (Kriangkum *et al.*, 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Técnicas desenvolvidas para a produção de anticorpos de cadeia única incluem aquelas descritas em Patente US 4.946.778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879; Ward *et al.*, 1989, Nature 334:544, de Graaf *et al.*, 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87. Anticorpos de cadeia única derivados de anticorpos fornecidos aqui (incluindo, entre outros, scFvs compreendendo as combinações de domínio variável de Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:9), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:10), e Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:29/SEQ ID NO:11), e combinações dos mesmos são incluídas pela presente invenção. Anticorpos de cadeia única exemplares incluem as seguintes combinações de domínio variável: SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:53; e SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:54.

[00124] Em uma modalidade, uma proteína de ligação de antígeno OSMR é uma proteína de fusão de anticorpo (por vezes referida aqui como um "conjugado de anticorpo"). O parceiro conjugado pode ser proteico ou não proteico; este último geralmente sendo gerado usando grupos funcionais na proteína de ligação de antígeno e no parceiro conjugado. Em certas modalidades, o anticorpo é conjugado a uma substância química não proteica (droga) para formar um conjugado de droga de anticorpo.

[00125] Em uma modalidade, uma proteína de ligação de antígeno OSMR é um análogo de anticorpo, por vezes referido como "anticorpos sintéticos". Por exemplo, uma variedade de trabalhos utiliza estruturas de proteína alternativa ou estruturas artificiais com CDRs enxer-

tados. Essas estruturas incluem, entre outros, mutações introduzidas para estabilizar a estrutura tridimensional da proteína de ligação bem como estruturas totalmente sintéticas que consistem em, por exemplo, polímeros biocompatíveis. Ver, por exemplo, Korndorfer *et al.*, 2003, *Proteins: Structure, Function, e Bioinformatics*, Volume 53, Issue 1:121-129. Roque *et al.*, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Além disso, miméticos de anticorpo de peptídeo ("PAMs") podem ser usados, bem como o trabalho com base em miméticos de anticorpos utilizando componentes de fibronectina como estrutura.

[00126] "Proteína", como usado aqui, significa pelo menos dois aminoácidos covalentemente ligados, que incluem proteínas, polipeptídeos, oligopeptídeos e peptídeos. Em algumas modalidades, dois ou mais aminoácidos covalentemente ligados estão ligados por uma ligação peptídica. A proteína pode ser composta por aminoácidos de ocorrência natural e ligações peptídicas, por exemplo, quando a proteína é preparada de forma recombinante usando sistemas de expressão e células hospedeiras, conforme descrito abaixo. Alternativamente, a proteína pode incluir aminoácidos sintéticos (por exemplo, homofenilalanina, citrulina, ornitina, e norleucina), ou estruturas peptideomiméticas, ou seja, "análogos de peptídeo ou proteína", como peptoides (ver, Simon *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:9367, incorporados aqui como referência), que podem ser resistente às proteases ou outras condições fisiológicas e/ou de armazenamento. Esses aminoácidos sintéticos podem ser incorporados em particular quando a proteína de ligação do antígeno é sintetizada *in vitro* por métodos convencionais conhecidos na técnica. Além disso, qualquer combinação de resíduos/estruturas peptideomiméticas, sintéticas e de ocorrência natural pode ser usada. "Aminoácido" também inclui resíduos de iminoácido como prolina e hidroxiprolina. O aminoácido "grupo R" ou "cadeia lateral" pode ser na configuração (L) ou (S). Em uma modalidade específica-

ca, os aminoácidos estão na configuração (L) ou (S).

[00127] Em certos aspectos, a invenção fornece proteínas de ligação de antígeno recombinantes que se ligam a OSMR e, em algumas modalidades, um OSMR humano recombinante ou parte do mesmo. Neste contexto, uma "proteína recombinante" é uma proteína preparada usando técnicas recombinantes usando quaisquer técnicas e métodos conhecidos, ou seja, através da expressão de um ácido nucleico recombinante conforme descrito aqui. Métodos e técnicas para a produção de proteínas recombinantes são bem conhecidos. Modalidades da invenção incluem proteínas de ligação de antígeno recombinantes que se ligam a OSMR de tipo selvagem e respectivas do mesmo.

[00128] "Consistindo essencialmente em" significa que a sequência de aminoácidos pode variar em cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15% em relação à sequência SEQ ID NO: recitada e ainda conservar a atividade biológica, conforme descrito aqui.

[00129] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação de antígeno da invenção são proteínas isoladas ou proteínas substancialmente puras. Uma proteína "isolada" é desacompanhada por pelo menos algum do material com a qual é normalmente associada em seu estado natural, por exemplo, consistindo em pelo menos cerca de 5%, ou pelo menos cerca de 50% em peso da proteína total em uma determinada amostra. Entende-se que a proteína isolada pode constituir de 5 a 99,9% em peso do conteúdo total de proteínas dependendo das circunstâncias. Por exemplo, a proteína pode ser preparada a uma concentração significativamente maior com o uso de um promotor induzível ou promotor de alta expressão, de forma que a proteína é preparada em níveis de concentração maiores. A definição inclui a produção de uma proteína de ligação de antígeno em uma ampla variedade de organismos e/ou células hospedeiras que são conhecidas na técnica.

[00130] Para sequências de aminoácidos, a identidade e/ou semelhança de sequência é determinada usando técnicas padrão conhecidas, incluindo, entre outras, o algoritmo de identidade de sequência local de Smith e Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, o algoritmo de alinhamento de identidade de sequência de Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, a busca por método de semelhança de Pearson e Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, implementações computadorizadas desses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA em Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), o programa de sequência Best Fit descrito por Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395, preferencialmente usando as configurações padrão, ou por inspeção. Preferencialmente, a identidade percentual é calculada por FastDB com base nos seguintes parâmetros: penalidade de não combinação: 1; penalidade de lacuna 1; penalidade de tamanho de lacuna de 0,33; e penalidade de união de 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

[00131] Um exemplo de um algoritmo útil é PILEUP. PILEUP cria um alinhamento de sequência múltipla de um grupo de sequências relacionadas usando alinhamentos progressivos, emparelhados. Também pode traçar uma árvore mostrando as relações de agrupamentos usadas para criar o alinhamento. PILEUP usa uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; o método é semelhante ao descrito por Higgins e Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Parâmetros de PILEUP úteis incluindo um peso de lacuna padrão de 3,00, um peso de comprimento de lacuna padrão de 0,10, e lacunas de extremidade ponderadas.

[00132] Outro exemplo de um algoritmo útil é o algoritmo BLAST, descrito em: Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul *et al.*,

1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; e Karin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Um programa BLAST particularmente útil é o programa WU-BLAST-2 que foi obtido de Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. WU-BLAST-2 usa vários parâmetros de busca, a maioria dos quais é definida para os valores padrão de busca. Os parâmetros ajustáveis são definidos com os seguintes valores: abrangência de sobreposição=1, fração de sobreposição=0,125, limite de palavra (T)=II. Os parâmetros HSP S e HSP S2 são valores dinâmicos e são estabelecidos pelo próprio programa dependendo da composição da sequência particular e composição da base de dados particular contra a qual a sequência de interesse está sendo pesquisada; no entanto, os valores podem ser ajustados para aumentar a sensibilidade.

[00133] Um algoritmo útil adicional é gapped BLAST como relatado por Altschul *et al.*, 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. Gapped BLAST usa pontuações de substituição BLOSUM-62; parâmetro T limite definido como 9; o método de dois acertos para desencadear extensões sem lacuna, comprimentos de lacuna com carga de k um custo de $10+k$; X_u definido como 16, e X_g definido como 40 na fase de pesquisa de banco de dados e 67 na fase de saída dos algoritmos. Alinhamentos com lacuna são desencadeados por uma pontuação correspondente a cerca de 22 bits.

[00134] Em geral, a homologia de aminoácido, semelhança, ou identidade entre CDRs variantes individuais são pelo menos 80% para as sequências aqui mostradas, e mais geralmente com preferencialmente homologias crescentes ou identidades de pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e quase 100%. De maneira semelhante, "identidade de sequência de ácido nucleico percentual (%)" em relação à sequência de ácido nucleico das proteínas de ligação identificadas é definido como a porcentagem de resíduos de nucleotídeos em uma sequência de candidatos que são

idênticos com os resíduos de nucleotídeos na sequência de codificação da proteína de ligação de antígeno. Um método específico utiliza o módulo BLASTN do conjunto WU-BLAST-2 para os parâmetros padrão, com abrangência de sobreposição e fração de sobreposição definidas para 1 e 0,125, respectivamente.

[00135] Em geral, a homologia de sequência de ácido nucleico, semelhança, ou identidade entre as sequências de nucleotídeos que codificam CDRs variantes individuais e as sequências de nucleotídeos mostradas aqui são pelo menos 80%, e mais normalmente com preferencialmente homologias ou identidades crescentes de pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% e quase 100%.

[00136] Assim, uma "CDR variante" é uma com a homologia, semelhança, ou identidade especificada à CDR parente da invenção, e compartilha a função biológica, incluindo, entre outras, pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da especificidade e/ou atividade da CDR parente.

[00137] Enquanto o sítio ou região para a introdução de uma variação da sequência de aminoácidos é predeterminada, a mutação por si só não precisa ser predeterminada. Por exemplo, a fim de otimizar o desempenho de uma mutação em um determinado sítio, mutagênese aleatória pode ser realizada no códon ou região alvo e as variantes de CDR de proteína de ligação de antígeno triadas para a combinação ideal da atividade desejada. Técnicas para preparar mutações de substituição em sítios predeterminados no DNA tendo uma sequência conhecida são bem conhecidas, por exemplo, mutagênese de iniciador M13 e mutagênese de PCR. A triagem dos mutantes é feita utilizando ensaios de atividades de proteína de ligação de antígeno, como ligação OSMR.

[00138] Substituições de aminoácidos são normalmente de resí-

duos únicos; inserções geralmente serão na ordem de cerca de um (1) a cerca de vinte (20) resíduos de aminoácidos, embora inserções consideravelmente maiores possam ser toleradas. Deleções variam de cerca de um (1) a cerca de vinte (20) resíduos de aminoácidos, embora em alguns casos as deleções possam ser muito maiores.

[00139] Substituições, deleções, inserções ou qualquer combinação das mesmas pode ser usada para chegar a um derivado ou variante final. Geralmente, essas alterações são feitas em alguns aminoácidos para minimizar a alteração da molécula, particularmente a imunogenicidade e especificidade da proteína de ligação de antígeno. No entanto, maiores mudanças podem ser toleradas em determinadas circunstâncias. Substituições conservadoras são feitas geralmente em conformidade com a seguinte tabela mostrada como Tabela 3.

Tabela 3

Resíduo Original	Substituição Exemplares
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[00140] Mudanças substanciais em função ou identidade imunológica são feitas selecionando substituições que são menos conservadoras do que as mostradas na Tabela 3. Por exemplo, substituições podem ser feitas que afetam mais significativamente: a estrutura do polipeptídeo na área da alteração, por exemplo, a estrutura de alfa-hélice ou folha-beta; a carga ou a hidrofobicidade da molécula no sítio alvo; ou o volume da cadeia lateral. As substituições que em geral são esperadas para produzir as maiores mudanças nas propriedades do polipeptídeo são aquelas em que (a) um resíduo hidrofílico, por exemplo, seril ou treonil, é substituído com (ou por) um resíduo hidrofóbico, por exemplo, leucil, isoleucil, fenilalanil, valil ou alanil; (b) uma cisteína ou prolina é substituída com (ou por) qualquer outro resíduo; (c) um resíduo tendo uma cadeia lateral eletropositiva, por exemplo, lisil, arginil ou histidil, é substituído com (ou por) um resíduo eletronegativo, por exemplo, glutamil ou aspartil; ou (d) um resíduo tendo uma cadeia lateral volumosa, por exemplo, fenilalanina, é substituído com (ou por) um não tendo uma cadeia lateral, por exemplo, glicina.

[00141] As variantes normalmente apresentam a mesma atividade biológica qualitativa e irão provocar a mesma resposta imune do análogo de ocorrência natural, embora variantes também sejam selecionadas para modificar as características das proteínas de ligação de antígeno conforme necessário. Alternativamente, a variante pode ser projetada de forma que a atividade biológica da proteína de ligação de antígeno seja alterada. Por exemplo, sítios de glicosilação podem ser alterados ou removidos conforme discutido aqui.

[00142] Outros derivados de anticorpos OSMR dentro do escopo dessa invenção incluem conjugados covalentes ou agregativos de anticorpos OSMR, ou fragmentos dos mesmos, com outras proteínas ou polipeptídeos, como pela expressão de proteínas de fusão recombinantes compreendendo polipeptídeos heterólogos fundidos ao N-

terminal ou C-terminal de um polipeptídeo de anticorpo OSMR. Por exemplo, o peptídeo conjugado pode ser um peptídeo sinal (ou líder) heterólogo, por exemplo, o líder de fator-alfa de levedura, ou um peptídeo como um epítopo tag. Proteínas de fusão contendo anticorpos OSMR podem compreender peptídeos adicionados para facilitar a purificação ou identificação do anticorpo OSMR (por exemplo, poli-His). Um polipeptídeo de anticorpo OSMR também pode ser ligado ao peptídeo FLAG conforme descrito em Hopp *et al.*, *Bio/Technology* 6:1204, 1988, e Patente U.S. 5.011.912. O peptídeo FLAG é altamente抗原的 e fornece um epítopo reversivelmente ligado por um anticorpo monoclonal (mAb) específico, permitindo o ensaio rápido e fácil purificação da proteína recombinante expressa. Reagentes úteis para a preparação de proteínas de fusão em que o peptídeo FLAG é fundido a um determinado polipeptídeo são comercialmente disponíveis (Sigma, St. Louis, MO).

[00143] Em uma modalidade, um oligômero é preparado usando polipeptídeos derivados de imunoglobulinas. A preparação de proteínas de fusão compreendendo certos polipeptídeos heterólogos fundidos a várias frações de polipeptídeos derivados de anticorpo (incluindo o domínio Fc) foi descrita, por exemplo, por Ashkenazi *et al.*, 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn *et al.*, 1990, Nature 344:677; e Hollenbaugh *et al.*, 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", em *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11.

[00144] Uma modalidade da presente invenção é direcionada para um dímero compreendendo duas proteínas de fusão criadas fundindo um fragmento de ligação OSMR de um anticorpo OSMR para a região Fc de um anticorpo. O dímero pode ser preparado, por exemplo, inserindo uma fusão de gene que codifica a proteína de fusão em um vetor de expressão adequado, expressando a fusão de gene em células

hospedeiras transformadas com o vetor de expressão recombinante, e permitindo que a proteína de fusão expressa monte moléculas de anticorpo muito parecidas, após o que ligações intercadeias de dissulfeto se formam entre as frações de Fc para produzir o dímero.

[00145] O termo "polipeptídeo de Fc", como utilizado aqui inclui formas nativas e muteína de polipeptídeos derivados da região Fc de um anticorpo. Formas truncadas desses polipeptídeos contendo a região de dobradiça que promove a dimerização também estão incluídas. Proteínas de fusão compreendendo frações de Fc (e oligômeros formados dessas) oferecem a vantagem de fácil purificação por cromatografia de afinidade com colunas de proteína A ou proteína G.

[00146] Um polipeptídeo Fc adequado, descrito no pedido PCT WO 93/10151 (aqui incorporado como referência), é um polipeptídeo de cadeia única se estendendo da região de dobradiça N-terminal para o C-terminal nativo da região Fc de um anticorpo IgG humano. Outro polipeptídeo Fc útil é a muteína Fc descrita na Patente US 5.457.035 e em Baum *et al.*, 1994, *EMBO J.* 13:3992-4001. A sequência de aminoácidos desta muteína é idêntica à da sequência Fc nativa apresentada em WO 93/10151, exceto que o aminoácido 19 foi alterado de Leu para Ala, aminoácido 20 foi alterado de Leu para Glu, e aminoácido 22 foi alterado de Gly para Ala. A muteína apresenta afinidade reduzida para receptores Fc.

[00147] Em outras modalidades, a parte variável das cadeias pesadas e/ou leves de um anticorpo OSMR pode ser substituída pela parte variável de uma cadeia pesada e/ou leve de anticorpo.

[00148] Outro método para preparar de derivados de anticorpo OSMR oligomérico envolve o uso de um zíper de leucina. Domínios de zíper de leucina são peptídeos que promovem oligomerização das proteínas em que são encontrados. Zíperes de leucina foram originalmente identificados em várias proteínas de ligação de DNA (Landschulz *et*

al., 240, *Science* 1759-64:1988), e desde então foram encontrados em uma variedade de proteínas diferentes. Entre os zíperes de leucina conhecidos estão peptídeos de ocorrência natural e derivados dos mesmos que dimerizam ou trimerizam. Exemplos de domínios de zíper de leucina adequados para produzir proteínas oligoméricas solúveis são descritos no pedido PCT WO 94/10308, e o zíper de leucina derivado de proteína de surfactante pulmonar D (SPD) descrito em Hoppe et al., 1994, *FEBS Letters* 344:191, aqui incorporado como referência. O uso de um zíper de leucina modificado que permite a trimerização estável de uma proteína heteróloga fundida ao mesmo é descrito em Fanslow et al., 1994, *Semin. Immunol.* 6:267-78. Em uma abordagem, proteínas de fusão recombinantes compreendendo um fragmento de anticorpo OSMR ou derivado fundido a um peptídeo de zíper de leucina são expressas em células hospedeiras adequadas, e os fragmentos ou derivados de anticorpos OSMR oligoméricos solúveis que se formam são recuperados do sobrenadante da cultura.

[00149] Modificações covalentes de proteínas de ligação de antígeno estão incluídas no escopo dessa invenção, e são geralmente, mas nem sempre, feitas de forma pós-tradicional. Por exemplo, vários tipos de modificações covalentes da proteína de ligação de antígeno são introduzidos na molécula reagindo resíduos de aminoácidos específicos da proteína de ligação do antígeno com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais selecionadas ou os resíduos N- ou C-terminal.

[00150] Os resíduos de cisteinil são mais comumente reagidos com α -haloacetatos (e aminas correspondentes), como ácido cloroacético ou cloroacetamida, para gerar derivados carboximetil ou carboxiamidometil. Os resíduos de cisteinil também são derivatizados pela reação com bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo-beta-(5-imidozoil)propiônico, fosfato de cloroacetil, N-alquilmaleimidas, dissulfeto de 3-nitro-2-piridil, dissulfeto de

2-piridil metil, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol ou cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

[00151] Resíduos de histidil são derivatizados pela reação com dietilpirocarbonato em pH 5,5-7,0, porque este agente é relativamente específico para a cadeia lateral de histidil. Brometo de para-bromofenacil também é útil; a reação é preferencialmente realizada em 0,1 M cacodilato de sódio em pH 6,0.

[00152] Lisinil e resíduos amino terminais são reagidos com succínico ou outros anidridos de ácido carboxílico. A derivatização com esses agentes tem o efeito de reverter a carga dos resíduos de lisinil. Outros reagentes adequados para derivatização de resíduos contendo alfa-amino incluem imidoésteres como picolinimidato de metil; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidreto; ácido trinitrobenzenossulfônico; O-metilisoureia; 2,4-pantanodiona; e reação catalisada por transaminase com glioxilato.

[00153] Resíduos de arginil são modificados pela reação com um ou vários reagentes convencionais, entre eles fenilgioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, e ninidrina. A derivatização de resíduos de arginina exige que a reação seja realizada em condições alcalinas devido ao alto pK_a do grupo funcional guanidina. Além disso, estes reagentes podem reagir com os grupos de lisina bem como o grupo amino arginina épsilon.

[00154] A modificação específica de resíduos de tirosil pode ser feita, com interesse particular na introdução de marcadores espectrais em resíduos de tirosil pela reação com compostos de diazônio aromáticos ou tetranitrometano. Mais comumente, N-acetilimidizol e tetranitrometano são usados para formar espécie de O-acetil tirosil e derivados 3-nitro, respectivamente. Resíduos de tirosil são iodados usando ^{125}I ou ^{131}I para preparar as proteínas marcadas para uso em radioimunoensaio, o método de clorammina T descrito acima sendo adequado.

[00155] Grupos laterais de carboxila (aspartil ou glutamil) são seleтивamente modificados pela reação com carbodiimidas ($R'-N=C=N-R'$), onde R e R' são grupos alquil opcionalmente diferentes, como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida ou 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Além disso, resíduos de aspartil e glutamil são convertidos em resíduos asparaginil e glutaminil por reação com íons amônio.

[00156] Derivatização com agentes bifuncionais é útil para reticulação de proteínas de ligação de antígeno para uma matriz de suporte insolúvel em água ou superfície para uso em uma variedade de métodos. Agentes de reticulação comumente usados incluem, por exemplo, 1,1-bis (diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-axidossalícílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres de disuccinimidil como 3,3'-ditriobis(succinimidilpropionato), e maleimidas bifuncionais como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes de derivatização como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato geram intermediários fotoativáveis que são capazes de formar reticulações na presença de luz. Alternativamente, matrizes insolúveis em água reativas como carboidratos ativados com brometo de cianogênio e os substratos reativos descrito em Pat. U.S. Nos. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; e 4.330.440 são empregados para a imobilização de proteína.

[00157] Resíduos de glutaminil e asparaginil são frequentemente desamidados para os resíduos de glutamil e aspartil correspondentes, respectivamente. Alternativamente, estes resíduos são desamidados sob condições levemente ácidas. As formas destes resíduos estão no escopo dessa invenção.

[00158] Outras modificações incluem a hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxil de resíduos de seril ou treonol, metilação dos grupos α -amino das cadeias laterais da lisina, argini-

na, e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), acetilação da amina N-terminal, e amidação de qualquer grupo carboxil C-terminal.

[00159] Outro tipo de modificação covalente da proteína de ligação de antígeno incluído no escopo dessa invenção compreende alterar o padrão de glicosilação das proteínas. Como é conhecido na técnica, padrões de glicosilação podem depender tanto da sequência da proteína (por exemplo, a presença ou ausência de resíduos de aminoácidos de glicosilação particular, discutido abaixo), quanto da célula hospedeira ou organismo em que a proteína é produzida. Sistemas de expressão particulares são discutidos abaixo.

[00160] A glicosilação de polipeptídeos é tipicamente N-ligada ou O-ligada. N-ligada geralmente se refere à ligação da fração de carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências de tri-peptídeo asparagina-X-serina e asparagina -X treonina, em que X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para ligação enzimática da fração carboidrato para a cadeia lateral da asparagina. Assim, a presença de qualquer uma dessas sequências de tri-peptídeo em um polipeptídeo cria um potencial sítio de glicosilação. Glicosilação O-ligada se refere à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose, ou xilose para um ácido hidroxiamino, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina também possam ser usados.

[00161] A adição de sítios de glicosilação para a proteína de ligação de antígeno é realizada convenientemente alterando a sequência de aminoácidos de forma que contenha uma ou mais das sequências de tri-peptídeo acima descritas (para sítios de glicosilação N-ligados). A alteração também pode ser feita pela adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina para a sequência de parti-

da (para sítios de ligação O-ligados). Para facilitar, a sequência de aminoácidos da proteína de ligação de antígeno é preferencialmente alterada por mudanças no nível do DNA, particularmente por mutação do DNA que codifica o polipeptídeo alvo em bases pré-selecionadas de forma que os códons são gerados que se traduzirão em aminoácidos desejados.

[00162] Outros meios para aumentar o número de frações de carboidrato na proteína de ligação de antígeno é por acoplamento químico ou enzimático de glicosídeos à proteína. Estes procedimentos são vantajosos em que não exigem a produção da proteína em uma célula hospedeira que possui capacidade de glicosilação para glicosilação N- e O-ligada. Dependendo do modo de acoplamento usado, os açúcares podem ser ligados à (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxil livres, (c) grupos sulfidril livres, como aqueles na cisteína, (d) grupos hidroxil livres, como aqueles na serina, treonina ou hidroxiprolina, (e) resíduos aromáticos como aqueles na fenilalanina, tirosina ou triptofano, ou (f) o grupo amida da glutamina. Esses métodos são descritos em WO 87/05330 publicado em 11 de setembro de 1987 e em Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

[00163] A remoção de frações de carboidrato presentes na proteína de ligação de antígeno inicial pode ser realizada quimicamente ou enzimaticamente. A desglicosilação química exige exposição da proteína para o composto ácido trifluorometanossulfônio, ou um composto equivalente. Este tratamento resulta na clivagem da maioria ou de todos os açúcares, exceto o açúcar ligante (N-acetylglucosamina ou N-acetylgalactosamina), deixando o polipeptídeo intacto. A desglicosilação química é descrita por Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 e por Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. A clivagem enzimática de frações de carboidrato em polipeptídeos pode ser conseguida pelo uso de uma variedade de endo e exo-glicosidases

conforme descrito por Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350. A glicosilação em sítios de glicosilação potenciais pode ser prevenida pelo uso do composto tunicamicina, conforme descrito por Duskin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105. Tunicamicina bloqueia a formação de ligações de proteína-N-glicosídeo.

[00164] Outro tipo de modificação covalente da proteína de ligação de antígeno comprehende a ligação da proteína de ligação de antígeno para diversos polímeros não proteicos, incluindo, entre outros, diversos polióis como o polietileno glicol, polipropileno glicol ou polioxialquilenos, da forma estabelecida em Pat. U.S. Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ou 4.179.337. Além disso, como é conhecido na técnica, substituições de aminoácido podem ser feitas em várias posições dentro da proteína de ligação de antígeno para facilitar a adição de polímeros como PEG.

[00165] Em algumas modalidades, a modificação covalente das proteínas de ligação de antígeno da invenção comprehende a adição de um ou mais marcadores.

[00166] O termo "grupo de marcação" significa qualquer marcador detectável. Exemplos de grupos de marcação adequados incluem, entre outros, os seguintes: radioisótopos ou radionucléidos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), grupos fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantanídeos), grupos enzimáticos (por exemplo, peroxidase de rábano, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), grupos quimioluminescentes, grupos biotinil, ou epítocos de polipeptídeo predeterminados reconhecidos por um segundo repórter (por exemplo, sequências de par de zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, tags de epítoco). Em algumas modalidades, o grupo de marcação é acoplado à proteína de ligação de antígeno através de braços de espaçador de vários comprimentos para reduzir o potencial impedi-

mento estérico. Vários métodos para a marcação de proteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados na realização da presente invenção.

[00167] Em geral, marcadores se enquadram em uma variedade de classes, dependendo do ensaio em que estão sendo detectados: a) marcadores isotópicos, que podem ser de isótopos radioativos ou pesados; b) marcadores magnéticos (por exemplo, partículas magnéticas); c) frações ativas redox; d) corantes ópticos; grupos enzimáticos (por exemplo, peroxidase de rabano, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina); e) grupos biotinilados; e f) epítopenos de polipeptídeo pré-determinados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências de par de zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, tags de epítopo, etc.). Em algumas modalidades, o grupo de marcação é acoplado à proteína de ligação de antígeno através de braços de espaçador de vários comprimentos para reduzir o potencial impedimento estérico. Vários métodos para a marcação de proteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados na realização da presente invenção.

[00168] Marcadores específicos incluem corantes ópticos, incluindo, entre outros, cromóforos, fósforos e fluoróforos, com o último sendo específico em muitos casos. Fluoróforos podem ser flúor de "pequenas moléculas" ou flúor proteico.

[00169] "Marcador fluorescente" significa qualquer molécula que pode ser detectada através de suas propriedades fluorescentes inerentes. Marcadores fluorescentes adequados incluem, entre outros, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, Malacite verde, estilbenos, amarelo de Lúcifer, Cascata BlueJ, Vermelho de Texas, IAEDANS, EDANS, FL BODIPY, LC Vermelho 640, Cy 5 Cy 5.5, LC Vermelho 705, verde de Oregon, os corantes de Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430,

Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascata Azul, Cascata Amarelo e R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rodamina e Vermelho de Texas (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Corantes ópticos adequados, incluindo fluoróforos, são descritos em Molecular Probes Handbook por Richard P. Haugland, expressamente incorporado como referência.

[00170] Marcadores fluorescentes proteicos adequados também incluem, entre outros, proteína verde fluorescente, incluindo espécies Renilla, Ptilosarcus ou Aequorea de GFP (Chalfie *et al.*, 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Labs., Inc., Número de Adesão Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc., 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal Quebec, Canada H3H; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim *et al.*, 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), proteína fluorescente amarela potencializada (EYFP, Clontech Labs., Inc.), luciferase (Ichiki *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β galactosidase (Nolan *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) e Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, Patente U.S. Nos. 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558). Todas as referências acima citadas são expressamente incorporadas aqui como referência.

[00171] As proteínas de ligação de antígeno exemplares aqui descritas têm propriedades baseadas no epítopo distinto em OSMR ligado pela proteína de ligação de antígeno. O termo "epítopo" significa os aminoácidos de uma molécula alvo que são contatados por uma proteína de ligação de antígeno, por exemplo, um anticorpo, quando a proteína de ligação de antígeno é ligada à molécula alvo. Um epítopo pode ser contíguo ou não contíguo (por exemplo, (i) em um polipeptí-

deo de cadeia única, resíduos de aminoácidos que não são contíguos um ao outro na sequência de polipeptídeo, mas que dentro do contexto da molécula alvo estão ligados pela proteína de ligação de antígeno, ou (ii) em um receptor multimérico compreendendo dois ou mais componentes individuais, por exemplo, OSMR e gp130 ou a OSMR e receptor A de IL-31, resíduos de aminoácidos estão presentes em um ou mais dos componentes individuais, mas ainda estão ligados pela proteína de ligação de antígeno. Determinantes de epítopo podem incluir grupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, grupos fosforil ou sulfonil, e podem ter características estruturais em três dimensões específicas, e/ou características de carga específicas. Geralmente, as proteínas de ligação de antígeno para uma molécula alvo particular preferencialmente reconhecerão um epítopo na molécula alvo em uma mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas.

[00172] Métodos para caracterizar a ligação de epítopo por uma proteína de ligação de antígeno são bem conhecidos na técnica, incluindo, entre outros, classificação (competição cruzada) (Miller *et al* "Epitope binning of murine monoclonal antibodies by a multiplexed pairing assay" *J Immunol Methods* (2011) 365, 118-25), mapeamento de peptídeo (por exemplo, PEPSPOTTM) (Albert *et al* "The B-cell Epitope of the Monoclonal Anti-Factor VIII Antibody ESH8 Characterized by Peptide Array Analysis" 2008 *Thromb. Haemost.* 99, 634-7), métodos de mutagênese como quimeras (Song *et al* "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" *J. Virol.* (2010) 84, 6935-6942) , varredura de alanina (Cunningham and Wells "High-resolution epitope mapping of HGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis" *Science* (1989) 244, 1081–1085), varredura de arginina (Lim *et al* "A diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythro-

poietin receptor" *Biochemistry* (2010) 49, 3797–3804), HD métodos de troca (Coates *et al* "Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2009) 23 639– 647), métodos de saturação cruzada de NMR (Morgan *et al* "Precise epitope mapping of malaria parasite inhibitory antibodies by TROSY NMR cross-saturation" *Biochemistry* (2005) 44, 518-23), e cristalografia (Gerhardt *et al* "Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody" *J. Mol. Biol* (2009) 394, 905-21). Os métodos variam em nível de detalhe que fornecem para os aminoácidos compreendendo o epítopo. O Exemplo 4 fornece um método exemplar de classificação de epítopo.

[00173] Proteínas de ligação de antígeno da presente invenção incluem aquelas que têm um epítopo sobreposto com uma proteína de ligação de antígeno exemplar descrita aqui, por exemplo, Ab1, Ab2 ou Ab3. Em certas modalidades, a proteína de ligação de antígeno tem um epítopo idêntico às proteínas de ligação de antígeno exemplares. Em outras modalidades, a proteína de ligação de antígeno se liga a apenas um subconjunto dos mesmos aminoácidos da proteína de ligação de antígeno exemplar.

[00174] Em certas modalidades, a proteína de ligação de antígeno OSMR tem um epítopo idêntico ou de sobreposição como Ab1, Ab2, ou Ab3, e compreende a) um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, ou SEQ ID NO:29; b) um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, ou SEQ ID NO:11; ou c) o domínio variável de cadeia leve de a) e o domínio variável de cadeia pesada de b).

[00175] Em certas modalidades, a proteína de ligação de antígeno OSMR tem um epítopo idêntico ou de sobreposição como Ab1, Ab2, ou Ab3, e compreende um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:27 e um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:9; aquelas compreendendo um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:28 e um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:10; e aquelas compreendendo um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:29 e um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou é idêntico à sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:11.

[00176] Em certas modalidades, a proteína de ligação de antígeno OSMR tem um epítopo idêntico ou de sobreposição como Ab1, Ab2, ou Ab3, e compreende a) um domínio variável de cadeia leve tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, ou SEQ ID NO:29; b) um domínio variável de cadeia pesada tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, ou SEQ ID NO:11; ou c) o domínio variável de cadeia leve de a) e o domínio variável de cadeia pesada de b).

[00177] Em certas modalidades, a proteína de ligação de antígeno OSMR tem um epítopo idêntico ou de sobreposição como Ab1, Ab2,

ou Ab3, e compreende um domínio variável de cadeia leve tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:27 e um domínio variável de cadeia pesada tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:9; aquelas compreendendo um domínio variável de cadeia leve tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:28 e um domínio variável de cadeia pesada tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:10; e aquelas compreendendo um domínio variável de cadeia leve tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:29 e um domínio variável de cadeia pesada tendo não mais que dez ou não mais que cinco adições, deleções ou substituições de aminoácidos da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:11.

[00178] Um domínio variável de cadeia pesada variante exemplar de SEQ ID NO:9 contém um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:9. A sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:53 é um exemplo de um domínio variável de cadeia pesada variante de SEQ ID NO:9.

[00179] Um domínio variável de cadeia pesada variante exemplar de SEQ ID NO:10 contém um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:10. A sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:54 é um exemplo de um domínio variável de cadeia pesada variante

te de SEQ ID NO:10.

[00180] Em certas modalidades, a proteína de ligação de antígeno OSMR tem um epítopo idêntico ou de sobreposição como Ab1, Ab2, ou Ab3, e compreende um domínio variável de cadeia leve comprendendo a) um LCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:30; um LCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:33; e um LCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:36; b) um LCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:31; um LCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:34; e um LCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:37; ou c) um LCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:32; um LCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:35; e um LCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência LCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:38; e um domínio variável de cadeia pesada comprendendo d) um HCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:12; um HCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:15; e um HCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência

HCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:18; e) um HCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:13; um HCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:16; e um HCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:19; ou f) um HCDR1 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR1 estabelecida em SEQ ID NO:14; um HCDR2 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR2 estabelecida em SEQ ID NO:17; e um HCDR3 tendo não mais que três adições, deleções, ou substituições de aminoácidos da sequência HCDR3 estabelecida em SEQ ID NO:20.

[00181] Proteínas de ligação de antígeno OSMR preferenciais descritas imediatamente acima incluem aquelas compreendendo o domínio variável de cadeia leve de a) e o domínio variável de cadeia pesada de d); aquelas compreendendo o domínio variável de cadeia leve de b) e o domínio variável de cadeia pesada de e); e aquelas compreendendo o domínio variável de cadeia leve de c) e o domínio variável de cadeia pesada de f).

[00182] Proteínas de ligação de antígeno OSMR compreendendo o domínio variável de cadeia leve de a) e o domínio variável de cadeia pesada de d) pode opcionalmente conter um domínio variável de cadeia pesada que compreende um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:9. Nessas modalidades, o domínio variável de cadeia pesada opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:53.

[00183] Proteínas de ligação de antígeno OSMR compreendendo

o domínio variável de cadeia leve de b) e o domínio variável de cadeia pesada de e) pode opcionalmente conter um domínio variável de cadeia pesada que compreende um aminoácido diferente de asparagina (por exemplo, ácido aspártico) na posição correspondente à posição 73 em SEQ ID NO:10. Nessas modalidades, o domínio variável de cadeia pesada opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:54.

[00184] Proteínas de ligação de antígeno que têm um epítopo idêntico ou epítopo de sobreposição vezes competirá de forma cruzada por ligação com o antígeno. Assim, em certas modalidades, uma proteína de ligação de antígeno da invenção compete de forma cruzada com Ab1 e Ab2, ou Ab3. "Competir de forma cruzada" ou "competição cruzada" significa que as proteínas de ligação de antígeno competem para o mesmo epítopo ou sítio de ligação a um alvo. Essa competição pode ser determinada por um ensaio em que a proteína de ligação de antígeno de referência (por exemplo, anticorpo ou parte de ligação de antígeno do mesmo) impede ou inibe a ligação específica de uma proteína de ligação de antígeno de teste, e vice-versa. Vários tipos de ensaios de ligação competitivos podem ser usados para determinar se uma molécula de teste compete com uma molécula de referência para ligação. Exemplos de ensaios que podem ser empregados incluem radioimunoensaio direto ou indireto de fase sólida (RIA), imunoensaio de enzima direto ou indireto de fase sólida (EIA), ensaio de competição de sanduíche (ver, por exemplo, Stahli et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253), solid phase direct biotin-avidin EIA (ver, por exemplo, Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137:3614-9), ensaio marcado direto de fase sólida, ensaio de sanduíche direto de fase sólida, Luminex (Jia et al. "A novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies" *J. Immunological Methods* (2004) 288, 91–98) e ressonâ-

cia de plasmon de superfície (Song *et al.* "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" *J. Virol.* (2010) 84, 6935-42). Um método exemplar para determinar competição cruzada é descrito no Exemplo 5. Geralmente, quando uma proteína de ligação de antígeno que compete está presente em excesso, vai inibir a ligação de uma proteína de ligação de antígeno de referência a um antígeno comum em pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75%. Em alguns casos, a ligação é inibida em pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais.

[00185] Polinucleotídeos que Codificam Proteínas de Ligação de Antígeno OSMR

[00186] São incluídos na invenção ácidos nucleicos ou ácidos nucleicos isolados que codificam proteínas de ligação de antígeno OSMR, incluindo anticorpos, como definido aqui. Ácidos nucleicos preferenciais incluem aqueles que codificam as cadeias leves e pesadas exemplares aqui descritas.

[00187] Um ácido nucleico exemplar que codifica Ab1 LC é um ácido nucleico compreendendo a sequência estabelecida em SEQ ID NO:21.

[00188] Um ácido nucleico exemplar que codifica Ab2 LC é um ácido nucleico compreendendo a sequência estabelecida em SEQ ID NO:22.

[00189] Um ácido nucleico exemplar que codifica Ab3 LC é um ácido nucleico compreendendo a sequência estabelecida em SEQ ID NO:23.

[00190] Um ácido nucleico exemplar que codifica Ab1 HC é um ácido nucleico compreendendo a sequência estabelecida em SEQ ID NO:3.

[00191] Um ácido nucleico exemplar que codifica Ab2 HC é um

ácido nucleico compreendendo a sequência estabelecida em SEQ ID NO:4.

[00192] Um ácido nucleico exemplar que codifica Ab3 HC é um ácido nucleico compreendendo a sequência estabelecida em SEQ ID NO:5.

[00193] Um ácido nucleico exemplar que codifica um Ab1 HC variante é um ácido nucleico compreendendo a sequência estabelecida em SEQ ID NO:47.

[00194] Um ácido nucleico exemplar que codifica um Ab2 HC variante é um ácido nucleico compreendendo a sequência estabelecida em SEQ ID NO:48.

[00195] Um ácido nucleico exemplar que codifica um Ab3 HC variante é um ácido nucleico compreendendo a sequência estabelecida em SEQ ID NO:49.

[00196] Aspectos da invenção incluem as variantes de polinucleotídeos (por exemplo, devido à degeneração) que codificam as sequências de aminoácidos descritas aqui.

[00197] Aspectos da invenção incluem uma variedade de modalidades incluindo, entre outras, as seguintes modalidades exemplares.

[00198] Um ácido nucleico isolado compreendendo um polinucleotídeo, em que o referido polinucleotídeo codifica um ou mais polipeptídeos compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

[00199] A. 1. uma sequência de domínio variável de cadeia leve que é pelo menos 90% idêntica a uma sequência de domínio variável de cadeia leve estabelecida em SEQ ID NOS:27-29;

[00200] 2. uma sequência de domínio variável de cadeia pesada que é pelo menos 90% idêntica a uma sequência de domínio variável de cadeia pesada estabelecida em SEQ ID NOS:9-11;

[00201] 3. um domínio variável de cadeia leve de (1) e um domínio

variável de cadeia pesada de (2); e

[00202] B. um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma CDR1, CDR2, CDR3 e/ou um domínio variável de cadeia pesada compreendendo um CDR1, CDR2, CDR3 que são iguais ou diferentes em não mais do que um total de três adições, substituições e/ou deleções de aminoácidos em cada CDR a partir das sequências a seguir:

[00203] 1. uma CDR1 (SEQ ID NO:30), CDR2 (SEQ ID NO:33), CDR3 (SEQ ID NO:36) de cadeia leve ou uma CDR1 (SEQ ID NO:12), CDR2 (SEQ ID NO:15), CDR3 (SEQ ID NO:18) de cadeia pesada de Ab1;

[00204] 2. uma CDR1 (SEQ ID NO:31), CDR2 (SEQ ID NO:34), CDR3 (SEQ ID NO:37) de cadeia leve ou uma CDR1 (SEQ ID NO:13), CDR2 (SEQ ID NO:16), CDR3 (SEQ ID NO:19) de cadeia pesada de Ab2; e

[00205] 3. uma CDR1 (SEQ ID NO:32), CDR2 (SEQ ID NO:35), CDR3 (SEQ ID NO:38) cadeia leve ou uma CDR1 (SEQ ID NO:14), CDR2 (SEQ ID NO:17), CDR3 (SEQ ID NO:20) de cadeia pesada de Ab3.

[00206] Em algumas modalidades, o ácido nucleico codifica um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:53 ou SEQ ID NO:54.

[00207] Em algumas modalidades, o ácido nucleico codifica um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, ou SEQ ID NO:52.

[00208] Em modalidades preferenciais, o polipeptídeo codificado pelo ácido nucleico ou ácido nucleico isolado é um componente de uma proteína de ligação de antígeno que se liga a OSMR.

[00209] Sequências de nucleotídeos correspondentes às sequências de aminoácidos descritas aqui, para serem utilizadas como sondas ou iniciadores para o isolamento de ácidos nucleicos ou como se-

quências de consulta para pesquisas em banco de dados, podem ser obtidas por "tradução ao contrário" de sequências de aminoácidos, ou por identificação de regiões de identidade de aminoácidos com polipeptídeos para os quais a sequência de DNA de codificação foi identificada. O processo de reação em cadeia da polimerase (PCR) conhecido pode ser empregado para isolar e amplificar uma sequência de DNA que codifica uma proteína de ligação de antígeno OSMR ou uma combinação desejada de fragmentos de polipeptídeo de proteína de ligação de antígeno OSMR. Os oligonucleotídeos que definem a terminação desejada da combinação de fragmentos de DNA são empregados como iniciadores 5' e 3'. Os oligonucleotídeos podem adicionalmente conter sítios de reconhecimento para as endonucleases de restrição, para facilitar a inserção da combinação amplificada de fragmentos de DNA em um vetor de expressão. Técnicas de PCR são descritas em Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; e *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

[00210] Moléculas de ácido nucleico da invenção incluem DNA e RNA em forma de fita simples e fita dupla, bem como as sequências complementares correspondentes. DNA inclui, por exemplo, cDNA, DNA genômico, DNA quimicamente sintetizado, DNA amplificado por PCR, e combinações dos mesmos. As moléculas de ácido nucleico da invenção incluem genes inteiros ou moléculas de cDNA, bem como uma combinação de fragmentos das mesmas. Os ácidos nucleicos da invenção são preferencialmente derivados de fontes humanas, mas a invenção inclui os derivados de espécies não humanas também.

[00211] Em algumas modalidades, ácidos nucleicos da invenção são ácidos nucleicos isolados. Um "ácido nucleico isolado" é um ácido nucleico que foi separado das sequências genéticas adjacentes pre-

sentas no genoma do organismo do qual o ácido nucleico foi isolado, no caso de ácidos nucleicos isolados de fontes de ocorrência natural. No caso de ácidos nucleicos sintetizados enzimaticamente a partir de um modelo ou quimicamente, como produtos de PCR, moléculas de cDNA, ou oligonucleotídeos, por exemplo, entende-se que os ácidos nucleicos resultantes desses processos são ácidos nucleicos isolados. Uma molécula isolada de ácido nucleico refere-se a uma molécula de ácido nucleico sob a forma de um fragmento separado ou como um componente de um construto de ácido nucleico maior. Em uma modalidade preferencial, os ácidos nucleicos são substancialmente livres de material endógeno contaminante. A molécula de ácido nucleico preferencialmente é derivada de DNA ou RNA isolado pelo menos uma vez na forma substancialmente pura e em uma quantidade ou concentração permitindo a identificação, manipulação, e recuperação de suas sequências de nucleotídeo componentes por métodos bioquímicos padrão (como aqueles descritos em Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Essas sequências são preferencialmente fornecidas e/ou construídas sob a forma de um quadro de leitura aberto ininterrupto por sequências internas não traduzidas ou íntrons, que estão normalmente presentes em genes eucariontes. Sequências de DNA não traduzido podem estar presentes 5' ou 3' de um quadro de leitura aberto, onde os mesmos não interferem com a manipulação ou expressão da região de codificação.

[00212] A presente invenção também inclui ácidos nucleicos ou ácidos nucleicos isolados que se hibridizam sob condições moderadamente rigorosas, e mais preferencialmente condições altamente rigorosas, aos ácidos nucleicos que codificam proteínas de ligação de antígeno OSMR conforme descrito aqui. Os parâmetros básicos que afetam a escolha das condições de hibridização e orientação para a

definição de condições apropriadas são estabelecidos por Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11; e Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4), e podem ser prontamente determinados por especialistas na técnica com base em, por exemplo, comprimento e/ou composição de base do DNA. Uma maneira de alcançar condições moderadamente rigorosas envolve o uso de uma solução de pré-lavagem contendo 5 x SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), tampão de hibridização de cerca de 50% formamida, 6 x SSC, e uma temperatura de hibridização de cerca de 55 graus C (ou outras soluções de hibridização semelhantes, como uma contendo cerca de 50% formamida, com uma temperatura de hibridização de cerca de 42 graus C), e condições de lavagem de cerca de 60 graus C, em 0,5 x SSC, 0,1% SDS. Geralmente, condições altamente rigorosas são definidas como condições de hibridização como acima, mas com lavagem a aproximadamente 68 graus C, 0,2 x SSC, 0,1% SDS. SSPE (1xSSPE é 0,15M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, e 1,25 mM EDTA, pH 7,4) pode ser substituído por SSC (1xSSC é 0,15M NaCl e 15mM citrato de sódio) nos tampões de hibridização e lavagem; lavagens são executadas por 15 minutos após a conclusão da hibridização. Deve ser entendido que a temperatura de lavagem e concentração de sal pode ser ajustada conforme necessário para atingir um nível de rigor desejado aplicando os princípios básicos que regem as reações de hibridização e estabilidade duplex, como conhecido pelos especialistas na técnica e descrito mais abaixo (ver, por exemplo, Sambrook et al., 1989). Quando hibridizando um ácido nucleico para um ácido nucleico alvo de sequência desconhecida, o comprimento do híbrido é assumido como sendo o do ácido nucleico hibridizando. Quando os ácidos nucleicos de sequência conhe-

cida são hibridizados, o comprimento de híbrido pode ser determinado alinhando as sequências dos ácidos nucleicos e identificando a região ou regiões de complementaridade de sequência ideal. A temperatura de hibridização para híbridos previstos para ter menos de 50 pares de bases de comprimento deve ser de 5 a 10 graus C menos do que a temperatura de fusão (T_m) do híbrido, onde T_m é determinada de acordo com as seguintes equações. Para híbridos com menos de 18 pares de bases de comprimento, T_m (graus C) = $2(\# \text{ de A} + \text{T bases}) + 4(\# \text{ de G} + \text{C bases})$. Para os híbridos com mais de 18 pares de bases de comprimento, T_m (graus C) = $81,5 + 16,6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{ G} + \text{C}) - (600/N)$, onde N é o número de bases no híbrido, e $[\text{Na}^+]$ é a concentração de íons de sódio no tampão de hibridização ($[\text{Na}^+]$ para 1xSSC = 0,165M). Preferencialmente, cada ácido nucleico se hibridizando tem um comprimento que é pelo menos 15 nucleotídeos (ou mais preferencialmente pelo menos 18 nucleotídeos, ou pelo menos 20 nucleotídeos, ou pelo menos 25 nucleotídeos, ou pelo menos 30 nucleotídeos, ou pelo menos 40 nucleotídeos ou mais preferencialmente pelo menos 50 nucleotídeos), ou pelo menos 25% (mais preferencialmente pelo menos 50%, ou pelo menos 60% ou pelo menos 70% e mais preferencialmente pelo menos 80%) do comprimento do ácido nucleico da presente invenção para o qual o mesmo se hibridiza, e pelo menos 60% de identidade de sequência (mais preferencialmente pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86% pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% e mais preferencialmente pelo menos 99,5%) com o ácido nucleico da presente invenção para o qual se hibridiza, onde a identidade de sequência é

determinada comparando-se as sequências de ácidos nucleicos hibridizando quando alinhado a fim de maximizar a sobreposição e identidade, minimizando as lacunas de sequência conforme descrito em mais detalhes acima.

[00213] As variantes de acordo com a invenção são normalmente preparadas por mutagênese sítio específica de nucleotídeos no DNA que codifica a proteína de ligação de antígeno, usando o cassete ou mutagênese de PCR ou outras técnicas bem conhecidas, para produzir DNA que codifica a variante, e expressando o DNA recombinante em cultura de células conforme descrito aqui. No entanto, fragmentos de proteína de ligação de antígeno compreendendo CDRs variantes tendo até cerca de 100-150 resíduos podem ser preparados por síntese *in vitro* utilizando técnicas estabelecidas. As variantes normalmente apresentam a mesma atividade biológica qualitativa do análogo de ocorrência natural, por exemplo, ligação para OSMR, embora variantes também possam ser selecionadas que possuem características modificadas como será mais plenamente descrito aqui.

[00214] Como será apreciado por especialistas na técnica, devido à degeneração do código genético, um número extremamente grande de ácidos nucleicos pode ser preparado, todos os quais codificam as CDRs (e cadeias leves e pesadas ou outros componentes de uma proteína de ligação de antígeno) da presente invenção. Assim, tendo identificado uma sequência de aminoácidos particular, os especialistas na técnica poderiam fazer qualquer número de diferentes ácidos nucleicos, simplesmente modificando a sequência de um ou mais códons de modo a não alterar a sequência de aminoácidos da proteína codificada.

[00215] A presente invenção também fornece sistemas de expressão e construtos sob a forma de plasmídeos, vetores de expressão, cassetes de transcrição ou expressão que compreendem pelo menos um polinucleotídeo como acima. Além disso, a invenção fornece células hos-

pedeiras compreendendo esses sistemas de expressão ou construtos.

[00216] Normalmente, vetores de expressão usados nas células hospedeiras irão conter sequências para manutenção do plasmídeo e para clonagem e expressão de sequências de nucleotídeo exógenas. Essas sequências, referidas coletivamente como "sequências de flanqueamento," em certas modalidades tipicamente irão incluir uma ou mais das seguintes sequências de nucleotídeo: um promotor, uma ou mais sequências de potencializador, uma origem de replicação, uma sequência de terminação transcrecional, uma sequência de íntron completa contendo um sítio de junção doador e acceptor, uma sequência que codifica uma sequência líder para secreção de polipeptídeo, um sítio de ligação de ribossomo, uma sequência de poliadenilação, uma região de poliligante para inserir o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo para ser expresso e um elemento marcador selecionável. Cada uma destas sequências é discutida abaixo.

[00217] Opcionalmente, o vetor pode conter uma sequência de codificação de "tag", ou seja, uma molécula do oligonucleotídeo localizada na extremidade 5' ou 3' da sequência de codificação proteína de ligação de antígeno OSMR; a sequência de oligonucleotídeo codifica polyHis (como hexaHis), ou outro "tag" como FLAG, HA (hemaglutinina de vírus influenza) ou myc, para os quais existem anticorpos comercialmente disponíveis. Esse tag é normalmente fundido para o polipeptídeo após expressão do polipeptídeo, e pode servir como um meio para a purificação da afinidade ou detecção da proteína de ligação de antígeno OSMR da célula hospedeira. A purificação da afinidade pode ser realizada, por exemplo, por cromatografia em coluna utilizando anticorpos contra o tag como uma matriz de afinidade. Opcionalmente, o tag pode posteriormente ser removido da proteína de ligação de antígeno OSMR purificada por vários meios, como o uso de certas peptidases para clivagem.

[00218] Sequências de flanqueamento podem ser homólogas (ou seja, da mesma espécie e/ou cepa como a célula hospedeira), heterólogas (ou seja, de uma espécie diferente de espécies ou cepas de célula hospedeira), híbridas (ou seja, uma combinação de sequências de flanqueamento de mais de uma fonte), sintéticas ou nativas. Como tal, a fonte de uma sequência de flanqueamento pode ser qualquer organismo procarionte ou eucarionte, qualquer organismo vertebrado ou invertebrado, ou qualquer planta, contanto que a sequência de flanqueamento seja funcional em, e possa ser ativada pela maquinaria da célula hospedeira.

[00219] Sequências de flanqueamento úteis em vetores desta invenção podem ser obtidas por qualquer um dos vários métodos conhecidos na técnica. Normalmente, sequências de flanqueamento úteis aqui serão previamente identificadas pelo mapeamento e/ou digestão de endonuclease de restrição e, portanto, podem ser isoladas da fonte de tecido apropriada usando as endonucleases de restrição apropriadas. Em alguns casos, a sequência de nucleotídeo completo de uma sequência de flanqueamento pode ser conhecida. Aqui, a sequência de flanqueamento pode ser sintetizada usando os métodos descritos aqui para a síntese ou clonagem do ácido nucleico.

[00220] Se toda ou apenas uma parte da sequência de flanqueamento é conhecida, a mesma pode ser obtida usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e/ou por uma triagem de uma biblioteca genómica com uma sonda apropriada como um oligonucleotídeo e/ou fragmento de sequência de flanqueamento de espécie igual ou diferente. Onde a sequência de flanqueamento não é conhecida, um fragmento de DNA contendo uma sequência de flanqueamento pode ser isolado de um pedaço maior de DNA que pode conter, por exemplo, uma sequência de codificação ou até mesmo outro gene ou genes. O isolamento pode ser realizado por digestão de endonuclease de restri-

ção para produzir o fragmento de DNA apropriado seguido de isolamento usando purificação de gel de agarose, cromatografia de coluna Qiagen® (Chatsworth, CA) ou outros métodos conhecidos pelo especialista na técnica. A seleção de enzimas apropriadas para realizar este propósito será prontamente aparente para uma especialista na técnica.

[00221] Uma origem de replicação é normalmente uma parte desses vetores de expressão procariontes adquiridos comercialmente, e a origem auxilia na amplificação do vetor em uma célula hospedeira. Se o vetor de escolha não contiver uma origem de sítio de replicação, pode-se sintetizar quimicamente com base em uma sequência conhecida e ligada ao vetor. Por exemplo, a origem de replicação do plasmídeo pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) é adequada para a maioria das bactérias gram-negativas, e várias origens virais (por exemplo, SV40, poliomá, adenovírus, vírus stomatitis vesicular (VSV), ou papilomavírus como HPV ou BPV) são úteis para clonagem de vetores em células de mamíferos. Geralmente, o componente de origem de replicação não é necessário para vetores de expressão de mamíferos (por exemplo, a origem SV40 é usada frequentemente somente porque também contém promotor precoce do vírus).

[00222] Uma sequência de terminação da transcrição é normalmente localizada 3' para a extremidade de uma região de codificação de polipeptídeo e serve para terminar a transcrição. Geralmente, uma sequência de terminação da transcrição em células procariontes é um fragmento rico em G-C, seguido por uma sequência poli-T. Enquanto a sequência é facilmente clonada de uma biblioteca ou mesmo adquirida comercialmente como parte de um vetor, a mesma pode também ser facilmente sintetizada usando métodos para a síntese de ácidos nucleicos como os descritos aqui.

[00223] Um gene marcador selecionável codifica uma proteína necessária para a sobrevivência e o crescimento de uma célula hospedeira

crescida em meio de cultura seletivo. Genes marcadores de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, tetraciclina, ou canamicina para células hospedeiras procariontes; (b) complementam deficiências auxotróficas da célula; ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis a partir do meio complexo ou definido. Marcadores selecionáveis específicos são o gene de resistência à canamicina, gene de resistência à ampicilina, e o gene de resistência à tetraciclina. Vantajosamente, um gene de resistência à neomicina também pode ser utilizado para seleção nas células hospedeiras procariontes e eucariontes.

[00224] Outros genes selecionáveis podem ser usados para amplificar o gene que será expresso. A amplificação é o processo em que os genes que são necessários para a produção de uma proteína crítica para o crescimento ou sobrevivência da célula são reiterados em tandem dentro dos cromossomos de gerações sucessivas de células recombinantes. Exemplos de marcadores selecionáveis adequados para células de mamíferos incluem genes de dihidrofolato redutase (DHFR) e sem promotor de timidina quinase. Transformantes de células de mamíferos são colocados sob pressão de seleção em que só o transformante é exclusivamente adaptado para sobreviver em virtude do gene selecionável presente no vetor. A pressão de seleção é imposta pelo cultivo de células transformadas em condições em que a concentração do agente de seleção no meio é sucessivamente aumentada, levando assim à amplificação do gene selecionável e o DNA que codifica outro gene, como um anticorpo de proteína de ligação de antígeno que se liga ao polipeptídeo OSMR. Como resultado, quantidades aumentadas de um polipeptídeo como uma proteína de ligação de antígeno OSMR são sintetizadas a partir do DNA amplificado.

[00225] Um sítio de ligação ao ribossoma é geralmente necessário para iniciação da tradução de mRNA e é caracterizado por uma se-

quência Shine-Dalgarno (procariôntes) ou uma sequência Kozak (eucariôntes). O elemento está localizado normalmente 3' para o promotor e 5' para a sequência de codificação do polipeptídeo a ser expresso. Em certas modalidades, uma ou mais regiões de codificação podem ser operacionalmente ligadas a um sítio de ribossomo interno (IRES), permitindo a tradução de quadros de leitura abertos de um transcrito de RNA simples.

[00226] Em alguns casos, como quando a glicosilação é desejada em um sistema de expressão de células hospedeiras eucariôntes, pode-se manipular as diversas pré ou pró-sequências para melhorar a glicosilação ou rendimento. Por exemplo, pode-se alterar o sítio de clivagem de peptidase de um peptídeo sinal particular, ou adicionar as pró-sequências, que também podem afetar a glicosilação. O produto de proteína final pode ter, na posição -1 (em relação ao primeiro aminoácido da proteína madura) um ou mais aminoácidos incidentes adicionais para expressão, que pode não ter sido totalmente removido. Por exemplo, o produto de proteína final pode ter um ou dois resíduos de aminoácidos encontrados no sítio de clivagem de peptidase, ligado ao amino-terminal. Alternativamente, o uso de alguns sítios de clivagem enzimática pode resultar em uma forma ligeiramente truncada do polipeptídeo desejado, se a enzima cortar em tal área dentro do polipeptídeo maduro.

[00227] Os vetores de expressão e clonagem da invenção normalmente contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e operacionalmente ligado à molécula que codifica uma proteína de ligação de antígeno OSMR. Os promotores são sequências não transcritas localizadas a montante (ou seja, 5') para o códon de início de um gene estrutural (geralmente dentro de cerca de 100 a 1000 bp) que controlam a transcrição do gene estrutural. Os promotores são convencionalmente agrupados em uma das duas classes:

promotores induzíveis e promotores constitutivos. Promotores induzíveis podem iniciar o aumento dos níveis de transcrição de DNA sob seus controles em resposta a algumas alterações nas condições de cultura, como a presença ou ausência de um nutriente ou a mudança de temperatura. Promotores constitutivos, por outro lado, transcrevem uniformemente o gene ao qual são operacionalmente ligados, ou seja, com pouco ou nenhum controle sobre a expressão gênica. Um grande número de promotores, reconhecidos por uma variedade de células hospedeiras potenciais, é bem conhecido. Um promotor adequado está operacionalmente ligado ao DNA que codifica cadeia pesada ou cadeia leve compreendendo uma proteína de ligação de antígeno OSMR da invenção removendo o promotor da fonte de DNA por digestão de enzima de restrição e inserindo a sequência de promotor desejada no vetor.

[00228] Promotores adequados para uso com os hospedeiros de levedura são também conhecidos na técnica. Potencializadores de levedura são utilizados vantajosamente com os promotores de levedura. Promotores adequados para uso com células hospedeiras de mamíferos são bem conhecidos e incluem, entre outros, aqueles obtidos a partir do genoma de vírus como vírus polyoma, vírus fowlpox, adenovírus (como o Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus sarcoma aviário, citomegalovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e mais preferencialmente Vírus Símio 40 (SV40). Outros promotores de mamíferos adequados incluem promotores de mamíferos heterólogos, por exemplo, promotores de calor-choque e o promotor de actina.

[00229] Promotores adicionais que podem ser de interesse incluem, entre outros: Promotor precoce SV40 (Benoist et al., 1981, *Nature* 290:304-310); promotor CMV (Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); o promotor contido na repetição terminal longa 3' do vírus do sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-

797); promotor de herpes timidina quinase (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); promotor e sequências reguladoras do gene metalotionina (Prinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); e promotores procariontes como o promotor de beta-lactamase (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); ou o promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Também de interesse são as seguintes regiões de controle transcrional de animais, que apresentam especificidade de tecido e são utilizadas em animais transgênicos: região de controle do gene da elastase I que é ativa nas células acinares do pâncreas (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); região de controle do gene da insulina que é ativo em células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122), região de controle do gene de imunoglobulina que é ativo nas células linfoides (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-658; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444), a região de controle de vírus tumor mamário de camundongo que está ativo no testículo, mama, células linfoides e mastócitos (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-495), região de controle do gene de albumina que é ativo no fígado (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276), a região de controle do gene alfa-fetoproteína, que é ativo no fígado (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 253:53-58); região de controle do gene alfa 1 antitripsina que está ativo no fígado (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); a região de controle de gene beta-globina que é ativa em células mieloides (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); a região de controle de gente da proteína básica de mielina que é ativa em células de oligodendrócitos no cérebro (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-712); a região de controle de

gente de cadeia leve de miosina-2 que é ativa no músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); e a região de controle de gene de hormônio liberador gonadotrópico que é ativo no hipotálamo (Masson *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-1378).

[00230] Uma sequência potencializadora pode ser inserida em um vetor para aumentar a transcrição de DNA que codifica cadeia leve ou cadeia pesada compreendendo uma proteína de ligação de antígeno OSMR da invenção por eucariontes superiores. Potencializadores são elementos que agem de forma cis do DNA, geralmente com cerca de 10-300 pares de bases de comprimento, que agem em um promotor para aumentar a sua transcrição. Potencializadores são relativamente independentes de orientação e posição, sendo encontrados nas posições 5' e 3' para a unidade de transcrição. Várias sequências de potencializadores disponíveis a partir de genes de mamíferos são conhecidas (por exemplo, globina, elastase, albumina, alfa-feto-proteína e insulina). Normalmente, no entanto, um potencializador de um vírus é usado. O potencializador SV40, potencializador de promotor precoce de citomegalovírus, o potencializador polioma e potencializadores de adenovírus conhecidos na técnica são elementos potencializadores exemplares para a ativação dos promotores eucariontes. Enquanto um potencializador pode ser posicionado no vetor 5' ou 3' para uma sequência codificadora, o mesmo está normalmente localizado em um sítio 5' do promotor. Uma sequência que codifica uma sequência nativa apropriada ou sinal heteróloga (sequência líder ou peptídeo sinal) pode ser incorporada em um vetor de expressão, para promover a secreção extracelular do anticorpo. A escolha do peptídeo sinal ou líder depende do tipo das células hospedeiras em que o anticorpo vai ser produzido, e uma sequência sinal heteróloga pode substituir a sequência sinal nativa. Exemplos de peptídeos sinal que são funcionais em células hospedeiras de mamíferos incluem os seguintes: a se-

quência sinal para interleucina-7 (IL-7) descrita na Patente US 4.965.195; a sequência sinal do receptor de interleucina-2 descrito em Cosman *et al.*, 1984, *Nature* 312:768; o peptídeo sinal do receptor de interleucina-4 descrito em Patente EP No. 0367 566; o peptídeo sinal de receptor de interleucina-1 tipo I descrito em Patente US 4.968.607; o peptídeo sinal de receptor de interleucina-1 tipo II descrito em EP Patente No. 0 460 846.

[00231] O vetor pode conter um ou mais elementos que facilitam a expressão quando o vetor é integrado no genoma da célula hospedeira. Exemplos incluem um elemento EASE (Aldrich *et al.* 2003 *Bio-technol Prog.* 19:1433-38) e uma região de ligação da matriz (MAR). MARs medeia a organização estrutural da cromatina e pode isolar o vetor integrado do efeito de "posição". Assim, MARs é particularmente útil quando o vetor é usado para criar transfectantes estáveis. Vários ácidos nucleicos contendo MAR naturais e sintéticos são conhecidos na técnica, por exemplo, Pat. U.S. Nos. 6.239.328; 7.326.567; 6.177.612; 6.388.066; 6.245.974; 7.259.010; 6.037.525; 7.422.874; 7.129.062.

[00232] Vetores da expressão da invenção podem ser construídos a partir de um vetor inicial como um vetor comercialmente disponível. Esses vetores podem ou não conter todas as sequências de flanqueamento desejadas. Quando uma ou mais das sequências de flanqueamento aqui descritas já não estão presentes no vetor, as mesmas podem ser individualmente obtidas e ligadas no vetor. Métodos utilizados para obter cada uma das sequências de flanqueamento são conhecidos por um especialista na técnica.

[00233] Depois que o vetor é construído e uma molécula de ácido nucleico que codifica uma sequência de cadeia leve, de cadeia pesada, ou uma de cadeia leve e uma de cadeia pesada compreendendo uma sequência de ligação de antígeno OSMR foi inserida no sítio

apropriado do vetor, o vetor completo pode ser inserido em uma célula hospedeira adequada para amplificação e/ou expressão de polipeptídeo. A transformação de um vetor de expressão para uma proteína de ligação de antígeno OSMR em uma célula hospedeira selecionada pode ser realizada por métodos conhecidos incluindo transfecção, infecção, coprecipitação de fosfato de cálcio, eletroporação, microinjeção, lipofecção, transfecção mediada por DEAE-dextrano, ou outras técnicas conhecidas. O método selecionado será em parte uma função do tipo de célula hospedeira sendo usado. Esses métodos e outros métodos adequados são conhecidos pelos especialistas na técnica e estão estabelecidos, por exemplo, em Sambrook *et al.*, 2001, *supra*.

[00234] Uma célula hospedeira, quando cultivada em condições apropriadas, sintetiza uma proteína de ligação de antígeno OSMR que pode ser posteriormente coletada do meio de cultura (se a célula hospedeira secretar no meio) ou diretamente da célula hospedeira produzindo a mesma (se não é secretada). A seleção de uma célula hospedeira apropriada dependerá de vários fatores, como níveis de expressão desejados, modificações de polipeptídeo que são desejáveis ou necessárias para a atividade (como glicosilação ou fosforilação) e facilidade de enovelamento em uma molécula biologicamente ativa. Uma célula hospedeira pode ser eucarionte ou procariante.

[00235] Linhagens de células de mamíferos disponíveis como hospedeiros para expressão na técnica são bem conhecidas e incluem, entre outras, linhas de células imortalizadas disponíveis a partir de American Type Culture Collection (ATCC) e quaisquer linhagens de células usadas em um sistema de expressão conhecido na técnica podem ser usadas para preparar os polipeptídeos recombinantes da invenção. Em geral, células hospedeiras são transformadas com um vetor de expressão recombinante que compreende o DNA que codifica um polipeptídeo de anticorpo anti-OSMR. Entre as células hospedeiras

que podem ser empregadas estão procariontes, de levedura ou células eucariontes superiores. Procariontes incluem organismos gram negativos ou gram positivos, por exemplo, *E. coli* ou bacilos. Células eucariontes superiores incluem células de inseto e linhagens de células estabelecidas de origem de mamíferos. Exemplos de linhagens de células hospedeiras de mamífero adequados incluem a linhagem COS-7 de rim de macaco (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, 1981, Cell 23:175), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovário de hamster chinês (CHO) ou derivados como Veggie CHO e linhagens de células relacionadas que crescem em meio livre de soro (Rasmussen *et al.*, 1998, *Cytotechnology* 28: 31), células HeLa, linhagens de células BHK (ATCC CRL 10), e a linhagem de célula CVI/EBNA derivada da linhagem de células de rim de macaco verde africano CVI (ATCC CCL 70) conforme descrito por McMahan *et al.*, 1991, EMBO J. 10: 2821, células de rim embrionário humano como 293, 293 EBNA, ou MSR 293, células A431 epidérmica humana, células Colo205 humanas, outras linhagens de célula de primata transformadas, células diploides normais, linhagens de células derivadas de cultura *in vitro* de tecido primário, explantes primários, células HL-60, U937, HaK ou Jurkat. Opcionalmente, linhagens de células de mamífero como HepG2/3B, KB, NIH 3T3 ou S49, por exemplo, podem ser usadas para a expressão do polipeptídeo quando é desejável usar o polipeptídeo em vários ensaios de transdução de sinal ou repórter. Alternativamente, é possível produzir o polipeptídeo em eucariontes inferiores como levedura ou em procariontes como bactérias. Leveduras adequadas incluem *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida* ou qualquer cepa de levedura capaz de expressar polipeptídeos heterólogos. Cepas bacterianas adequadas incluem *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, ou qualquer cepa bacteriana capaz de expressar polipeptídeos.

tídeos heterólogos. Se o polipeptídeo é preparado em leveduras ou bactérias, pode ser desejável modificar o polipeptídeo produzido aqui, por exemplo, pela fosforilação ou glicosilação dos sítios apropriados, a fim de obter o polipeptídeo funcional. Essas ligações covalentes podem ser realizadas usando os métodos químicos ou enzimáticos conhecidos. Um polipeptídeo também pode ser produzido ligando operacionalmente o ácido nucleico ou ácido nucleico isolado da invenção para sequências de controle adequadas em um ou mais vetores de expressão de inseto, e empregando um sistema de expressão de insetos. Materiais e métodos para sistemas de expressão de baculovírus/células de inseto são comercialmente disponíveis em forma de kit de, por exemplo, Invitrogen, San Diego, CA, U.S.A. (o kit MaxBac®), e esses métodos são bem conhecidos na técnica, como descrito em Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), e Luckow and Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988). Sistemas de tradução livres de célula também poderiam ser empregados para produzir polipeptídeos utilizando RNAs derivados de construtos de ácido nucleico descritos aqui. Vetores de clonagem e expressão apropriados para uso em células hospedeiras de bactérias, fungos, leveduras, e mamíferos são descritos por Pouwels et al (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985). Uma célula hospedeira que compreende um ácido nucleico ou ácido nucleico isolado da invenção, preferencialmente operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência de controle de expressão, é uma "célula hospedeira recombinante".

[00236] Em certas modalidades, linhagens de células podem ser selecionadas através da determinação de quais linhagens de células têm níveis elevados de expressão e produzem constitutivamente proteínas de ligação de antígeno com propriedades de ligação OSMR. Em outra modalidade, uma linhagem de células da linhagem de células B

que não prepara seu próprio anticorpo, mas tem uma capacidade de preparar e secretar um anticorpo heterólogo, pode ser selecionada.

[00237] Proteínas de Ligação de Antígeno OSMR Depletoras de Células

[00238] Em modalidades preferenciais, a proteína de ligação de antígeno OSMR se liga a OSMR e inibe a ligação a OSM e/ou IL-31, reduzindo assim sinalização mediada por OSM e/ou IL 31 em células que expressam OSMR. Em certas modalidades, no entanto, a proteína de ligação de antígeno OSMR se liga a OSMR e é direcionada para uma célula que expressa OSMR para depleção. Em vários aspectos, a proteína de ligação de antígeno OSMR inibe a ligação de OSM e/ou IL-31 e é direcionada para célula OSMR para depleção.

[00239] Proteínas de ligação de antígeno OSMR depletoras de célula são particularmente úteis no tratamento de doenças ou distúrbios associados com a superexpressão de OSMR, por exemplo, uma doença autoimune, doença inflamatória, uma doença ou distúrbio associado com deposição ou remodelação de matriz extracelular, ou um tumor que expressa OSMR. Métodos para direcionamento para células com proteínas de ligação de antígeno, por exemplo, os anticorpos, são bem conhecidos na técnica. Modalidades exemplares são discutidas abaixo.

Conjugados de Anticorpo-Fármaco

[00240] Modalidades da invenção incluem conjugados de anticorpo-fármaco(ADCs). Geralmente, o ADC compreende um anticorpo conjugado com um agente quimioterápico, por exemplo, um agente citotóxico, um agente citostático, uma toxina, ou um agente radioativo. Uma molécula ligante pode ser usada para conjugar o fármaco ao anticorpo. Uma grande variedade de ligantes e fármacos úteis em tecnologia ADC é conhecida na técnica e pode ser usada em modalidades da presente invenção. (Ver US20090028856; US2009/0274713;

US2007/0031402; WO2005/084390; WO2009/099728; US5208020; US5416064; US5475092; 5585499; 6436931; 6372738; e 6340701, todos incorporados aqui como referência).

Ligantes

[00241] Em certas modalidades, o ADC compreende um ligante constituído por um ou mais componentes de ligante. Componentes de ligantes exemplares incluem 6-maleimidocaproil, maleimidopropanoil, valina-citrulina, alanina-fenilalanina, p-aminobenziloxicarbonil, e aqueles que resultam da conjugação com os reagentes ligantes, incluindo, entre outros, N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC," também referido aqui como "MCC"), e N-succinimidil (4-iodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB").

[00242] Ligantes podem ser um ligante "clivável" ou um ligante "não clivável" vinculador (Ducry and Stump, *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 5-13; incorporados aqui como referência em suas totalidades). Ligantes cliváveis são projetados para liberar o fármaco quando submetidos a determinados fatores de ambiente, por exemplo, quando internalizado na célula alvo. Ligantes cliváveis incluem ligantes labéis ao ácido, ligantes sensíveis à protease, ligantes fotolábeis, ligante dimetil ou ligantes contendo dissulfeto. Ligantes não cliváveis tendem a permanecer covalentemente associados com pelo menos um aminoácido do anticorpo e o fármaco após internalização por e degradação dentro da célula alvo. Um ligante não clivável exemplar é MCC.

Fármacos

[00243] Em certas modalidades, o anticorpo é conjugado com um agente quimioterápico. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquilantes, como tiotepa e ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquil como bussulfano, improsulfano e pipossulfano; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileni-

minas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo os análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos KW-2189 e CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictiina; espongistatina; mostardas de nitrogênio como clorambucil, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracil; nitrosureias como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, como os antibióticos de enediina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama1 e caliqueamicina teta I, ver, por exemplo, Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994): dinemicina, incluindo dinemicina A; uma esperamicina; bem como cromóforo neocarzinostatina e cromóforos de antibióticos enediina cromoproteína relacionados), aclacinomisinás, actinomicina, autramicina, azasserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina; cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (incluindo morfolino-doxorrubicina, ci-anomorfólico-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, nitomicina, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potifromicina, puromicina, quelamicina, rodoxicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos, como metotrexato e 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tio-

guanina; análogos de pirimidina como, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; androgéneos, como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositor de ácido fólico, como o ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; uma epotilona; etoglúcido; nitrato de gálio; hidroxiureia; lentinan; ionidamina; maitansinóides como maitansina, e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etil-hidrazida; procarbazina; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"- triclorotrietylamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, vercurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por exemplo, paclitaxel (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) e docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptoperura; metotrexato; análogos de platina como cisplatina e carboplatina; vinblastine; platina; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbine; navelbina; novantrona; teniposídeo; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; sais, ácidos ou derivados farmaceuticamente aceitáveis de qualquer um acima. Também incluídos nesta definição são agentes anti-hormonais que atuam para regular ou inibir a ação do hormônio sobre tumores, como antiestrógenos, incluindo, por exemplo, tamoxifeno, raloxifeno, inibidor de aromatase, 4(5)-imidazois, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno,

ceoxifeno, LY117018, onapristona e toremifeno (Fareston); e antiandrógenos como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelina; siRNA e sais farmaceuticamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer um dos acima. Outros agentes quimioterápicos que podem ser usados com a presente invenção são descritos em Publicação US 20080171040 ou Publicação US 20080305044, cada uma das quais é incorporada aqui em sua totalidade como referência.

[00244] É contemplado que um anticorpo pode ser conjugado com dois ou mais diferentes agentes quimioterápicos ou uma composição farmacêutica pode compreender uma mistura de anticorpos em que o componente de anticorpo é idêntico, exceto por ser conjugado com um agente quimioterápico diferente. Essas modalidades podem ser úteis para o direcionamento de múltiplas vias biológicas com uma célula alvo.

[00245] Em modalidades preferenciais, o ADC comprehende por um anticorpo conjugado com uma ou mais moléculas de maitansinoide, que são inibidores mitóticos que agem por inibição da polimerização da tubulina. Maitansinoides, incluindo várias modificações, são descritos nas Patentes US 3896111; 4151042; 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; 4371533; e WO 2009/099728. Frações de fármaco maitansinoide podem ser isoladas de fontes naturais, produzidas utilizando tecnologia recombinante, ou preparadas sinteticamente. Maitansinoides exemplares incluem C-19-decloro (Patente US 4256746), C-20-hidroxi (ou C-20-demetyl) +/- C-19-decloro (Patentes US 4307016 e 4361650), C-20-demetoxi (ou C-20-aciloxi (-OCOR), +/- decloro (Patente US 4294757), C-9-SH (Patente US 4.424.219), C-14-alcoximetil (demetoxi/CH₂OR) (Patente US 4.331.598), C-14-hidroximetil ou aciloximetil (CH₂OH ou CH₂OAc) (Patente US 4,450,254), C-15-hidroxi/aciloxi (Patente US 4.364.866), C-15-metoxi

(Patente US 4.313.946 e 4.315.929), C-18-N-demetil (Patentes US 4.362.663 e 4.322.348), e 4,5-deoxi (Patente US 4.371.533).

[00246] Várias posições em compostos de maitansinoide podem ser usadas como a posição da ligação, dependendo do tipo de ligação desejada. Por exemplo, para a formação de uma ligação de éster, a posição C-3 tendo um grupo hidroxil, a posição C-14 modificada com hidroximetil, a posição C-15 modificada com um grupo hidroxila, e a posição C-20 tendo um grupo hidroxil são todas adequadas (Patentes US 5208020, RE39151, e 6913748; Pub. Ped. Pat. US 20060167245 e 20070037972, e WO 2009099728).

[00247] Maitansinoides preferenciais incluem aqueles conhecidos na técnica como DM1, DM3, e DM4 (Pub. Ped. Pat.US 2009030924 e 20050276812, incorporado aqui como referência).

[00248] ADCs contendo maitansinoides, métodos para preparar esses ADCs, e seus usos terapêutico são descritos em Patentes US 5208020 e 5416064, Pub. Ped. Pat. US 20050276812 e WO 2009099728 (todos incorporados como referência aqui). Ligantes que são úteis para preparar ADCs de maitansinoide são conhecidos na técnica (Patente US 5208020 e Pub. Ped. Pat. US 2005016993 e 20090274713; todos incorporados aqui como referência). ADCs de maitansinoide compreendendo um ligante SMCC podem ser preparados conforme descrito em Publ. Pat.US 2005/0276812.

Anticorpos com Função Efetora Potencializada

[00249] Uma das funções da porção Fc de um anticorpo é comunicar com o sistema imune quando o anticorpo se liga ao seu alvo. Isto é considerado "função efetora." A Comunicação leva à citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP), e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC). ADCC e ADCP são mediadas através da ligação de Fc para receptores Fc na superfície das células do sistema imune. CDC é

mediada através da ligação do Fc com proteínas do sistema complemento, por exemplo, C1q.

[00250] As subclasses de IgG variam em sua capacidade de mediar funções efetoras. Por exemplo, IgG1 é muito superior a IgG2 e IgG4 na mediação de ADCC e CDC. Assim, em modalidades em que uma célula expressa OSMR é alvo para a destruição, um anticorpo IgG1 anti-OSMR seria preferencial.

[00251] A função efetora dos anticorpos pode ser aumentada, ou diminuída, introduzindo uma ou mais mutações para a Fc. Modalidades da invenção incluem proteínas de ligação de antígeno, por exemplo, anticorpos, tendo uma Fc projetado para aumentar a função efetora (US 7.317.091 e Strohl, *Curr. Opin. Biotech.*, 20:685-691, 2009; ambos incorporados aqui como referência em sua totalidade). Moléculas Fc IgG1 exemplares tendo função efetora aumentada incluem (com base no esquema de numeração de Kabat) aquelas que têm as seguintes substituições:

- [00252] S239D/I332E
- [00253] S239D/A330S/I332E
- [00254] S239D/A330L/I332E
- [00255] S298A/D333A/K334A
- [00256] P247I/A339D
- [00257] P247I/A339Q
- [00258] D280H/K290S
- [00259] D280H/K290S/S298D
- [00260] D280H/K290S/S298V
- [00261] F243L/R292P/Y300L
- [00262] F243L/R292P/Y300L/P396L
- [00263] F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
- [00264] G236A/S239D/I332E
- [00265] K326A/E333A

- [00266] K326W/E333S
- [00267] K290E/S298G/T299A
- [00268] K290N/S298G/T299A
- [00269] K290E/S298G/T299A/K326E
- [00270] K290N/S298G/T299A/K326E
- [00271] Outras modalidades da invenção incluem anticorpos de ligação de antígeno, por exemplo, anticorpos, tendo uma Fc projetada para diminuir a função efetora. Moléculas Fc exemplares tendo função efetora aumentada incluem (com base no esquema de numeração de Kabat) aquelas que têm as seguintes substituições:
 - [00272] N297A (IgG1)
 - [00273] L234A/L235A (IgG1)
 - [00274] V234A/G237A (IgG2)
 - [00275] L235A/G237A/E318A (IgG4)
 - [00276] H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)
 - [00277] C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
 - [00278] C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)
 - [00279] L234F/L235E/P331S (IgG1)
 - [00280] S267E/L328F (IgG1)
- [00281] Outro método para aumentar a função efetora de proteínas contendo Fc de IgG é reduzindo a fucosilação da Fc. A remoção da fucose central dos oligossacarídeos tipo complexo biantenal ligados ao Fc aumentou significativamente a função efetora ADCC sem alterar a ligação de antígeno ou função efetora CDC. Vários métodos são conhecidos para reduzir ou abolir a fucosilação de moléculas contendo Fc, por exemplo, anticorpos. Estes incluem expressão recombinante em certas linhagens de células de mamíferos, incluindo uma linhagem celular nocaute FUT8, linhagem variante CHO Lec13, linhagem celular de hibridoma de rato YB2/0, uma linhagem celular compreendendo um pequeno RNA de interferência especificamente contra o gene FUT8, e uma linhagem celular co-

expressando β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III e Golgi α -mannosidase II. Alternativamente, a molécula que contém Fc pode ser expressa em uma célula não mamífero como uma célula vegetal, levedura, ou célula procariótica, por exemplo, *E. coli*. Assim, em certas modalidades da invenção, uma composição compreende um anticorpo, por exemplo, Ab1, Ab2, ou Ab3 tendo fucosilação reduzida ou desprovida de fucosilação por completo.

Composições Farmacêuticas

[00282] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou uma pluralidade das proteínas de ligação de antígeno da invenção juntamente com um diluente, carreador, solubilizante, emulsificante, conservante, e/ou adjuvante farmaceuticamente eficaz. Em certas modalidades, a proteína de ligação de antígeno é um anticorpo. Composições farmacêuticas da invenção incluem, entre outras, composições líquidas, congeladas e liofilizadas.

[00283] Preferencialmente, materiais de formulação são não tóxicos para destinatários nas dosagens e concentrações utilizadas. Em modalidades específicas, composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de ligação de antígeno OSMR, por exemplo, um anticorpo de ligação OSMR, são fornecidas.

[00284] Em certas modalidades, a composição farmacêutica pode conter materiais de formulação para modificar, manter ou conservar, por exemplo, o pH, osmolaridade, viscosidade, clareza, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou liberação, adsorção ou penetração da composição. Nessas modalidades, materiais de formulação adequados incluem, entre outros, aminoácidos (como glicina, glutamina, asparagina, arginina, prolina, ou lisina); antimicrobianos; antioxidantes (como ácido ascórbico, sulfito de sódio ou

hidrogeno-sulfito de sódio); tampões (como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos ou outros ácidos orgânicos); agentes espessantes (como manitol ou glicina); agentes quelantes (como ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA)); agentes de complexação (como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina ou hidroxipropil-beta-ciclodextrina); enchimentos; monossacarídeos; dissacarídeos; e outros carboidratos (como glicose, manose ou dextrinas); proteínas (como albumina do soro, gelatina ou imunoglobulinas); corantes, aromatizantes e agentes de diluição; agentes emulsionantes; polímeros hidrofílicos (como polivinilpirrolidona); polipeptídeos de baixo peso molecular; contraíons formadores de sais (como sódio); conservantes (como cloreto de benzalcônio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, álcool fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogênio); solventes (como glicerina, propileno glicol ou polietileno glicol); álcoois de açúcares (como manitol ou sorbitol); agentes de suspensão; tensoativos ou agentes molhantes (como pluronics, PEG, ésteres de sorbitano, polissorbatos, como polissorbato 20, polissorbato, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes de aumento de estabilidade (como sacarose ou sorbitol); agentes de aumento de tonicidade (como haletos de metais alcalinos, preferencialmente cloreto de sódio ou potássio, manitol, sorbitol); veículos de liberação; diluentes; excipientes e/ou adjuvantes farmacêuticos. Ver, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

[00285] Em certas modalidades, a composição farmacêutica ideal será determinada por um especialista na técnica dependendo, por exemplo, da via de administração pretendida, formato de liberação e dosagem desejada. Ver, por exemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *supra*. Em certas modalidades, essas composições podem influenciar o estado físico, estabilidade, taxa de liberação *in*

vivo e a taxa de depuração *in vivo* das proteínas de ligação de antígeno da invenção. Em certas modalidades, o principal veículo ou carreador em uma composição farmacêutica pode ser aquoso ou não aquoso na natureza. Por exemplo, um veículo ou carreador adequado pode ser água para injeção, solução salina fisiológica ou fluido cefalorraquidiano artificial, eventualmente complementado com outros materiais comuns em composições para administração parenteral. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina de soro são outros veículos exemplares. Em modalidades específicas, composições farmacêuticas compreendem tampão Tris de cerca de pH 7,0-8,5, ou tampão de acetato de cerca de pH 4,0-5,5, e podem ainda incluir sorbitol ou um substituto adequado. Em certas modalidades da invenção, composições da proteína de ligação de antígeno OSMR podem ser preparadas para armazenamento misturando a composição selecionada tendo o grau desejado de pureza com agentes de formulação opcionais (*REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra*), sob a forma de um bolo liofilizado ou uma solução aquosa. Além disso, em certas modalidades, o produto de proteína de ligação de antígeno OSMR pode ser formulado como um liofilizado usando excipientes apropriados como sacarose.

[00286] As composições farmacêuticas da invenção podem ser selecionadas para liberação parenteral. Alternativamente, as composições podem ser selecionadas para inalação ou para liberação através do trato digestivo, como oralmente. A preparação dessas composições farmaceuticamente está dentro da técnica. Os componentes de formulação estão presentes preferencialmente em concentrações que são aceitáveis para o local de administração. Em certas modalidades, tampões são usados para manter a composição no pH fisiológico, ou a um pH ligeiramente inferior, normalmente dentro de uma faixa de pH de cerca de 5 a cerca de 8.

[00287] Quando a administração parenteral é contemplada, as composições terapêuticas para uso nessa invenção podem ser fornecidas sob a forma de uma solução aquosa aceitável por via parenteral, livre de pirogênio compreendendo a proteína de ligação de antígeno OSMR em um veículo farmaceuticamente aceitável. Um veículo particularmente adequado para injeção parenteral é água destilada estéril na qual a proteína de ligação de antígeno OSMR é formulada como uma solução isotônica, estéril, devidamente conservada. Em certas modalidades, a preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com um agente, como microesferas injetáveis, partículas bi-erosíveis, compostos poliméricos (como o ácido polilático ou ácido poliglicólico), grânulos ou lipossomas, que podem fornecer liberação controlada ou sustentada do produto que pode ser liberado através de injeção de depósito. Em certas modalidades, ácido hialurônico pode também ser utilizado, tendo o efeito de promover duração sustentada na circulação. Em certas modalidades, dispositivos de liberação de fármaco implantáveis podem ser usados para introduzir a proteína de ligação de antígeno desejada.

[00288] Composições farmacêuticas da invenção podem ser formuladas para inalação. Nestas modalidades, proteínas de ligação de antígeno OSMR são vantajosamente formuladas como um pó inalável, seco. Em modalidades específicas, soluções de inalação de proteína de ligação de antígeno OSMR também podem ser formuladas com um propelente para liberação por aerossol. Em certas modalidades, soluções podem ser nebulizadas. A administração pulmonar e métodos para formular, portanto, ainda estão descritas em Pedido de Patente Internacional PCT/US94/001875, que está incorporado como referência e descreve liberação pulmonar de proteínas quimicamente modificadas.

[00289] Também é contemplado que formulações podem ser administradas por via oral. Proteínas de ligação de antígeno OSMR que

são administradas desta forma podem ser formulados com ou sem carreadores usualmente utilizados na composição de formas farmacêuticas sólidas, como comprimidos e cápsulas. Em certas modalidades, uma cápsula pode se destinar a liberar a porção ativa da formulação no ponto no trato gastrintestinal quando a biodisponibilidade é maximizada e degradação pré-sistêmica é minimizada. Agentes adicionais podem ser incluídos para facilitar a absorção de uma proteína de ligação de antígeno OSMR. Diluentes, aromatizantes, ceras de baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes de desintegração de comprimido, e aglutinantes também podem ser empregados.

[00290] Composições farmacêuticas adicionais serão evidentes para os especialistas na técnica, incluindo formulações envolvendo proteínas de ligação de antígeno OSMR em formulações de liberação sustentada ou controlada. Técnicas para a formulação de uma variedade de outras formas de liberação sustentada ou controlada, como carreadores de lipossomas, micropartículas bioerosíveis ou grânulos porosos e injeções de depósito, também são conhecidos por especialistas na técnica. Ver, por exemplo, Pedido de Patente Internacional No. PCT/US93/00829, que está incorporado como referência e descreve a liberação controlada de micropartículas poliméricas porosas para liberação das composições farmacêuticas. Preparações de liberação sustentada podem incluir matrizes de polímero semipermeáveis na forma de artigos moldados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Matrizes de liberação sustentada podem incluir poliésteres, hidrogéis, polilactactos (conforme descrito em Patente US 3.773.919 e Publicação de Pedido de Patente Europeu EP 058481, cada um dos quais está incorporado como referência), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater.

Res. 15:167-277 and Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), acetato de vinil de etileno (Langer et al., 1981, *supra*) ou ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Publicação de Pedido de Patente Europeu No. EP133988). Composições de liberação sustentada também podem incluir os lipossomas que podem ser preparados por qualquer um dos vários métodos conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; Publicação de Pedido de Patente Europeu EP 036.676; EP 088.046 e EP 143.949, incorporado como referência.

[00291] Composições farmacêuticas usadas para administração *in vivo* normalmente são fornecidas como preparações estéreis. A esterilização pode ser facilmente realizada por filtração através de membranas de filtração estéril. Quando a composição é liofilizada, a esterilização usando este método pode ser realizada antes ou após a liofilização e reconstituição. Composições para a administração parenteral podem ser armazenadas em forma liofilizada ou em uma solução. Composições parenterais geralmente são colocadas em um recipiente tendo uma porta de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa tendo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[00292] Aspectos da invenção incluem formulações de proteína de ligação de antígeno OSMR, que podem ser usadas como composições farmacêuticas, conforme descrito em Pedido de Patente Internacional WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599), que é incorporado como referência em sua totalidade aqui.

[00293] Como discutido acima, certas modalidades fornecem composições de proteína de ligação de antígeno OSMR, particularmente composições de proteína de ligação de antígeno OSMR farmacêuticas que compreendem, além de uma proteína de ligação de antígeno OSMR, um ou mais excipientes como ilustrativamente descrito

nesta seção e em outros lugares aqui. Excipientes podem ser usados na invenção neste aspecto para uma grande variedade de efeitos, como ajuste de propriedades físicas, químicas ou biológicas de formulações, como ajuste de viscosidade, e/ou processos da invenção para melhorar a eficácia e/ou para estabilizar essas formulações e processos contra a degradação e deterioração devido a, por exemplo, estresses que ocorrem durante a fabricação, transporte, armazenamento, preparação antes da utilização, administração e daí em diante.

[00294] Uma variedade de exposições estão disponíveis na estabilização de proteínas e materiais de formulação e métodos úteis a este respeito, como Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," em: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), e Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), cada um dos quais é aqui incorporado como referência em sua totalidade, particularmente nas partes pertinentes para excipientes e processos do mesmo para formulações de proteínas de autotamponamento em conformidade com a presente invenção, especialmente quanto aos produtos e processos farmacêuticos de proteína para uso médico veterinário e/ou humano.

[00295] Sais podem ser utilizados de acordo com certas modalidades da invenção para, por exemplo, ajustar a força iônica e/ou o isotonicidade de uma formulação e/ou para melhorar a solubilidade e/ou estabilidade física de uma proteína ou outro ingrediente de uma composição de acordo com a invenção.

[00296] Sabe-se que, íons podem estabilizar o estado nativo de proteínas se ligando a resíduos carregados na superfície da proteína e blindando grupos carregados e polares na proteína e reduzindo a força

de suas interações eletrostáticas, interações atrativas e repulsivas. Íons também podem estabilizar o estado desnaturado de uma proteína por ligação para, nomeadamente, as ligações peptídicas desnaturadas (-CONH) da proteína. Além disso, interação iônica com grupos polares e carregados em uma proteína também pode reduzir interações intermoleculares eletrostáticas e, desse modo, evitar ou reduzir insolubilidade e agregação de proteínas.

[00297] Espécies iônicas diferem significativamente em seus efeitos sobre as proteínas. Várias classificações categóricas dos íons e seus efeitos sobre as proteínas foram desenvolvidas que podem ser usadas na formulação de composições farmacêuticas em conformidade com a invenção. Um exemplo é a série de Hofmeister, que classifica solutos iônicos e não iônicos polares por seus efeitos sobre a estabilidade conformacional de proteínas em solução. Solutos de estabilização são referidos como "cosmotrópicos." Solutos de desestabilização são referidos como "caotrópicos." Cosmotropos são comumente usados em concentrações elevadas (por exemplo, >1 molar sulfato de amônio) para precipitar proteínas de solução ("salting-out"). Caotropos são usados comumente para desnaturar e/ou solubilizar proteínas ("salting-in"). A eficácia relativa de íons para "salt-in" e "salt-out" define a sua posição na série de Hofmeister.

[00298] Aminoácidos livres podem ser usados em formulações de proteína de ligação de antígeno OSMR em conformidade com as várias modalidades da invenção como agentes de volume, estabilizantes e antioxidantes, bem como outros usos padrão. Lisina, prolina, serina, e alanina podem ser usados para estabilização de proteínas em uma formulação. A glicina é útil em liofilização para garantir estrutura de bolo e propriedades corretas. A arginina pode ser útil para inibir a agregação de proteína, em formulações líquidas e liofilizadas. Metionina é útil como um antioxidante.

[00299] Polióis incluem açúcares, por exemplo, manitol, sacarose e sorbitol e álcoois poli-hídricos, como, por exemplo, glicerol e propilenoglicol, e, para fins de discussão aqui, polietileno glicol (PEG) e substâncias relacionadas. Os polióis são cosmotrópicos. São agentes de estabilização úteis em formulações líquidas e liofilizadas para proteger proteínas de processos de degradação física e química. Polióis também são úteis para ajustar a tonicidade das formulações.

[00300] Entre polióis úteis em modalidades selecionadas da invenção está o manitol, comumente usado para garantir a estabilidade estrutural do bolo em formulações liofilizadas. O mesmo garante a estabilidade estrutural para o bolo. Geralmente é usado com um lioprotetor, por exemplo, sacarose. Sorbitol e sacarose estão entre os agentes preferenciais para ajustar a tonicidade e como estabilizadores para proteger contra estresses de congelamento-descongelamento durante o transporte ou a preparação de granéis durante o processo de fabricação. Açúcares redutores (que contêm grupos aldeído ou cetona livres), como a glicose e lactose, podem glicar resíduos de lisina e arginina de superfície. Portanto, geralmente não estão entre polióis preferenciais para uso em conformidade com a invenção. Além disso, açúcares que formam essas espécies reativas, como a sacarose, que é hidrolisada para frutose e glicose sob condições ácidas e, consequentemente, geram a glicação, também não estão entre os polióis preferenciais da invenção a este respeito. PEG é útil para estabilizar proteínas e como um crioprotetor e pode ser usado na invenção a este respeito.

[00301] Modalidades de formulações de uma proteína de ligação de antígeno OSMR ainda compreendem tensoativos. Moléculas de proteína podem ser suscetíveis à adsorção em superfícies e à desnaturação e consequente agregação nas interfaces ar-líquido, sólido-líquido, e líquido-líquido. Estes efeitos geralmente escalam inversa-

mente com a concentração de proteína. Estas interações deletérias geralmente escalam inversamente com a concentração de proteína e normalmente são exacerbadas pela agitação física, como a gerada durante o transporte e manuseio de um produto.

[00302] Tensoativos rotineiramente são utilizados para prevenir, minimizar, ou reduzir a adsorção de superfície. Tensoativos úteis na invenção a este respeito incluem polissorbato 20, polissorbato 80, outros ésteres de ácidos graxos de polietoxilatos de sorbitano, e poloxâmero 188.

[00303] Tensoativos também são comumente usados para controlar a estabilidade conformacional de proteínas. O uso de tensoativos a este respeito é específico de proteínas, uma vez que, qualquer dado tensoativo normalmente irá estabilizar algumas proteínas e desestabilizar outras.

[00304] Polissorbatos são suscetíveis à degradação oxidativa e, muitas vezes, como fornecidos, contêm quantidades suficientes de peróxidos para causar a oxidação de cadeias laterais de resíduos de proteínas, especialmente metionina. Por conseguinte, polissorbatos devem ser usados com cuidado e, quando usados, devem ser empregados em suas menores concentrações eficazes. A este respeito, polissorbatos exemplificam a regra geral que excipientes devem ser usados nas suas menores concentrações eficazes.

[00305] Modalidades de formulações de proteína de ligação de antígeno OSMR ainda compreendem um ou mais antioxidantes. Em certa medida, a oxidação deletéria de proteínas pode ser prevenida em formulações farmacêuticas mantendo níveis apropriados de oxigênio ambiente e temperatura e evitando a exposição à luz. Excipientes antioxidantes podem ser usados também para prevenir a degradação oxidativa de proteínas. Entre os antioxidantes úteis a este respeito estão agentes redutores, catadores de oxigênio/radical livre e agentes

quelantes. Antioxidantes para uso em formulações de proteínas terapêuticas em conformidade com a invenção preferencialmente são solúveis em água e mantêm suas atividades em toda a vida de prateleira de um produto. EDTA é um antioxidante preferencial em conformidade com a invenção a ente respeito.

[00306] Antioxidantes podem danificar as proteínas. Por exemplo, agentes redutores, como glutationa em particular, podem interromper as ligações dissulfeto intramoleculares. Assim, os antioxidantes para uso na invenção são selecionados para, entre outras coisas, eliminar ou reduzir suficientemente a possibilidade dos próprios danificarem proteínas na formulação.

[00307] Formulações de acordo com a invenção podem incluir íons metálicos que são cofatores de proteína e que são necessários para formar complexos de coordenação de proteína, como o zinco necessário para formar certas suspensões de insulina. Íons metálicos também podem inibir alguns processos que degradam proteínas. No entanto, íons metálicos também catalisam processos físicos e químicos que degradam proteínas.

[00308] Íons de magnésio (10-120 mM) podem ser usados para inibir a isomerização do ácido aspártico para ácido isoaspártico. Íons Ca^{+2} (até 100 mM) podem aumentar a estabilidade da desoxirribonuclease humana. Mg^{+2} , Mn^{+2} , e Zn^{+2} , no entanto, pode desestabilizar rhDNase. Da mesma forma, Ca^{+2} e Sr^{+2} pode estabilizar o Fator VIII, pode ser desestabilizado por Mg^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2} , Cu^{+2} e Fe^{+2} , e sua agregação podem ser aumentada por íons Al^{+3} .

[00309] Modalidades de formulações de uma proteína de ligação de antígeno OSMR ainda compreendem um ou mais conservantes. Conservantes são necessários para desenvolvimento de formulações parenterais de doses múltiplas que envolvem mais de uma extração do mesmo recipiente. Sua principal função é inibir o crescimento microbi-

ano e assegurar a esterilidade do produto durante toda a vida de prateleira ou termo de uso do produto de fármaco. Conservantes comumente usados incluem álcool benzílico, fenol e m-cresol. Embora conservantes tenham uma longa história de uso com parenterais de pequena molécula, o desenvolvimento de formulações de proteína que inclui conservantes pode ser desafiador. Conservantes quase sempre têm um efeito desestabilizante (agregação) de proteínas, e isso se tornou um fator importante em limitar seu uso em formulações de proteína de doses múltiplas. Até à data, a maioria dos fármacos de proteína foram formuladas para uso único apenas. No entanto, quando formulações de doses múltiplas são possíveis, as mesmas têm a vantagem adicional de permitir a conveniência do paciente, e aumentar a possibilidade de comercialização. Um bom exemplo é o hormônio do crescimento humano (hGH) onde o desenvolvimento de formulações conservadas levou à comercialização de apresentações de caneta de injeção multiuso mais conveniente. Pelo menos quatro desses dispositivos de caneta que contém formulações conservadas de hGH estão atualmente disponíveis no mercado. Norditropin (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ (líquido, Genentech) & Genotropin (lioofilizado—cartucho de câmara dupla, Pharmacia & Upjohn) contém fenol com Somatropose (Eli Lilly) é formulado com m-cresol.

[00310] Vários aspectos precisam ser considerados durante a formulação e desenvolvimento de formas farmacêuticas conservadas. A concentração de conservante eficaz do produto de fármaco deve ser otimizado. Isto requer testes de conservantes fornecidos sob a forma farmacêutica com faixas de concentração que conferem eficácia antimicrobiana sem comprometer a estabilidade da proteína.

[00311] Como seria de esperar, o desenvolvimento de formulações líquidas contendo conservantes é mais desafiador do que para formulações liofilizadas. Produtos liofilizados podem ser liofilizados

sem conservante e reconstituídos com conservante contendo diluente no momento do uso. Isto diminui o tempo para o qual um conservante está em contato com a proteína, minimizando significativamente os riscos associados à estabilidade. Com formulações líquidas, a eficácia conservante e estabilidade devem ser mantidas durante o tempo de prateleira total do produto (cerca de 18 a 24 meses). Um ponto importante a observar é que a eficácia do conservante deve ser demonstrada na formulação final contendo o fármaco ativo e todos os componentes de excipiente.

[00312] Formulações de proteína de ligação de antígeno OSMR geralmente serão projetadas para vias e métodos de administração específicos, para dosagens de administração e frequências de administração específicas, para tratamentos específicos de doenças específicas, com faixas de biodisponibilidade e persistência, entre outras coisas. As formulações, portanto, podem ser projetadas de acordo com a invenção para liberação por qualquer via apropriada, incluindo, entre outras, por via oral, auricular, oftálmica, retal, e vaginal e por vias parenterais, incluindo injeção intravenosa e intra-arterial, injeção intramuscular e injeção subcutânea.

[00313] Uma vez que a composição farmacêutica foi formulada, a mesma pode ser armazenada em frascos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido, cristal, ou como um pó desidratado ou liofilizado. Essas formulações podem ser armazenadas em uma forma pronta para uso ou em uma forma (por exemplo, liofilizada) que é reconstituída antes da administração. A invenção também fornece kits para produzir uma unidade de administração de dose única. Os kits da invenção podem cada um conter um primeiro recipiente tendo uma proteína seca e um segundo recipiente tendo uma formulação aquosa. Em certas modalidades desta invenção, kits contendo seringas pré-cheia únicas e com várias câmaras (por exemplo, seringas de

líquido e liosseringas) são fornecidos.

[00314] A quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica contendo proteína de ligação de antígeno OSMR a ser empregada dependerá, por exemplo, do contexto terapêutico e objetivos. Um especialista na técnica irá apreciar que os níveis de dosagem apropriados para tratamento irão variar dependendo, em parte, da molécula liberada, as indicações para as quais a proteína de ligação de antígeno OSMR está sendo usada, a via de administração, e o tamanho (peso corporal, superfície do corpo ou tamanho do órgão) e/ou condição (a idade e saúde geral) do paciente. Em certas modalidades, os clínicos podem titular a dosagem e modificar a via de administração para obter o melhor efeito terapêutico. Uma dose típica pode variar de cerca de 0,1 µg/kg a cerca de 30 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores acima mencionados. Em modalidades específicas, a dosagem pode variar de 1,0 µg/kg, até cerca de 20 mg/kg, opcionalmente, de 10 µg/kg até cerca de 10 mg/kg ou de 100 µg/kg até cerca de 5 mg/kg.

[00315] Uma quantidade terapêutica eficaz de uma proteína de ligação de antígeno OSMR preferencialmente resulta em uma diminuição na gravidade dos sintomas da doença, em um aumento da frequência ou duração dos períodos sem sintomas de doença, ou em uma prevenção de deficiência ou incapacidade devido à aflição da doença.

[00316] Composições farmacêuticas podem ser administradas usando um dispositivo médico. Exemplos de dispositivos médicos para administrar composições farmacêuticas são descritos em Patente US 4.475.196; 4.439.196; 4.447.224; 4.447, 233; 4.486.194; 4.487.603; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 5.064.413; 5.312.335; 5.312.335; 5.383.851; e 5.399.163, todos incorporados como referência aqui.

[00317] Métodos para Diagnósticas ou Tratar uma Doença ou Dis-

túrbio Associado a OSMR

[00318] As proteínas de ligação de antígeno OSMR da invenção são particularmente úteis para detectar OSMR em uma amostra biológica. Em certas modalidades, uma amostra biológica obtida de um paciente é contatada com a proteína de ligação de antígeno OSMR. A ligação de uma proteína de ligação de antígeno OSMR para OSMR é então detectada para determinar a presença ou a quantidade relativa de OSMR na amostra. Esses métodos podem ser úteis no diagnóstico ou determinação de pacientes que são passíveis de tratamento com uma proteína de ligação de antígeno OSMR.

[00319] Em certas modalidades, uma proteína de ligação de antígeno OSMR da invenção é usada para diagnosticar, detectar, ou tratar um distúrbio autoimune, distúrbio inflamatório, ou distúrbio associado com deposição de matriz extracelular ou remodelação.

[00320] No tratamento desses distúrbios, a proteína de ligação de antígeno OSMR pode ser direcionada para células que expressam OSMR do sistema imune para a destruição e/ou pode bloquear a interação de OSMR com OSM e/ou IL-31.

[00321] Doenças ou distúrbios que estão associados com sinalização mediada por OSMR são particularmente passíveis de tratamento com uma ou mais proteínas de ligação de antígeno OSMR descritas aqui. Esses distúrbios incluem, entre outros, inflamação, dor, prurido, prurigo nodular, dermatite, asma, doença autoimune, doenças autoimunes paraneoplásicas, inflamação de cartilagem, fibrose (incluindo, entre outros, fibrose pulmonar e fibrose de pele), doenças fibróticas, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), pneumonite intersticial, deposição de colágeno anormal, amiloidose cutânea sistêmica, amiloidose cutânea primária, doença de Behcet, pólipos nasais, cirrose hepática, degradação da cartilagem, degradação de osso, artrite, artrite reumatoide, artrite juvenil, artrite reumatoide juvenil, artrite reumatoide

juvenil pauciarticular, artrite reumatoide juvenil poliarticular, artrite reumatoide sistêmica juvenil, espondilite anquilosante juvenil, artrite enteropática juvenil, artrite reativa juvenil, síndrome de Reter juvenil, síndrome SEA (Síndrome Artropatia Entesopatia, Seronegatividade), dermatomiosite juvenil, artrite psoriática juvenil, esclerodermia juvenil, lúpus eritematoso sistêmico juvenil, vasculite juvenil, artrite reumatoide pauciarticular, artrite reumatoide poliarticular, artrite reumatoide sistêmica, espondilite anquilosante, artrite enteropática, artrite reativa, síndrome de Reter, síndrome SEA (Síndrome Artropatia Entesopatia, Seronegatividade), dermatomiosite, artrite psoriática, esclerodermia, doença pulmonar intersticial associada a esclerodermia, vasculite, miolite, polimiolite, dermatomiolite, poliarterite nodossa, granulomatose de Wegener, arterite, ploimialgia reumática, sarcoidose, esclerodermia, esclerose, esclerose biliar primária, colangite esclerosante, síndrome de Sjogren, psoríase, psoríase em placas, psoríase gutata, psoríase inversa, psoríase pustulosa, psoríase eritrodérmica, dermatite, dermatite atópica, aterosclerose, lúpus, doença de Still, Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE), miastenia gravis, doença inflamatória intestinal (IBD), doença de Crohn, colite ulcerativa, doença celíaca, esclerose múltipla (MS), asma, DPOC, rinossinusite, rinossinusite com pólipos, esofagite eosinofílica, bronquite eosinofílica, bronquite, doença de Guillain-Barré, diabetes mellitus tipo I, tireoidite (por exemplo, doença de Graves), doença de Addison, fenômeno de Reynaud, hepatite autoimune, GVHD, rejeição de transplante, dano renal, doença cardiovascular, infecção, sepse, infecção pelo HIV, trauma, nefropatia de aloenxerto renal, nefropatia de IgA, nefropatia diabética, retinopatia diabética, degeneração macular, atresia biliar, insuficiência cardíaca, aterosclerose, reestenose, fibrose induzida por radiação, fibrose induzida por quimioterapia, queimaduras, trauma cirúrgico, glomeruloesclerose e afins.

[00322] Em modalidades particularmente preferenciais, o distúrbio

autoimune, distúrbio inflamatório, ou distúrbio associado com deposição de matriz extracelular ou remodelação é fibrose, degradação da cartilagem, artrite, artrite reumatoide, esclerodermia, doença pulmonar intersticial associada à esclerodermia, fibrose pulmonar idiopática, cirrose, psoríase, dermatite atópica, amiloidose cutânea sistêmica, amiloidose cutânea primária, inflamação, inflamação pruriginosa, prurigo nodular, e dor.

[00323] Em certas modalidades, uma proteína de ligação de antígeno OSMR da invenção é usada para diagnosticar, detectar, ou tratar um câncer ou distúrbio tumorigênico. No tratamento de um câncer ou distúrbio tumorigênico, a proteína de ligação de antígeno OSMR pode se direcionar para células que expressam OSMR para destruição e/ou pode bloquear a interação de OSM e/ou IL-31 com OSMR, reduzindo sinalização mediada por OSMR. Está previsto que proteínas de ligação de antígeno OSMR que bloqueiam sinalização mediada por OSM e/ou IL 31 seria útil na promoção da melhoria de sobrevivência em pacientes com câncer. Câncer ou distúrbios tumorigênicos que podem ser diagnosticados, detectados ou tratados com uma proteína de ligação de antígeno OSMR incluem, entre outros, tumores sólidos geralmente, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de mama, câncer de próstata, câncer endometrial, câncer renal, câncer de esôfago, câncer de pâncreas, carcinoma de células escamosas, melanoma uveal, câncer cervical, câncer colorretal, câncer de bexiga, cérebro, do pâncreas, cabeça, pescoço, fígado, leucemia, linfoma e doença de Hodgkin, mieloma múltiplo, melanoma, câncer gástrico, câncer astrocítico, de estômago e adenocarcinoma pulmonar.

[00324] As proteínas de ligação de antígeno podem ser usadas para inibir o crescimento, progressão e/ou metástase do tumor. Essa inibição pode ser monitorada usando vários métodos. Por exemplo, a inibição pode resultar no tamanho do tumor reduzido e/ou uma dimi-

nuição da atividade metabólica dentro de um tumor. Ambos os parâmetros podem ser medidos por exames MRI ou PET, por exemplo. A inibição também pode ser monitorada por biópsia para verificar o nível de necrose, morte de células do tumor, e o nível da vascularização dentro do tumor. A extensão da metástase pode ser monitorada usando métodos conhecidos.

[00325] O uso de qualquer e todos os exemplos, ou linguagem exemplar (por exemplo, "como"), aqui apresentada, destina-se apenas para melhor iluminar modalidades da invenção e não representa uma limitação no escopo da invenção, salvo se reivindicado o contrário. Nenhuma linguagem na especificação deve ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial para a prática da invenção.

EXEMPLOS

[00326] Os exemplos a seguir, tanto reais quanto proféticos, são fornecidos para ilustrar as modalidades ou características específicas da presente invenção e não limitar o seu escopo.

EXEMPLO 1: Produção de Anticorpos Anti-OSMR Usando a Plataforma XENOMOUSE®

[00327] Anticorpos totalmente humanos direcionados contra OSMR humano foram gerados utilizando a tecnologia XENOMOUSE® (conforme descrito em Patente dos Estados Unidos Nos. 6.114.598; 6.162.963; 6.833.268; 7.049.426; 7.064.244, que são incorporadas aqui como referência em suas totalidade; e em Green *et al.*, *Nature Genetics* 7:13-21, 1994; Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15:146-56; 1997; Green *et al.*, *J. Ex. Med.* 188:483-95, 1998; e Kellermann *et al.*, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:593–7, 2002).

[00328] Para produzir anticorpos para OSMR, duas diferentes cepas de animais XENOMOUSE®, ou seja, camundongos XMG2-KL e XMG4-KL, foram imunizados com proteínas solúveis OSMR-Fc huma-

nas (preparadas por Amgen, Seattle, WA). Uma quantidade adequada de imunógeno (ou seja, 10 µg/camundongo de proteína OSMR-Fc humana solúvel) foi usada para a imunização inicial dos animais XENOMOUSE® de acordo com os métodos descritos em Pedido de Patente US de Série 08/759.620, depositado em 3 de dezembro de 1996 e Pedido de Patente Internacional Nos. WO 98/24893, publicado em 11 de junho de 1998 e WO 00/76310, publicado em 21 de dezembro de 2000, cujas divulgações são incorporadas aqui como referência. Após a imunização inicial, imunizações de reforço subsequentes de imunógeno (cinco µg/camundongo de proteína OSMR-Fc humana solúvel) foram administradas em um cronograma e pela duração necessária para induzir um título adequado de anticorpo anti-OSMR nos camundongos.

[00329] Os soros foram coletados em aproximadamente quatro semanas após a primeira injeção e títulos específicos foram determinados por ELISA. O protocolo usado para titulares os animais XENOMOUSE® foi o seguinte: Placas de ligação de meio Costar 3368 foram revestidas com neutravidina @ 8µg/mL (50 µl/poço) e incubadas a 4°C em 1XPBS/0,05% azida durante a noite. As placas foram lavadas usando ciclo de lavagem TiterTek 3 com água RO. As placas foram bloqueadas usando 250 µL de 1XPBS/1%leite e incubadas por pelo menos 30 minutos em RT. O bloqueio foi lavado usando ciclo de lavagem TiterTek 3 com água RO. Capturou-se huOSMR-FNFH biotinilado (preparado por Amgen, Seattle, WA) em 2 µg/mL em 1XPBS/1%leite/10mM Ca²⁺ (ensaio diluente) 50 µl/poço e incubado por 1hr em RT. As placas foram lavadas usando ciclo de lavagem TiterTek 3 com água RO. Para o anticorpo primário, soros foram tituladas 1:3 em duplicata de 1:100. Isso foi feito no ensaio diluente 50 µl/poço e incubado por 1hr em RT. As placas foram lavadas usando ciclo de lavagem TiterTek 3 com água RO. O anticorpo secundário foi IgG Fc HRP anti humana de cabra @ 400 ng/mL em ensaio diluente

em 50 µL/poço. Isto foi incubado por 1hr em RT. Isto foi então lavado usando ciclo de lavagem TiterTek 3 com água RO e seco sobre papel-toalha. Para o substrato, solução TMB de uma etapa (Neogen, Lexington, Kentucky) foi usado (50 µL/poço) e o substrato foi autorizado a desenvolver por 30 min em RT.

[00330] Animais apresentando títulos adequados foram identificados. Cinco animais XMG2KL foram identificados com uma resposta imune de IgG específica para OSMR. Baços e gânglios linfáticos drenados foram coletados a partir desses animais e combinados para a geração de hibridomas. Cinco animais XMG4KL com respostas imunes específicas foram da mesma foram coletados e avançados como uma campanha de triagem de fusão separada. Células B enriquecidas de animais imunes foram fundidas para células P3 x 63Ag8.653 de mieloma não secretora ((American Type Culture Collection CRL-1580; Kearney et al, *J. Immunol.* 123: 1548-50, 1979) para gerar os hibridomas usando técnicas padrão (Kohler et al., *Nature* 256, 495-7, 1975).

[00331] Hibridomas foram então plaqueados em alta densidade (vários clones de hibridoma diferentes por poço) em placas de 96 poços de cultura de tecidos e crescidos durante quatro semanas. Sobre nadantes de linhagem de hibridoma foram triados para OSMR inteiro de humano e cynomolgus expresso em células 293T transfectadas transitoriamente por Tecnologia de Ensaio de Microvolume Fluorométrica (FMAT) (Applied Biosystems, Foster City, CA). Brevemente, em placas FMAT de 384 poços, 40 µL mistura de 3.000 células transfectadas OSMR 293T e 15.000 células parentais 293T foram combinadas com 15 µL do sobrendante de hibridoma e 10 µL anticorpo secundário marcado de cadeia leve anti-humana (hukappa/hulambda) Alexa647 (Invitrogen, Carlsbad, CA) (1,0 µg /mL concentração final). As placas foram então incubadas durante três horas em temperatura ambiente e fluorescência foi lida usando o leitor FMAT. Estas triagens

identificaram 885 linhagens de hibridoma que se ligam ao OSMR humano e cynomologous.

EXEMPLO 2: Ensaios de Bloqueio de OSMR Humanos

[00332] A capacidade de anticorpos OSMR de bloquear a sinalização através de OSMR humano foi determinada utilizando dois ensaios com oncostatina M humano (OSM) ou interleucina humana 31 (IL-31) como ligante. Em combinação, os ensaios foram usados para determinar se os anticorpos podem inibir a sinalização de OSMR desencadeada através da ligação de OSM e/ou IL-31.

[00333] Na primeira triagem, anticorpos foram avaliados para sua capacidade de bloquear a sinalização de OSM através de OSMR. A estimulação dos fibroblastos de pulmão humano normal primária com OSM induz a fosforilação de STAT3 e sua translocação subsequente para o núcleo. As células foram propagadas em 3000 células por poço em placas Costar de 384 poços e poderão aderir durante a noite. As células foram pré-tratadas com sobrenadantes de anticorpo por vinte minutos, e então estimuladas com 80 pM OSM humano por 30 minutos. As células foram então lavadas 3X em PBS, fixadas com uma solução 3,5 % formaldeído, lavadas (3X em PBST) e permeabilizadas com uma solução 0,5% Triton X-100. As células foram então coradas com um anticorpo anti-fosfoSTAT3 por uma hora, lavadas e coradas com um anticorpo conjugado AlexaFluor (todos contidos dentro do HitKit de Cellomics). As placas foram cobertas e lidas sobre o instrumento ArrayScan usando o algoritmo proprietário Cellomics para gerar um valor de Intensidade Nuclear e um Valor de Intensidade Citoplasmática. Os resultados foram relatados como a diferença entre esses dois valores, e ainda foram normalizados para controlar dados contendo células maximamente estimuladas e células tratadas com meio (POC).

[00334] No segundo ensaio, anticorpos foram avaliados pelas suas capacidades de inibir um sinal proliferativo de IL-31 através de

OSMR em uma linhagem de células estável que superexpressava IL-31RA4 e OSMR humano. Células BaF3 foram estavelmente transfeccadas com dois plasmídeos: pcDNA3.1 + huOSMRb (NeoR) e pcDNA3.1 + huIL31RA4 (ZeoR). Na ausência de IL-3 murina, esta linhagem de células só é capaz de proliferar em resposta a IL-31 humana e, portanto, pode ser usada para avaliar especificamente a capacidade de bloqueio de anticorpos anti-OSMR. Células BaF3 foram plaqueadas em placas de 96 poços com uma densidade de 20.000 células por poço. Anticorpos e ligantes (huIL-31, Peprotech) foram adicionados aos poços para um volume final de 100 µL, e as placas foram incubadas por 72 horas em câmara umidificada com 5% CO₂, 37C. Após incubação, 20 µL de Alamar Blue foram adicionados a cada poço e placas foram retornadas para a incubadora. As placas foram lidas em um leitor de placa Molecular Devices Vmax (570-600 nm) em vários pontos de tempo após adição de Alamar Blue.

[00335] Os resultados dos dois ensaios são apresentados na Tabela 4 abaixo. Mais de 3000 sobrenadantes de hibridoma foram triados para a capacidade de bloqueio nestes dois ensaios; os 200 melhores bloqueadores foram ainda testados em uma titulação de 4 pontos, com 14 sendo escolhidas para a produção de proteínas recombinantes e outros testes. O IC₅₀ para três anticorpos exemplares (anticorpos 1-3) é mostrado para ambos os ensaios. Alguns anticorpos inibiram translocação de STAT3 induzida por OSM mais completamente do que inibiram a proliferação induzida por IL-31, e vice-versa. Todos os três anticorpos, no entanto, foram potentes inibidores da sinalização mediada por OSM e IL-31.

Tabela 4

IC ₅₀	Ab1	Ab2	Ab3
OSM	157 pM	252 pM	1,35 nM
IL-31	35,2 pM	27,6 pM	780 pM

EXEMPLO 3: Ensaios de Bloqueio de OSMR de Cynomolgus

[00336] A capacidade de anticorpos OSMR de bloquear a sinalização através de OSMR de cynomolgus foi explorada utilizando dois ensaios com OSM humano ou IL-31 humana como ligante.

[00337] Na primeira triagem, anticorpos foram avaliados por suas capacidades de bloquear a sinalização de OSM através de OSMR de cynomolgus usando uma linhagem de célula epitelial renal primária. A estimulação dessas células com OSM de cynomolgus (cyno) induz a fosforilação de STAT3 e sua subsequente translocação para o núcleo. As células foram propagadas em 3000 células por poço em placas Costar de 384 poços e poderão aderir durante a noite. As células foram pré-tratadas com sobrenadantes de anticorpo por vinte minutos, e então estimuladas com 80 pM cyno OSM por 30 minutos. As células foram então lavadas 3X em PBS, fixadas com uma solução 3,5 % formaldeído, lavadas (3X em PBST) e permeabilizadas com uma solução 0,5% Triton X-100. As células foram então coradas com um anticorpo anti-fosfoSTAT3 por uma hora, lavadas e coradas com um anticorpo conjugado AlexaFluor (todos contidos dentro do HitKit de Cellomics). As placas foram cobertas e lidas sobre o instrumento ArrayScan usando o algoritmo proprietário Cellomics para gerar um valor de Intensidade Nuclear e um Valor de Intensidade Citoplasmática. Os resultados foram relatados como a diferença entre esses dois valores, e ainda foram normalizados para controlar dados contendo células maximamente estimuladas e células tratadas com meio (POC).

[00338] No segundo ensaio, anticorpos foram avaliados pelas suas capacidades de inibir um sinal proliferativo de IL-31 através de OSMR de cynomolgus em uma linhagem de células estável que superexpressava cyno IL-31RA e OSMR. De forma semelhante ao Exemplo 2, células BaF3 foram plaqueadas em placas de 96 poços com uma densidade de 20.000 células por poço. Anticorpos e ligantes (cynomol-

Igus IL-31, interno, ou seja, Amgen, Seattle, WA) foram adicionados aos poços para um volume final de 100 µL, e as placas foram incubadas por 72 horas em câmara umidificado com 5% CO₂, 37C. Após incubação, 20 µL de Alamar Blue foram adicionados a cada poço e placas foram retornadas para a incubadora. As placas foram lidas em um leitor de placa Molecular Devices Vmax (570-600 nm) em vários pontos de tempo após adição de Alamar Blue.

[00339] Os resultados dos dois ensaios são apresentados na Tabela 5 abaixo com o IC₅₀ para cada anticorpo mostrado para ambos os ensaios. Os resultados confirmam que cada um dos anticorpos 1, 2, e 3 são potentes inibidores de sinalização mediada por OSM e IL-31.

Tabela 5

IC ₅₀	Ab1	Ab2	Ab3
OSM	1,26 nM	518 pM	1,24 nM
IL-31	225 pM	29,3 pM	6,87 nM

EXEMPLO 4: Classificação de Epítopo de Anticorpos Anti-OSMR

[00340] Estudos de competição de anticorpo foram realizados para caracterizar os epítopos dos anticorpos xenomouse anti-OSMR. Os anticorpos que competem uns com os outros podem ser imaginados como se ligando ao mesmo sítio no alvo. Nesses experimentos, OSMR ou anticorpos irrelevantes foram capturados em grânulos Luminex revestidos por estreptavidina pré-ligados a um anticorpo de captura (anticorpo Fc IgG anti-humano de camundongo monovalente biotinilado). Antígeno OSMR ou tampão (sem antígeno) foram adicionados aos poços, e um anticorpo de sonda foi adicionado para cada poço e detectado com um anticorpo Fc IgG anti-humano de camundongo monovalente marcado com PE. A intensidade de fluorescência média de cada poço foi medida. Para uma referência completa, ver Jia et al, J. Immunol. Methods 288: 91-8, 2004. A detecção de fluorescência em um dado poço indicou que o anticorpo de sonda foi capaz de se ligar a

OSMR, mesmo na presença de outros anticorpos OSMR, demonstrando que os mesmos estão se ligando para epítopos separados. Um mínimo de três classificações foram encontradas como mostrado na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6

Classificação 1	Ab4
Classificação 2	Ab1, Ab2, Ab3, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab12, e Ab13
Classificação 3	Ab14

EXEMPLO 5: Determinação de Afinidade de Anticorpos Anti-OSMR

[00341] As afinidades de anticorpos anti-OSMR foram determinadas. Determinações de constante de taxa cinética foram realizadas para investigar a interação de anticorpos 1-3 (Abs 1-3) para OSMR humano.

[00342] A análise de biossensor foi realizada a 25°C em um sistema de tampão HBS-EP+ (1X) (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,0 mM EDTA, 0,05% Tensoativo P20) usando um biosensor óptico Biacore 3000 equipado com um chip de sensor CM5. Todos os reagentes foram mantidos a 8°C antes da injeção. IgG anti-humana de cabra (Jackson ImmunoResearch, #109-005-098) foi imobilizado (~3000 RU) para o chip de sensor através do acoplamento de amina padrão para Células de Fluxo 1 e 2 e então bloqueada com etanolamina. hOSMR.FH foi preparado em tampão de corrida a 150 nM e diluído 3 vezes para 0,617 nM. Anticorpos 1-3 foram diluídos (0,25 a 0,5 µg/mL) em tampão de corrida. Os anticorpos foram injetados (15 µl) em Célula de Fluxo 2 em uma taxa de fluxo de 10 µL/min. Cerca de 50 RU do antícorpo foi capturado. A superfície foi permitida para estabilizar (90 s) e então cada concentração (150, 50,0, 16,7, 5,56, 1,85 e 0,617) de hOSMR foi passada por Células de Fluxo 1 e 2 a uma taxa de fluxo de 50 µL/min para observar a associação (5 min) e dissociação (5 min). As amostras foram corridas em duplicita e em ordem aleatória.

[00343] Branco de analito de tampão (0 nM hOSMR) foram injetados antes, no meio, e após as injeções da amostra. Os anticorpos foram injetados (15 µL) em Célula de Fluxo 2 em uma taxa de fluxo de 10 µL/min. Cerca de 50 RU do anticorpo foi capturado. A superfície foi permitida para estabilizar (90 s) e então cada concentração (150 nM) de hOSMR foi passada por Células de Fluxo 1 e 2 a uma taxa de fluxo de 50 µL/min para observar a associação (5 min) e dissociação (1 -2 hr). As amostras foram corridas em triplicata.

[00344] Branco de analito de tampão (0 nM hOSMR) foram injetados antes e após as injeções da amostra. A superfície foi regenerada em uma taxa de fluxo de 50 µL/min com duas injeções de 10 mM glicina (pH 1,5, 50 µL). Isso foi seguido por uma injeção de branco de tampão (15 s).

[00345] Os dados foram analisados com software Scrubber 2.0 como segue. Os dados da Célula de Fluxo 2 foram subtraídos a partir dos dados do Fluxo de Célula 1 (referência em branco). Os dados subtraídos de referência (2-1) foram então subtraídos (referenciado duplamente) a partir dos dados de concentração de 0 nM mais próximos. Os dados de dissociação longos referenciados duplamente foram ajustados para um modelo de ligação de 1:1 para determinar a constante da taxa de dissociação (kd). Esta constante da taxa de dissociação foi usada como um parâmetro fixo para ajustar os dados de dissociação curtos referenciados duplamente para um modelo de ligação de 1:1 para determinar a constante de taxa de associação (ka) e a constante de dissociação de equilíbrio (Kd).

[00346] Os reagentes se comportaram bem sob as condições experimentais e os dados (ver Tabela 7 abaixo) se ajustaram muito bem para um modelo de ligação de 1:1.

Tabela 7

Anticorpo	Antígeno	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_d (pM)
Ab1	huOSMR	$4,47 \times 10^5$	$9,95 \times 10^{-5}$	221
Ab2	huOSMR	$5,50 \times 10^5$	$1,81 \times 10^{-5}$	32,7
Ab3	huOSMR	$9,47 \times 10^4$	$1,02 \times 10^{-4}$	1080

EXEMPLO 6: Anticorpos Anti-OSMR

[00347] Anticorpos totalmente humanos direcionados contra OSMR humano foram gerados utilizando a tecnologia XENOMOUSE® descrita acima no Exemplo 1. Cada um dos anticorpos 1, 2, e 3 foram demonstradas para ser potentes inibidores da sinalização mediada por OSM e/ou IL-31. Sequências de anticorpos 1, 2, e 3 (ou seja, Ab1, Ab2 e Ab3) foram determinadas e são estabelecidos na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8

Descrição	SEQ ID NO	Sequência
Ab1 – nucleotídeo de Cadeia Pesada	3	caggtcagctggtcagtctgggctgaggtgaagaaggcctggggcctcagtgaaggctcgcaggacttggatacacccaccgttatgatataactgggtcgacaggccactggacaggggcttgagttggatggatggatggtaaccctaataatggtaacacagactatgcacagaagttccaggcagagtaccatgaccagaacattccataagcacggcctacattgagctgagcagcctgagatctgagaccggccgttattactgtgcgagagatggctgcgaaatcggtactacttc-tactacggatggacgtctggggcaaggaccacggtcaccgtctccctcagcttagcaccaagggccatcggtctccccctggcgccctgctccaggagcac-ctccgagagcacagcggccctggctgcgtcaaggactactccccgaac-cggtgacgggtcgtaactcaggcgctgaccagcggcgtgcacaccccacccagctgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggaccgtg-ccctccagcaacttcggcacccagacacctacacccatgcacgttagatcacaag-cccaagcaacaccaagggtggacaagacagttgagcgcaaattttgtcgagtg-cccaagggtgcccaggaccacccatggcaggaccgtcagtctccctttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtcggtggatggacgtgacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtagtcaacacggcgttccgtgtggacgtcaatgcacgacaaaaggccacgggaggagcagg-ccaacacgttccgtgtggcagcgtcaccgttgcaccaggactggctgaacccgcaggactacaagtgcacgttcaacaaaaggccctccagccccatcgagaaaccacca-agggttacaccctgccccatccggaggagatgaccaagaaccaggatc-gcctgacccctgcctggtaaaggcttctaccctcagcgacatgcgggtggagtgagagcaatggcagccggagaacaactacaagaccacacccatgtcgactccgacggctcccttccttacagcaagctcaccgtggacaagagcagg-tggcagcaggggaacgtcttcatgcctcgtatgcacgttgcacaacactacacgcagaagagcctccctgtctccggtaaa

Descrição	SEQ ID NO	Sequência
Ab2 – nucleotídeo de Cadeia Pesada	4	caggtgcagctggcgagtctgggctgaggtgaagaaggcctggggcctcagtgaaggctcctgcaaggcttggatacacccttaccagttatgaaatcaactgg-tgcgacaggccactggacaaggcgttgatggatggatggtaaccctaa-cagtggttacacaggctatgcacagaagttccagggcagagtcaccatgacca-ggaacacccataaggcataaggcctacatggaaatgagcagcctgagatctgag-gacacggccgtattactgtgcagagatatagtggctcgaatacggattac-tacttctattatggatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtccctc-agtagcaccaagggcccattcggtctccccctggcgccctgctccaggagcac-ctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtaaggactactccccgaac-cggtgacggtgtcgttgaactcaggcgcttgaccagcggcgtgcacacctt-cccaagctgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggaccgtg-ccctccagcaactcggcacccagacacctacacctcaacgttagatcacaag-cccaagcaacaccaagggtggacaagacagttgagcgc当地atgtgtcgagtg-ccaccgtgccagcaccacccatggcaggaccgtcagttccctt-ccccccaaaaccaaggacaccctcatgatcccgacccctgaggtcacgt-cgtggtgtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtagt-gtggacggcgtggagggtcataatgccaagacaaaaggccacgggaggaggcagg-ccacagcacgtccgtggcagcgtccctcaccgttgccaccaggactgg-ctgaacggcaaggagtacaagtcaaggcttcaacaaaggcctccag-ccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaaggcagcccgagaacca-caggtgtacaccctgccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggcata-gcctgacccctgctggtaaaggcttctaccctcagcgcacatcggcgtggagttgg-gagagcaatggcagccgagaacaactacaagaccacacccatgctg-gactccgacggcgtcccttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg-tggcagcaggggaacgtcttcatgtccgtatgcatgaggctctgcacaac-actacacgcagaagagcctccctgtctccggtaaa
Ab3 – nucleotídeo de Cadeia Pesada	5	caggtcatctggcgagtctggagctgaggtgaagaaggcctggggcctcagtgaaggctcctgcaaggcttggttacacccttaccagttatggtatcagctgg-tgcgacaggccctggacaaggcgttgatggatggatggctcagcacttaca-gtggtaacacaaactatgcacagaagctccaggcagagtcaccatgaccaca-gacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggaccgtgagatctgacga-cacggccgtgtattactgtgcagagggacttctactactacggtaggtggacg-tctggggccaggggaccacggtcaccgtccctcagctagcaccaaggg-cccatcggtctcccccggccctgctccaggagcacctccgagagcaca-cgcccctggcgtccgtcaaggactactccccgaaccgggtacgggtcgtag-aactcaggcgcttgaccagcggcgtgcacaccctccagctgtcctacag-tcctcaggacttactccctcagcagcgtggatggcaccgtccctccagcaacttcgg-

Descrição	SEQ ID NO	Sequência
Ab2 – proteína de Cadeia Pesada	7	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVR-QATGQGLEWMGMNPNSGYTGYAQKFQGRVTMTRNT-SISTAYMEMSSLRSEDTAVYYCARDIVAANTDYYFYYG-MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL-GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYS-LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK-CCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS-RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK-PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL-PAPIEKTIKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVS-LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGS-FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS-LSPGK
Ab3 – proteína de Cadeia Pesada	8	QVHLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR-QAPGQGLEWMGWLSYSTSGNTNYAQKLQGRVTM-TTDTSSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGNFYYG-MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL-GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYS-LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK-CCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS-RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK-PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL-PAPIEKTIKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVS-LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGS-FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS-LSPGK
Ab1 – Região Variável de Cadeia Pesada	9	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVR-QATGQGLEWMGMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTRNI-SISTAYIELSSLRSEDTAVYYCARDMVAANTDYYFYYG-MDVWGQGTTVTVSS
Ab2 – Região Variável de Cadeia Pesada	10	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVR-QATGQGLEWMGMNPNSGYTGYAQKFQGRVTMTRNT-SISTAYMEMSSLRSEDTAVYYCARDIVAANTDYYFYYG-MDVWGQGTTVTVSS

Descrição	SEQ ID NO	Sequência
Ab3 – Região Variável de Cadeia Pesada	11	QVHLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR- QAPGQGLEWMGWLSTYSGNTNYAQKLQGRVTM- TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGNFYYYYG- MDVWGQGTTTVSS
Ab1 – Cadeia Pesada CDR1	12	SYDIN
Ab2 – Cadeia Pesada CDR1	13	SYEIN
Ab3 – Cadeia Pesada CDR1	14	SYGIS
Ab1 – Cadeia Pesada CDR2	15	WMNPNSGNTDYAQKFQG
Ab2 – Cadeia Pesada CDR2	16	WMGWMNPNSGYTGYAQKFQG
Ab3 – Cadeia Pesada CDR2	17	WLSTYSGNTNYAQKLQG
Ab1 – Cadeia Pesada CDR3	18	DMVAANTDYYFYYGMDV
Ab2 – Cadeia Pesada CDR3	19	DIVAANTDYYFYYGMDV
Ab3 – Cadeia Pesada CDR3	20	GNFYYYGMDV

Descrição	SEQ ID NO	Sequência
Ab1 – nucleotídeo de Cadeia Leve	21	cagtctgtgactcagccaccctcagcatctggaccccccgggcagagggt-caccatcttgttcttggaaagcagctccaacgtcggaagtaatactgttaagctgg-taccaacagctccaggaacggccccaaactcctcatctataactaataatcg-gggccctccgggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcag-cctccctggccatcagtgggctccagtcgtgaggatgaggctgattattctgtcag-cgttagatgacagtctgaatgggtgttattcggcggagggaccaaactgaccg-tccttaggccaaccgaaagcggcccccctcggtactctgtcccg-ccctccctgaggagctcaagccaacaaggccacactgggtgtctcataagg-tgactctacccgggagccgtacagtggcttggaaaggcagatagcagcccg-caaggcgggagtgagaccaccacacctccaaacaaagcaacaacaag-tacgcggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtgaaagtcccaca-gaagctacagctgccaggtcacgcataaggagcaccgtggagaagacag-tggccctacagaatgttca
Ab2 – nucleotídeo de Cadeia Leve	22	cagtctgtgactcagccaccctcagcgtctggaccccccgggcagagggtcac-catcttgttcttggaaagcaactccaacatcgaaagtaatactgtcaactgttaccac-cagctccaggaacggccccaaactcctcatctataatataaagcggccctca-gggccctgaccgattctctggctccaagtctggctccctcagcctccctggccatcag-tggctccagtcgtgaggatgaggctgattattactgttcaacatgggatgacagcctg-gatgggtgttattcggcggagggaccaagctgaccgtcctaggccaaaccgaaag-cggccctcggtactctgtcccccctctgaggagctcaagccaacaagg-ccacactgggtgtctcataagtgacttctaccggagccgtacagtggcttggaa-aggcagatagcagcccgtaaggcgggagtgagaccaccacacctccaa-aaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcag-tgaaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcataaggagcaccgtg-gagaagacagtggccctacagaatgttca
Ab3 – nucleotídeo de Cadeia Leve	23	gaaattgtgtgacgcagctccaggcaccctgtttgtctccaggaaaagag-ccaccctctctgaggccagtcagatgttagcagcagactacttagcctggtacca-gcagaaaacctggccaggctccaggctccatctttggcttccagcaggccac-tggcatccagacagggttcagtgccagtggtctggacagacttcacttcaccat-cagcagactggagcctgaagatttgcagtgatattactgtcagcagttatggtagctcg-cctccgatcaccttggccaaggacacgcactggagataaaacgtacggctggctg-caccatctgtctcatctcccgccatctgtatgagcagttgaaatctgaaactgcctgt-ttgtgtccgtctgaataactctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtgga-taaccgcctccaatcggtaactcccaggagatgttcacagacgcaggacacgcac-gacgcacccatcagcctcagcagcaccctgacgcgtgagcaaaacgcac-ac-tacgagaaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccatcagggcctgagcgtcg-cccggtcacaagagctcaacaggagagatgt

Descrição	SEQ ID NO	Sequência
Ab1 – proteína de Cadeia Leve	24	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSN-VGSNTVSWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP-DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAALDDS-LNGVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQAN-KATLVCLISDFYPGAVTVAW-KADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW-KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Ab2 – proteína de Cadeia Leve	25	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSNS-NIGSNTVNWYHQLPGTAPKLLIYNINKRPSGVP-DRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYCSTWDDSLD-GVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQAN-KATLVCLISDFYPGAVTVAW-KADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW-KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Ab3 – proteína de Cadeia Leve	26	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS-QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIFGASSRATGIP-DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPITF-GQQTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNN-FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS-LSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Ab1 – Variável de Cadeia Leve	27	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSN-VGSNTVSWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP-DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAALDDS-LNGVVFGGGTKLTVLG
Ab2 – Variável de Cadeia Leve	28	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSNS-NIGSNTVNWYHQLPGTAPKLLIYNINKRPSGVP-DRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYCSTWDDSLD-GVVFGGGTKLTVLG
Ab3 – Variável de Cadeia Leve	29	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK-PGQAPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR-LEPEDFAVYYCQQYGSPPITFGQQTRLEIKR
Ab1 – Cadeia Leve CDR1	30	SGSSNVGSNTVS
Ab2 – Cadeia Leve CDR1	31	SGSNSNIGSNTVN

Descrição	SEQ ID NO	Sequência
Ab3 – Cadeia Leve CDR1	32	RASQSVSSSYLA
Ab1 – Cadeia Leve CDR2	33	TNNRRPS
Ab2 – Cadeia Leve CDR2	34	NINKRPS
Ab3 – Cadeia Leve CDR2	35	GASSRAT
Ab1 – Cadeia Leve CDR3	36	AALDDSLNGVV
Ab2 – Cadeia Leve CDR3	37	STWDDSLDGVV
Ab3 – Cadeia Leve CDR3	38	QQYGSSPPIT

EXEMPLO 7: Anticorpos Anti-OSMR Modificados

[00348] Versões modificadas de Ab1 e Ab2, e Ab3 foram geradas. Para todas as três formas modificadas dos anticorpos, a lisina do C-terminal da cadeia pesada foi removida. Para Ab1 e Ab2, o sítio de glicosilação na posição 73 foi removido por substituição da asparagina na posição 73 com um ácido aspártico. Essas variantes são referidas como Ab1-N73D e Ab2-N73D. As sequências dos anticorpos modificados estão estabelecidas na Tabela 9 abaixo (os nucleotídeos e aminoácidos modificados são sublinhados).

Tabela 9

Descrição	SEQ ID NO	Sequência
Ab1 versão 2 – nucleotídeo de Cadeia Pesada (N73D / lisina C-terminal deletada)	47	caggtgcagctggcagtctgggctgaggtaagaaggcctgggcctcagtgaaggctccgtcaaggctctggatacacccatcaccaggttatgatatatcaactgggtgcacaggccactggacagggcttgagtggatggatggatgaacctaatagtggtaacacagactatgcacagaagttccaggcagagtccatgaccagg <u>g</u> acattccataagcacggcctacattgagctgagcagcagcctgagatctgaggacacggccgttattactgtgcagagatatggggctgcaatacggttactactacggatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctccctcagtagcacaaggccatcggcttcccctggcgcctgctccaggagcaccccgagagcacagcggccctggctgctggtaaggacttcccgaaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgtctgaccaggcggtcgacaccccccagctgcctacagtccctcaggactctaccctcagcagcgtggtagccgtgcctccagcaacttcggcacccagacacccatcaccgtcaacgcgttagatcacaagcccgagcaacaccaagggtggacaagacagttgagcgcataatgttgcagtgccaccgtgcccagcaccacccatgtggcaggaccgtcagttcccttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatcccccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggccagtcaactggtacgtgcgtggaggtgcataatgccaagacaaggccacggaggaggcagttcaacacgcacgtccgtgtggcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcacccatcaccgtccctccaaacaaaggcccccagccccatcgagaaaaccatctccaaaaccacaaaggcccccggagaaccacacccatgtggactccgtccctgccccatcccccggaggatgaccaagaaccaggcgtcagcctgacccatgcgtggccatccctccatcgacatcgccgtggaggtggagagcaatggcagccggagaacaactacaagaccacacccatgtggactccgtccctgccccatcccccggaggatcaccgtggacaagagacagcagggtggcagcagggaaacgttctcatgcctccgtatgcacccatcaccactacacgcagaagagccctccctgtctccgggt

Descrição	SEQ ID NO	Sequência
Ab2 versão 2 – nucleotídeo de Cadeia Pesada (N73D / lisina C-terminal deletada)	48	caggtgcagctggtcagtctgggctgaggtaagaaggcctgggcctcagtgaaggctccctcaaggctctggatcacacccatcaccagttatgaaatcaactggtgcgacaggccactggacaaggcctgagtggatggatggatgaacctaacatggttacacaggctatgcacagaagttccaggcagagtacatgaccaggacacccataagcacagcctacatggaaatgagcagcctgagatctgaggacacggccgttattactgtgcagagatatactggctcgaaatcggattactacttattatggatggacgtctggggccaaggcacccgtcaccgtctccatgcacccatggcttcccccctggcccccgtccaggagcacctccgagagcacagcggccctggctgcctggcaaggactactcccgaaaccgggtacgggtcgtaactcaggcgtctgacccaggcgtgcacacccatcccagctgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtagccgtgccccctccagcaactcggcacccagacactacactgcaacgttagatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagacagttgagcgc当地atgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggacgtcagtctcccttccccccaaaacccaaggacaccccatgatctcccgagccctgagggtcacfgtcggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtaactgtggacggcgtggagggtgcataatgcaagacaagaaagccacggaggagcagttcaacacgcacgttccgttgttcagcgtcctaccgtgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtagaactgtcaaggctccaacaaaggcctccagccccatcgagaaaacatccaaaaccaaaggcagccccgagaaccacacccatcgccgttccctggcccccattccggaggagatgaccaagaaccaggcgtccctgacccatcgtaaaggcttctacccagcgcacatcgccgtggagtggagagcaatggggcgcggagaacaactacaagaccacacccatgtggactccgcacggctcccttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggaaacgttctcatgctccgtatgcacccatcgccgttccctgtctccgggt
Ab3 – nucleotídeo de Cadeia Pesada (lisina C-terminal deletada)	49	caggtcatctggtcagtctggagctgaggtaagaaggcctgggcctcagtgaaggctccctcaaggctctggatcacacccatggatcgacttgcacccatggcgtccctggacaggccctggacaaggcctgagtggatggatggctcagcacttacatggtaacacaaactatgcacagaagctccaggcagagtccaccatgaccacacatccacccgcacccatgtggactccgcacggatctgacccatggcgttattactgtgcagagagggaaacttctactactacggtagtggacgtctggggcaggggaccacccgtcaccgtctccctcagctgcacccatcgccgttccctggcgcggccctggctgcctggtaaggccatcgccgttcccccctggcgcggccctggctccaggagcacctcccgagagcacagcggccctggctgcctggtaaggactactcccgaaac

Descrição	SEQ ID NO	Sequência
		cggtagcgggtcgtaactcaggcgctgaccagcggcgacacccttcccagctgcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccccccagcaacttcggcacccagacacctacacgtcaacgttagatcacaagcccagcaacacccaagggtggacaagaagacagttgagcgc当地atgttgcagg-tgcccaccgtgcccagcaccacccatgtggcaggaccgtcagtc当地tcccttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgacccctgaggc当地cagcgtgggtggacgtgagccacgaagaccccgaggccagttcaactgg-tacgtggacggcgtggagggtgc当地ataatgcaagacaaagccacgggaggaggc当地agttcaacacgc当地ccgtgtggc当地agcgtccctcaccgttgc当地accaggac-tggctgaacggcaaggaggatacagtgcaaggctccaaacaaggccctccagccccc当地atcgagaaaaccatctccaaaccaaaggc当地gccccgagaac-acaggc当地tacaccctgccccatccgggaggagatgaccaagaaccagg-ctagcctgacctgctggtaaaggcttctacccagc当地gacatcgccgtggagg-tggagagacaatggc当地ggc当地gggagaacaactacaagaccacaccctccatg-ctggactccgacggc当地tcttctctacagcaagctaccgtggacaagaggc当地ggc当地gggaaacgttctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca-caaccactacacgc当地agaagccctccctgctccgggt
Ab1 versão 2 – proteína de Cadeia Pesada (N73D / lisina C-terminal deletada)	50	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVR-QATGQGLEWMGWMPNSGNTDYAQKFQGRVTMTR <u>DI</u> -SISTAYIELSSLRSEDTAVYYCARDMVAANTDYYFYYG-MDVWGQQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES-TAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPA-VLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT-KVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDTL-MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT-KPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYK-CKVSNKGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT-KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN-GQPENNYKTPPMULDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN-VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Descrição	SEQ ID NO	Sequência
Ab2 versão 2 – proteína de Cadeia Pesada (N73D / lisina C-terminal deletada)	51	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVR-QATGQGLEWMGMNPNSGYTGYAQKFQGRVTMTR <u>D</u> T-SISTAYMEMSSLRSEDTAVYYCARDIVAANTDYYFYYG-MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAAL-GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYS-LSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK-CCVECPVCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS-RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE-EQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI-EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
Ab3 versão 2 – proteína de Cadeia Pesada (lisina C-terminal deletada)	52	QVHLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR-QAPGQGLEWMGWLSYSTSGNTNYAQKLQGRVTM-TTDTSTSTAYMELRSRLRSDDTAVYYCARGNFYYG-MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSES-TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPVCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTSKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
Ab1 versão 2 – Região Variável de Cadeia Pesada (N73D / lisina C-terminal deletada)	53	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVR-QATGQGLEWMGMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTR <u>D</u> I-SISTAYIELSSLRSEDTAVYYCARDMVAANTDYYFYYG-MDVWGQGTTVTVSS
Ab2 versão 2 – Região Variável de Cadeia Pesada (N73D / lisina C-terminal deletada)	54	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVR-QATGQGLEWMGMNPNSGYTGYAQKFQGRVTM- <u>TR</u> TSISTAYMEMSSLRSEDTAVYYCARDIVA-ANTDYYFYYGMDVWGQGTTVTVSS

[00349] Experimentos de ELISA foram realizados sob vários

formatos (ELISA de captura para formato de menos avidez; ELISA de Sanduíche para formato de fase de solução; e ELISA Direto para formato de avidez de estado sólido) usando anticorpos contendo as regiões variáveis de Ab1 ou Ab2 (ou a variante N73D de Ab1 ou Ab2) com diferentes regiões Fc.

[00350] AB1 e Ab2 cada um contêm domínios CH1, CH2, CH3 de origem de IgG2 humano. Como usado aqui, os termos "Ab1" e "Ab1 IgG2 WT" referem-se ao mesmo anticorpo. Da mesma forma, os termos "Ab2" e "Ab2 IgG2 WT" referem-se ao mesmo anticorpo.

[00351] Anticorpos, identificados como "IgG4P agly / IgG1" contêm as regiões variáveis da Ab1 ou Ab2 (ou a variante N73D de Ab1 ou Ab2) fundida para o domínio CH1 de IgG4 humana, a dobradiça de IgG4 humana com uma mutação de Ser para Pro (na posição 228) para reduzir o embaralhamento, o domínio CH2 de IgG4 humana com uma mutação de Asn para Gln (na posição 297) para eliminar o sítio de glicosilação N-ligado, e o domínio CH3 de IgG1 humana. A estrutura "IgG4P agly / IgG1" é descrita no pedido de patente publicado U.S. número US 2012/0100140.

[00352] Os resultados de ELISA indicaram que a remoção de sítios de glicosilação através da substituição de N73D não afetou a ligação dos anticorpos modificados para OSMR. Ver Tabela 10.

Tabela 10

Anticorpo	Captura (EC50) nM	Sanduíche (EC50) nM	Direto (EC50) nM
Ab1 IgG2 WT	10,2	0,581	0,184
Ab1 N73D IgG2	4,85	0,359	0,0728
Ab1 N73D IgG4P agly / IgG1	2,86	0,05	0,0626
Ab2 IgG2 WT	3,63	0,366	0,182
Ab2 N73D IgG2	5,49	0,343	0,179

Anticorpo	Captura (EC50) nM	Sanduíche (EC50) nM	Direto (EC50) nM
Ab2 N73D IgG4P agly / IgG1	1,61	0,064	0,0558

[00353] Estudos de ligação foram realizados usando o método BIAcore. Anticorpos contendo as regiões variáveis de Ab1 ou Ab2 (ou a variante N73D de Ab1 ou Ab2) com diferentes regiões Fc foram imobilizados em um chip CM4 (GE lifesciences) conforme protocolos do fabricante. OSMR solúvel foi usado como o analito. A remoção do sítio de glicosilação em Ab1 e Ab2 através da substituição de N73D melhorou as afinidades de ligação. Para Ab1, a substituição melhorou a taxa de Kon, enquanto que para Ab2 melhorou a taxa de Koff. Ver Tabela 11.

Tabela 11

Anticorpo	Kon (M-1s-1)	Koff (1/s)	KD (M)
Ab1 IgG2 WT	1,64E+05	1,50E-04	0,913E-9
Ab1 N73D IgG2	2,49E+05	1,68E-04	0,675E-9
Ab2 IgG2 WT	1,88E+05	1,89E-04	1,01E-09
Ab2 N73D IgG2	1,73E+05	4,99E-05	0,289E-9

[00354] A estabilidade de fragmentos Fab foi determinada avaliando o desenovelamento térmico de anticorpos. Altas temperaturas de fusão de fragmentos Fab se correlacionam diretamente com a estabilidade aumentada. A remoção dos sítios de glicosilação em Ab2 através da substituição de N73D não afetou a estabilidade térmica de fragmentos Fab e mostrou efeitos pequenos em Ab1, como avaliado por experimentos de fluorimetria de varredura diferencial. Ver Tabela 12.

Tabela 12

Anticorpo	Fab Tm (Celsius)	Erro Padrão (Celsius)
Ab1 IgG2 WT	73,24	0,0097
Ab1 N73D IgG2	71,21	0,005

Anticorpo	Fab Tm (Celsius)	Erro Padrão (Celsius)
Ab1 N73D IgG4P agly / IgG1	74,23	0,014
Ab2 IgG2 WT	76,71	0,0096
Ab2 N73D IgG2	76,54	0,14
Ab2 N73D IgG4P agly / IgG1	76,69	0,018

[00355] A capacidade de anticorpos anti-OSMR modificados para bloquear a sinalização através de OSMR humano foi avaliada. Os anticorpos modificados foram avaliados por suas capacidades de inibir a proliferação de uma linhagem de células BaF_hu-IL31R/OSMR/gp130 na presença de IL31, OSM, ou IL31 e OSM. Os resultados são apresentados nas Tabelas 13 e 14 abaixo, com o IC50 para cada anticorpo mostrado. Os resultados confirmam que as versões modificadas de Ab1 e Ab2 são potentes inibidores de sinalização mediada por OSM e IL-31.

Tabela 13

Anticorpo	IL31 (IC50)	OSM (IC50)	IL31/OSM (IC50)
Ab2	0,3828	0,3528	~1,9
Ab1 IgG2 WT	0,6691	0,5298	4,004
Ab1 N73D IgG2	0,7565	0,5226	3,702
Ab1 N73D IgG4P agly / IgG1	0,4672	0,5657	3,080

Tabela 14

Anticorpo	IL31 (IC50)	OSM (IC50)	IL31/OSM (IC50)
Ab2	0,4426	0,4019	1,8
Ab2 IgG2 WT	0,3671	0,4758	2,049
Ab2 N73D IgG2	0,2191	0,1859	1,474
Ab2 N73D IgG4P agly / IgG1	0,2838	0,2401	1,276

[00356] A descrição foi descrita em termos de modalidades particulares encontradas ou propostas para compreender modos específicos para a prática da descrição. Diversas modificações e variações da invenção descrita serão evidentes para os especialistas na técnica sem se afastar do escopo e espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com modalidades específicas, deve ser entendido que a invenção como reivindicada não deve ser excessivamente limitada por essas modalidades específicas. De fato, várias modificações dos modos descritos para realizar a invenção que são óbvios para os especialistas nos campos relevantes se destinam a estar no escopo das reivindicações que seguem.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ligação ao antígeno de receptor de oncostatina M (OSMR), caracterizada pelo fato de que compreende:

(a)(i) uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo uma região determinante de complementaridade variável de cadeia leve 1 (LCDR1) compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 30; uma LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 33 e uma LCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 36 e (ii) uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo uma região determinante de complementaridade variável de cadeia pesada 1 (HCDR1) compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 12; uma HCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 15; e uma HCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:18,

(b)(i) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma VLCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 31, uma VLCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 34 e uma VLCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 37 e (ii) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma VHCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 13, uma VHCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 16, e uma VHCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 19, ou

(c)(i) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma VLCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 32, uma VLCDR2 compreendendo a sequência

de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 35 e uma VLCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 38 e (ii) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma VHCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 14, uma VHCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 17, e uma VHCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 20;

e em que a proteína de ligação ao antígeno de OSMR reduz a sinalização de ambos OSM e IL-31.

2. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada na (a) SEQ ID NO: 27, (b) SEQ ID NO: 28, ou (c) SEQ ID NO: 29.

3. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada na (a) SEQ ID NO: 9 ou 53, (b) SEQ ID NO: 10 ou 54, ou (c) SEQ ID NO: 11.

4. Proteína de ligação a antígeno de OSMR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que compreende:

o domínio variável de cadeia leve que compreende a região determinante de complementariedade de cadeia leve 1 (LCDR1) compreendendo a sequência de aminoácidos como estabelecida na SEQ ID NO: 31, a LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos como estabelecida na SEQ ID NO: 34, e a LCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos como estabelecida na SEQ ID NO: 37; e

o domínio variável de cadeia pesada que compreende a região determinante de complementariedade de cadeia pesada 1 (HCDR1) compreendendo a sequência de aminoácidos como estabe-

lecionada na SEQ ID NO: 13, a HCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos como estabelecida na SEQ ID NO: 16, e a HCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos como estabelecida na SEQ ID NO: 19.

5. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o domínio variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos como estabelecida na SEQ ID NO: 28.

6. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o domínio variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 54.

7. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 25.

8. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que é um anticorpo.

9. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

10. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo humano.

11. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que se liga especificamente ao OSMR humano com uma afinidade menor ou igual a 1×10^{-9} M.

12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a proteína de ligação ao antígeno de OSMR, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

13. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um distúrbio autoimune, um distúrbio inflamatório, ou um distúrbio associado à deposição ou remodelação de matriz extracelular.

14. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o distúrbio autoimune, o distúrbio inflamatório, ou o distúrbio associado à deposição ou remodelação de matriz extracelular é selecionado do grupo consistindo em fibrose, degradação da cartilagem, artrite, artrite reumatoide, esclerodermia, doença pulmonar intersticial associada à esclerodermia, fibrose pulmonar idiopática, cirrose, psoríase, dermatite atópica, amiloidose cutânea sistêmica, amiloidose cutânea primária, inflamação, inflamação pruriginosa, prurigo nodular e dor.

15. Proteína de ligação ao antígeno de OSMR ou composição, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação ao antígeno de OSMR ou composição farmacêutica é para ser administrada de forma intravenosa ou subcutânea.

16. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que codifica uma proteína de ligação ao antígeno de OSMR, comprendendo o ácido nucleico de uma sequência de cadeia leve apresentada na SEQ ID NO: 22 e/ou o ácido nucleico de uma sequência de cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 4.

17. Vítor de expressão, caracterizado pelo fato de que com-

preende o ácido nucleico isolado, como definido na reivindicação 16.

18. Célula hospedeira procariótica recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende um ácido nucleico isolado, como definido na reivindicação 16, operacionalmente ligado a um promotor.

19. Método para preparar uma proteína de ligação ao antígeno de receptor de oncostatina M (OSMR), caracterizado pelo fato de que compreende:

a) cultivar uma célula hospedeira procariótica recombinante, como definida na reivindicação 18; e

b) isolar a proteína de ligação ao antígeno de OSMR da referida cultura.

20. Uso de uma proteína de ligação ao antígeno de OSMR, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que é na preparação de uma composição farmacêutica para tratar uma doença ou um distúrbio, em que a doença ou o distúrbio é um distúrbio autoimune, um distúrbio inflamatório, ou um distúrbio associado à deposição ou remodelação de matriz extracelular.

21. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ou uma pluralidade de proteínas de ligação ao antígeno, como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, e diluentes, veículos, solubilizantes, emulsificantes, conservantes e/ou adjuvantes farmaceuticamente eficazes.