



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0316092-0 B1



(22) Data do Depósito: 07/11/2003

(45) Data de Concessão: 30/10/2018

(54) Título: ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO DIRECIONADOS CONTRA O FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E USOS PARA OS MESMOS

(51) Int.Cl.: C07K 16/00.

(30) Prioridade Unionista: 08/07/2003 EP PCT/EP03/07313; 08/11/2002 US 60/425,073; 08/11/2002 US 60/425,063; 10/01/2003 EP 03447005.4; 23/06/2003 EP PCT/EP03/06581.

(73) Titular(es): ABLYNX, N.V..

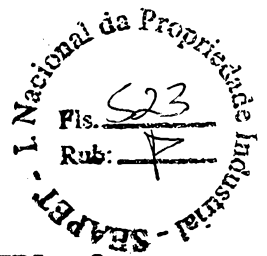
(72) Inventor(es): KAREN SILENCE; MARC LAUWEREYS; HANS DE HAARD.

(86) Pedido PCT: PCT BE2003000192 de 07/11/2003

(87) Publicação PCT: WO 2004/041862 de 21/05/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/05/2005

(57) Resumo: "ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO DIRECIONADOS CONTRA O FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E USOS PARA OS MESMOS". A presente invenção se relaciona aos polipeptídeos derivados de anticorpos de domínio único de cadeia pesada direcionados para o fator de necrose tumoral alfa. A invenção ainda se relaciona a anticorpos de domínio único que são VHHs de camélídeo. A invenção ainda se relaciona aos métodos para administrar os ditos polipeptídeos. Enfim, a invenção se relaciona aos protocolos para seleção de agentes que modulam o receptor TNF-alfa, e os agentes resultantes da dita seleção.



**ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO DIRECIONADOS CONTRA O
FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E USOS PARA OS MESMOS.**

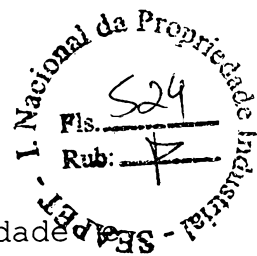
CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção se refere aos polipeptídeos que
compreendem um ou mais anticorpos de domínio único
direcionados para o fator de necrose tumoral alfa (TNF-
alfa). A presente invenção, adicionalmente, se relaciona ao
uso, diagnóstico e terapia. Tais anticorpos podem ter uma
10 seqüência com estrutura de homologia elevada para as
seqüências da estrutura humana.

São descritas composições compreendendo anticorpos
para o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) sozinhos ou
em combinação com outras drogas.

15 **FUDAMENTOS DA INVENÇÃO**

Acredita-se que o fator de necrose tumoral alfa (TNF-
alfa) possui um importante papel em várias doenças, por
exemplo, em doenças inflamatórias tais como artrite
reumática, doença de Crohn, colite ulcerosa e esclerose
20 múltipla. O TNF-alfa e os receptores (CD120a, CD120b) foram
estudados detalhadamente. O TNF-alfa na sua forma bioativa é
um trímero e as cavidades formadas pelas subunidades
vizinhas são importantes para a interação do receptor de
citocina. As diversas estratégias para antagonizar ação da
25 citocina foram desenvolvidas e são presentemente usadas para
tratar vários tipos de doenças.



Um inibidor do TNF-alfa que tenha especificidade seletividade suficiente ao TNF-alfa pode ser um eficiente composto farmacêutico profilático ou terapêutico para prevenir ou tratar doenças às quais o TNF-alfa é tido como o agente causador. Métodos de tratamento de choque tóxico (EP 486526), regressão do tumor, inibição da citotoxicidade (US 6448380, US 6451983, US 6498237), doenças auto-imunes tal como RA e doença de Crohn (EP 663836, US 5672347, US 5656272), transplante versus a reação do receptor (US 5672347), meningite bacteriana (EP 585705) por meio de um anticorpo para o TNF-alfa, foram descritos.

Contudo, nenhuma das drogas presentemente disponíveis são completamente eficazes para o tratamento de doença auto-imune, e a maioria são limitadas devido à alta toxicidade. Adicionalmente, é extremamente difícil e um processo longo desenvolver uma entidade química nova (NCE) com potencialidade e seletividade suficientes a tal sequência alvo. Por outro lado, terapia baseada em anticorpos não tem um potencial significativo como as drogas porque têm especificidade delicada a seu alvo e baixa toxicidade inerente. Além deste, o tempo de desenvolvimento pode ser consideravelmente reduzido quando comparado ao desenvolvimento de entidades químicas novas (NCE's).

Entretanto, os anticorpos convencionais são difíceis de ir contra as proteínas multitemporica onde o domínio do receptor-ligante do ligante é encaixado em uma cavidade,



como é o caso do TNF-alfa. Os anticorpos de cadeia pesada, descritos na invenção que são derivados de camelídeo são conhecidos por ter propensão à cavidade de ligação (W097/49805; Lauwereys et. al, EMBO J. 17.5312, 1998)).

5 Conseqüentemente, tais anticorpos de cadeia pesada são inerentemente servidos para ligar os domínios de ligação do receptor de tais ligantes como TNF. Adicionalmente, tais anticorpos são conhecidos por serem estáveis por um longo período de tempo de tempo, conseqüentemente aumentando sua

10 duração de armazenagem (Perez et. al, biochemistry, 40, 74, 2001). Além deste, tais fragmentos de anticorpo da cadeia pesada podem ser produzidos em massa no digestor usando sistemas de expressão baratos comparados à fermentação da cultura de células de mamífero, tal como as leveduras ou os

15 outros microorganismos (EP 0 698 097).

O uso dos anticorpos derivados das fontes, tais como ratos, carneiros, cabras, coelhos e etc., e derivados humanizados destes como um tratamento para as condições que requerem uma modulação de inflamação é problemático por

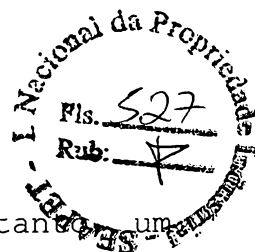
20 diversas razões. Os anticorpos tradicionais não são estáveis na temperatura ambiente, e têm que ser refrigerado para a preparação e o armazenamento, requerendo equipamento laboratorial refrigerado necessário para o armazenamento e o transporte, o que contribuem para o aumento do tempo e

25 despesa gastos. A refrigeração às vezes não é praticada em alguns países. Além deste, a fabricação ou a produção em



pequena escala dos ditos anticorpos são dispendiosas porque os sistemas de células do mamífero necessários para a expressão de anticorpos intactos e ativos requerem elevados níveis de sustentação em termos do tempo e equipamento, e os rendimentos são muitos baixos. Além deste, o grande tamanho dos anticorpos convencionais, restringe a penetração no tecido, por exemplo, no local do tecido inflamado. Adicionalmente, os anticorpos tradicionais têm uma atividade obrigatoriamente depende do pH, e então são inadequados para o uso em ambientes fora da escala fisiológica usual do pH como, por exemplo, no tratamento do sangramento gástrico, a cirurgia gástrica. Além deste, os anticorpos tradicionais são instáveis a Ph baixos ou altos e então não é apropriado para a administração oral. Entretanto, foi demonstrado que o anticorpo camelídio resiste a condições difíceis, tais como ph extremos, reagentes de destruição e altas temperaturas (Dumoulin et. al, Protein Science 11, 500, 2002), assim fazendo-os apropriados para administração oral. Além deste, os anticorpos tradicionais têm uma atividade de ligação, que depende da temperatura, e logo são inadequados para o uso nos ensaios ou kits realizados em escalas de temperatura biologicamente ativos da parte externa das temperaturas (por exemplo, $37 \pm 20^{\circ}\text{C}$).

Os polipeptídeos terapêuticos e em particular os terapêuticos baseados em anticorpos tem um potencial significativo como drogas porque têm especificidade delicada



a seu alvo e uma toxicidade inerente baixa. Entretanto, um destinatário versado sabe que um anticorpo que foi obtido para um alvo terapêutico útil requer modificação adicional a fim de prepará-lo para terapia humana, de modo a evitar uma reação imunológica não desejada em um indivíduo humano sob a administração deste. O processo da modificação é normalmente denominado de "humanização". Uma pessoa versada sabe que os anticorpos aumentam a espécie, diferentemente dos seres humanos, requer humanização para aumentar os anticorpos terapêuticamente úteis nos seres humanos ((1) os CDR grafting: Protein Design Labs: US 6180370, US 5693761; Genentech US 6054297; Celltech: EP 460167, EP 626390, US 5859205; (2) Veneering: Xoma: US 5869619, US 5766886, US 5821123). Existe a necessidade de um método para produzir anticorpos que evita a exigência de substancial humanização, ou que completamente torna óbvia a necessidade de humanização. Existe a necessidade de uma nova classe de anticorpos que definam regiões da estrutura ou resíduos do aminoácido e que podem ser administrados a um sujeito humano sem a exigência de substancial humanização, ou a necessidade de humanização em tudo.

Um outro inconveniente importante dos anticorpos convencionais é que são moléculas grandes complexas e conseqüentemente relativamente instáveis, e elas são sensíveis à avaria por proteases. Isto significa que as drogas de anticorpos convencionais não podem ser



administradas por via oral, sublingual, tópica, nasal,
vaginal, retal ou por inalação porque não são resistentes a
baixo pH neste meio, a ação de proteases por estes meios e
no sangue e/ou por causa de seu grande tamanho. Elas têm que
5 ser administradas por injeção (de modo intravenoso,
subcutâneo, etc.) para superar alguns destes problemas. A
administração por injeção requer o treinamento de
especialistas para usar uma seringa ou agulha hipodérmica
corretamente e com segurança. Isto adicionalmente requer
10 equipamento esterilizado, uma formulação líquida do
polipeptídeo terapêutico, embalagem de frasco do dito
polipeptídeo na forma esterilizada e estável e, um local
apropriado para a entrada da agulha no paciente. Além deste,
o paciente geralmente passa por uma pressão física
15 psicológica antes e após receber a injeção.

Conseqüentemente, existe a necessidade de um método
para a entrega de polipeptídeo terapêutico que evita a
necessidade de injeção que são não somente economiza
tempo/custo, mas que também seja conveniente e mais
20 confortável para o paciente.

Anticorpos baseados em domínio único terapêutico têm
potencial significativo como drogas porque têm
especificidade delicada a seu alvo e baixa toxicidade
inerente. Entretanto, melhorar ainda sua afinidade
25 intrínseca e funcional pode levar aos muitos benefícios para
um paciente tal como uma dose reduzida da terapia,



tratamento mais rápido, e efeitos colaterais reduzidos.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

5 É um objetivo da presente invenção fornecer os polipeptídeo que compreendem um ou mais único anticorpos de domínio único que liga ao TNF-alfa, homólogos dos ditos polipeptídeos, partes funcionais homólogas dos ditos polipeptídeos. Os ditos polipeptídeos modificam a atividade
10 biológica do TNF-alfa ao ligar. Tais polipeptídeos podem se ligar na cavidade receptor-ligante do TNF-alfa, ou não podem não se ligar na cavidade do receptor ligante. Tais polipeptídeos são anticorpos de domínio único.

 É um objetivo adicional da presente invenção fornecer
15 anticorpos de domínio único que podem ser de qualquer técnica, ou qualquer anticorpo de domínio único do futuro. Os exemplos incluem, mas não se limitam a anticorpos de cadeia pesada, anticorpos naturalmente desprovidos de cadeias leves, anticorpos de domínio único derivados de anticorpos convencionais de cadeia-4, anticorpos projetados
20 e estruturas de domínio único à exceção daqueles derivados de anticorpos. De acordo com um aspecto da invenção, um anticorpo de domínio único como usado aqui é uma ocorrência natural do anticorpo de domínio único
25 conhecido como anticorpo de cadeia pesada, desprovido de cadeia leve (WO 9404678). Para maior clareza, este domínio



variável derivado de um anticorpo de cadeia pesada desprovida de cadeia leve é chamado VHH ou nanobody® para distingui-lo do VH convencional de quatro cadeias de imunoglobulinas. Tal molécula de VHH pode ser derivada de anticorpos surgidos na espécie camelídeo, por exemplo, camelo, lhama, dromedário, alpaca e guanaco.

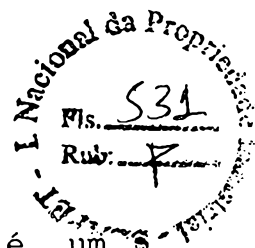
É um objetivo adicional da invenção fornecer um método para administrar anti-TNF-alfa de modo intravenosa, subcutânea, oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

É um objetivo adicional de a invenção alcançar a afinidade ligante do anticorpo de domínio único monovalente.

RESUMO DA INVENÇÃO

Uma modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa que compreende pelo menos um anticorpo de domínio único anti-TNF-alfa. Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima no qual um anticorpo de domínio único corresponde a uma sequência representada por qualquer SEQ ID nº: 1 a 16 e 79 a 84.

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima compreendendo ainda pelo menos um anticorpo de domínio único direcionado contra a proteína do soro.



Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima no qual a dita proteína do soro ser qualquer albumina do soro, imunoglobulinas do soro, proteína ligante da tiroxina, transferrina, ou fibrinogênio.

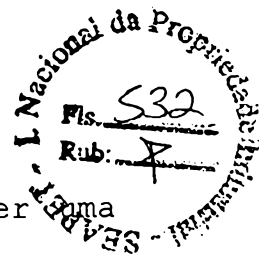
Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima no qual anticorpo de domínio único da proteína anti-soro de domínio único corresponde a seqüência representada por qualquer uma das SEQ ID n°: 26 a 29 e 85 a 97.

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima correspondente à seqüência representada por qualquer uma das SEQ ID n°: 30 a 43.

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima compreendendo também pelo menos um anticorpo de domínio único selecionado do grupo que consiste de anticorpo de domínio único anti-IFN-gama, anticorpo de domínio único receptor do anti-TNF-alfa e anticorpo de domínio único receptor do anti-IFN-gama.

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima, no qual o número de anticorpos de domínio único, direcionados contra o TNF-alfa, é pelo menos dois.

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima que



corresponde a uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID nº: 73 a 76.

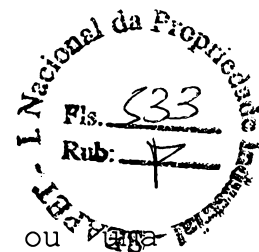
Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima, no qual pelo menos um anticorpo de domínio único é um camelídeo VHH humanizado.

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima, no qual um camelídeo VHH humanizado corresponde a uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID nº: 17 a 19 e 21 a 24.

Uma outra modalidade da presente invenção é uma composição que compreende um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima e pelo menos um anticorpo de domínio único selecionado do grupo que consiste de anticorpo de domínio único anti-IFN-gama, anticorpo de domínio único receptor do anti-TNF-alfa e anticorpo de domínio único receptor do anti-IFN-gama, para as administrações simultâneas, separadas ou sequenciais a um paciente.

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima, ou uma composição como descrita acima, na qual pelo menos um anticorpo de domínio único anti-IFN-gama que corresponde a uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID nº: 44 a 72.

Uma outra modalidade da presente invenção é um



polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima, ou
composição como descrita acima, na qual o dito anticorpo de
domínio único é uma sequência homóloga, uma parte funcional,
ou uma parte funcional de uma sequência homóloga do
5 anticorpo de domínio único de comprimento completo.

Uma outra modalidade da presente invenção é
polipeptídeos anti-TNF-alfa como descrito acima, ou uma
composição como descrita acima, na qual o polipeptídeo anti-
TNF-alfa é uma sequência homóloga, uma parte funcional, ou
10 uma parte funcional de uma sequência homóloga do
polipeptídeo anti-TNF-alfa de comprimento completo.

Uma outra modalidade da presente invenção é um
polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima, ou uma
composição como descrita acima, na qual pelo menos um
15 anticorpo de domínio único é um camelídeo VHH.

Uma outra modalidade da presente invenção é um ácido
nucléico que codifica um polipeptídeo anti-TNF-alfa como
descrito acima.

Uma outra modalidade da presente invenção é um método
20 para identificar um agente que modula a ligação de um
polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima, ao fator de
necrose tumoral alfa que compreende as etapas de:

(a) contatar um polipeptídeo anti-TNF-alfa como
descrito acima com um alvo que seja fator de necrose tumoral
25 alfa, na presença e na ausência de um candidato modulador
sob condições permitir a ligação entre polipeptídeo e dito



alvo, e

(b) medir a ligação entre o polipeptídeo e o alvo da etapa (a), na qual uma diminuição na ligação na presença do dito candidato modulador em relação à ligação na ausência do dito candidato modulador, o dito candidato modulador identificado como um agente que modula a ligação do fator de necrose tumoral alfa para seu receptor.

Uma outra modalidade da presente invenção é um método para identificar um agente que modula doenças mediadas pelo fator de necrose tumoral alfa através da ligação de um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima para o fator de necrose tumoral alfa compreendendo:

(a) contatar um polipeptídeo anti-TNF-alfa, como acima descrito, com um alvo que seja fator de necrose tumoral alfa, na presença e na ausência de um candidato modulador sob condições que permitem a ligação entre o dito polipeptídeo e o alvo, e

(b) medir a ligação entre o polipeptídeo e o alvo da etapa (a), na qual uma diminuição na ligação na presença do dito candidato modulador, em relação à ligação na ausência de dito candidato modulador identificado, o dito candidato modulador como um agente que modula doenças mediadas pelo fator de necrose tumoral alfa.

Uma outra modalidade da presente invenção é um método para identificar um agente que modula a ligação do fator de necrose tumoral alfa a seu receptor através da ligação de um



polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima

compreende:

a) contatar um polipeptídeo anti-TNF-alfa de como descrito acima com um alvo que seja Fator de necrose tumoral alfa, na presença e na ausência de um candidato modulador sob condições permitir a ligação entre polipeptídeo e dito alvo, e

(b) medir a ligação entre o polipeptídeo e o alvo da etapa (a), na qual uma diminuição na ligação na presença do dito candidato modulador em relação à ligação na ausência do dito candidato modulador, o dito candidato modulador identificado como um agente que modula a ligação do fator de necrose tumoral alfa para seu receptor.

Uma outra modalidade da presente invenção é um kit para selecionar agentes que modulam as doenças mediadas pelo fator de necrose tumoral alfa que compreendem um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima e o fator de necrose tumoral alfa.

Uma outra modalidade da presente invenção é um agente desconhecido que modula a ligação de um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima para o fator de necrose tumoral alfa, identificado de acordo com o método descrito acima.

Uma outra modalidade da presente invenção é um agente desconhecido que modula doenças mediadas pelo fator de necrose tumoral alfa, identificado de acordo com os métodos descritos acima.



Uma outra modalidade da presente invenção é um agente desconhecido como descrito acima, onde a dita desordem é uma ou mais entre inflamação, artrite reumática, doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome inflamatória de Bowel e esclerose múltipla.

Uma outra modalidade da presente invenção é o polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima, ou um ácido nucléico como descrito acima, ou uma composição como descrita acima, ou um agente como descrito acima para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar as doenças que se relacionam aos processos inflamatórios.

Uma outra modalidade da presente invenção é o uso de um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou um ácido nucléico como descrito acima, ou uma composição como descrita acima, ou um agente como descrito acima para a preparação de um medicamento para tratar e/ou de prevenir e/ou que alivia as doenças que se relacionam às reações inflamatórias.

Uma outra modalidade da presente invenção é polipeptídeos anti-TNF-alfa como descrito acima ou uma composição como descrita acima, para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar as doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante do TNF-alfa que seja capaz passar através do ambiente gástrico sem que a substância seja inativada.

Uma outra modalidade da presente invenção é um uso de



um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou de uma
composição como descrita acima de, para a preparação de um
medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de
doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante
TNF-alfa que seja capaz de passar de por um ambiente
gástrico sem inativar a substância.

Uma outra modalidade da presente invenção é um
polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou uma
composição como descrita acima, para tratando e/ou
prevenindo e/ou aliviando as doenças suscetíveis à modulação
por uma substância modulante TNF-alfa entregue ao trato
vaginal e/ou retal.

Uma outra modalidade da presente invenção é um uso de
um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou de uma
composição como descrita acima de, para a preparação de um
medicamento para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar de
doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante
TNF-alfa liberada para o trato vaginal e/ou retal.

Uma outra modalidade da presente invenção é um
polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou uma
composição como descrita acima para tratar e/ou prevenir
e/ou aliviar as doenças suscetíveis à modulação por uma
substância modulante TNF-alfa liberada para o nariz, trato
respiratório superior e/ou o pulmão.

Uma outra modalidade da presente invenção é um uso de
um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou de uma



composição como descrita acima para a preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas as doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa liberada para o nariz, trato respiratório superior e/ou o pulmão.

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou uma composição como descrita acima para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa liberada para a mucosa intestinal, na qual a dita desordem aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal.

Uma outra modalidade da presente invenção é o uso de um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou de uma composição como descrita acima para a preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa liberada para a mucosa intestinal, na qual a dita desordem aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal.

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou uma composição como descrita acima para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa, a qual é capaz de passar efetivamente por baixo do tecido da língua.

Uma outra modalidade da presente invenção é o uso de



um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou de uma
composição como descrita acima para a preparação de um
medicamento para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar de
doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante
TNF-alfa, a qual é capaz de passar efetivamente por baixo do
tecido da língua.

Uma outra modalidade da presente invenção é um
polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou uma
composição como descrita acima para tratar e/ou prevenir
e/ou aliviar as doenças suscetíveis à modulação por uma
substância modulante TNF-alfa, a qual é capaz de passar,
efetivamente, através da pele.

Uma outra modalidade da presente invenção é o uso de
um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima ou de uma
composição como descrita para a preparação de um medicamento
para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar as doenças
suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-
alfa, a qual é capaz de passar, efetivamente, através da
pele.

Uma outra modalidade da presente invenção é um método
como descrito acima, um kit como descrito acima, um ácido
nucléico ou um agente como descrito acima, um uso de um
ácido nucléico ou um agente como descrito acima, uma
composição como descrita acima, uso de uma composição como
descrita acima, um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito
acima, uso de um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito



acima, onde as ditas doenças ser inflamações, artrite reumática, doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome inflamatória de Bowel, esclerose múltipla, doença de Addison, hepatite auto-imune, parotidite auto-imune, diabetes do tipo I, epididimite, glomerulonefrite, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barré, doença de Hashimoto, anemia hemolítica, lúpus eritematoso sistêmico, infertilidade masculina, esclerose múltipla, miastenia grave, Pênfigo, psoríase, febre reumática, artrite reumática, síndrome de sarcoidose, escleroderma, síndrome de Sjogren, espôndilo artropatias, tireoidite, e vasculites.

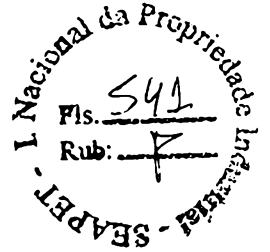
Uma outra modalidade da presente invenção é uma composição que compreende um ácido nucléico ou um agente como descrito acima, um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima, ou uma composição como descrita acima, e um veículo farmacêutico apropriado.

Uma outra modalidade da presente invenção é um método para diagnosticar uma doença definida pela disfunção do fator de necrose tumoral alfa, compreendendo:

(a) contatar uma amostra com um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima,

b) detectar a ligação do dito polipeptídeo para a dita amostra, e

(c) comparar a ligação detectada na etapa (b) com um padrão onde a diferença na ligação em relação à dita amostra é diagnosticada de uma desordem definida pela disfunção do



fator de necrose tumoral alfa.

Uma outra modalidade da presente invenção é um kit para selecionar uma doença como citada acima, usando um método como descrito acima.

5 Uma outra modalidade da presente invenção é um kit para selecionar uma doença como citada acima de compreendendo um polipeptídeo anti-TNF-alfa isolado como descrito acima.

10 Uma outra modalidade da presente invenção é o uso do polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima para a purificação do dito fator de necrose alfa.

15 Uma outra modalidade da presente invenção é o uso de um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima, para inibir a interação entre o fator de necrose tumoral alfa e um ou mais receptores do fator de necrose tumoral alfa.

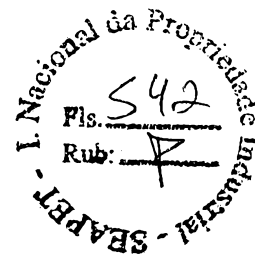
Uma outra modalidade da presente invenção é um método para produzir um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima compreendendo as etapas de:

20 (a) obter o DNA dúplex que codifica um camelídeo VHH direcionado ao fator de necrose tumoral alfa, e

(b) clonar e expressar o DNA selecionado na etapa (b).

Em uma modalidade da presente invenção é um método para produzir um polipeptídeo anti-TNF alfa como descrito acima compreendendo as etapas de:

25 (a) cultivar as células hospedeiras que compreendem o ácido nucléico capaz de codificar um polipeptídeo anti-TNF-



alfa de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, 13 a 16, sob condições que permitam a expressão do polipeptídeo, e

(b) recuperar o polipeptídeo produzido da cultura.

Uma outra modalidade da presente invenção é um método
5 como descrito acima, onde células hospedeiras são fermentáveis ou bacterianas.

Uma outra modalidade da presente invenção é um kit
para selecionar qualquer inflamação, artrite reumática,
doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome de bowel
10 inflamatórias ou esclerose múltipla compreendendo um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito acima.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS E DAS TABELAS

Figura 1, alinhamento do VHH's TNF anti-humano como
15 descrito no exemplo 1.

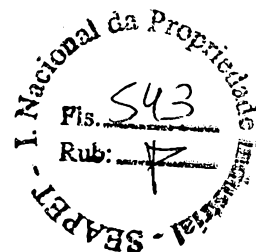
Figura 2, séries de diluições do VHHs TNF-alfa anti-humano como testado na ELISA de acordo com o exemplo 1.

Figura 3, efeito antagônico do VHH como determinado no ensaio de citotoxicidade usando a linha KYM de células
20 humanas de acordo com o exemplo 1.

Figura 4, ensaio de ligação do receptor in vitro do tipo selvagem VHH#12B e mutante A74S+Y76N+K83R+P84A

Figura 5, ensaio da ligação do receptor in vitro do tipo selvagem VHH#12B e mutante 1E + Q5LA74S + de Y76N + de
25 K83R + de P84A

Figura 6, ligação em ensaio ELISA do tipo selvagem



VHH#3E e mutante VHH

Figura 7, ensaio de ligação do receptor in vitro do tipo selvagem e mutante VHH#3E

Figura 8, alinhamentos dos TNFs anti-rato antagônicos como descrito no exemplo 3.

Figura 9, efeito antagônico do VHH TNF anti-rato como determinado no ensaio de citotoxicidade usando na linha de células murine L929 de acordo com o exemplo 3.

Figura 10, inserção de EcoRI-HindIII do vetor pAX11 (espinha dorsal pUC119) para a produção do VHH bivalente ou bioespecífico.

Figura 11, PAGE corada com coomassie (15%) do IMAC purificado mono-(lane 8), bi- (lane 1), tri-(faixas 2,3 e 5) e tetravalente (faixas 4, 6 e 7) VHH anti-TNFα.

Figura 12, cromatograma da análise por gel de filtração em superdex 75HR do VHH mono-, bi-, tri e tetravalente.

Figura 13, comparação das características antagônicas da forma mono-, bi -, tri- e tetravalente do VHH TNF anti-humano com os produtos clinicamente usados Remicade e Enbrel.

Figura 14, o comportamento antagônico do VHH mono- e bivalente direcionados contra TNF alfa do rato.

Figura 15, PAGE corada com coomassie da fusão derivada de VHH-Fc do LgG1 descrita no exemplo 4.

Figura 16, eficácia antagônica da fusão derivada de



VHH-Fc do VHH#3E comparado com o formato bivalente de VHH#3E como determinado no bioensaio.

Figura 17, ELISA de referência e pepsina tratada TNF3E a pH2.2, pH3.2 e pH4.2 (100% é o sinal medido em uma diluição de 1/100)

Figura 18, ajuste experimental.

Tabela 1, lista da sequência de aminoácido dos peptídeos dos aspectos da presente invenção direcionados contra o TNF-alfa.

Tabela 2, lista das reações da metagênese, mutagênico primário e moldes usados para a mutagênese do VHH#12B.

Tabela 3, lista das reações da metagênese, de iniciador metagênico e placas usadas para a metagênese do VHH#3E.

Tabela 4, Vista geral do VHH do tipo humanizado e selvagem.

Tabela 5, albumina de soro anti-rato e albumina de soro + TNF-alfa.

Tabela 6, lista da sequência de aminoácido dos VHH's direcionados contra o IFN-gama humano.

Tabela 7, seqüências bivalente do VHH (BIV 3E, BIV#m3F), trivalente (TRI3E) ou tetravalente (TETRA 3E) das seqüências direcionadas contra TNF-alfa.

Tabela 8, homologias fracionárias entre as seqüências de aminoácido da albumina do soro VHHs anti-rato da



invenção.

Tabela 9, homologias fracionárias entre o VHHs anti-TNF-alfa da invenção.

Tabela 10, porcentagem das homologias fracionárias entre o VHHs anti-IFN-gama da invenção.

Tabela 11, programação do tratamento.

DESCRIÇÃO DETALHADA

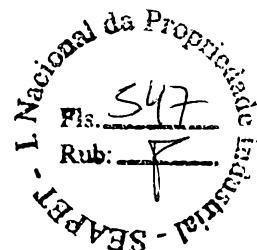
A presente invenção se relaciona a um polipeptídeo de fator de necrose alfa (TNF-alfa) antitumor compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único que são direcionados contra o TNF-alfa. A invenção também se relaciona aos ácidos nucleicos capazes de codificarem os ditos polipeptídeos.

Os anticorpos de domínio único cujas regiões determinantes complementares são parte de polipeptídeo de domínio único. Os exemplos incluem, mas não se limitam aos anticorpos de cadeia pesada, anticorpos naturalmente desprovidos de cadeias leves, anticorpos de domínio único derivados de anticorpos convencionais de 4-cadeia, anticorpos projetados e estruturações de domínio único à exceção daqueles derivados dos anticorpos. Os anticorpos de domínio único podem ser algum da arte, ou todos os anticorpos de domínio único futuros. Os anticorpos de domínio único não podem ser derivados de qualquer espécie incluindo, mas não se limitando a rato, ser humano, camelo,



lhama, cabra, coelho, bovídeos. De acordo com um aspecto
invenção, anticorpos de domínio único como aqui usado são
ocorrências naturais de anticorpo de domínio único conhecido
anticorpo de cadeia pesada desprovido de cadeias leves. Tais
5 anticorpos de domínio único são divulgados no WO 94/04678,
por exemplo. Para maior clareza, este domínio variável
derivado de um anticorpo cadeia pesada naturalmente
desprovido de cadeia leve é aqui conhecido como VHH ou
nanobody para distingui-lo do VH convencional de quatro
10 cadeias de imunoglobulina. Tal molécula de VHH pode ser
derivada de anticorpos surgidos da espécie de camelídeo, por
exemplo, no camelo, dromedário, lhama, alpaca e guanaco.
Outra espécie além de camelídeo pode produzir anticorpos de
cadeia pesada naturalmente desprovido de cadeia leve; tais
15 VHHs estão dentro do escopo da invenção. VHHs, de acordo com
a presente invenção.

De acordo com a presente invenção os VHHs conhecidos
daqueles versados na arte são direcionados aos domínios
variáveis derivados de cadeia pesada imunoglobulina e
20 naturalmente desprovidos de cadeias leves tais como aqueles
derivados de camelídeo como descritos no WO 94/04678 (e
referidos aqui como domínios VHH ou nanocorpos). As
moléculas de VHH são cerca de 10x menor do que as moléculas
de IgG. Elas são polipeptídeo únicos e muito estáveis
25 resistentes a condições extremas de pH e temperatura. Além
deste, são resistentes à ação das proteases que não são



alojamentos de anticorpos convencionais. Além deste, a expressão de VHHs *in vitro* produz um elevado rendimento e VHHs funcional corretamente. Adicionalmente, os anticorpos gerados em camélideo reconhecerão os determinantes antigênicos à exceção daqueles reconhecidos pelos anticorpos gerados em vitro através do uso de bibliotecas do anticorpo ou através da imunização dos mamíferos com exceção aos camélideos (WO 9749805). Assim, o VHH's anti-TNF-alfa pode interagir de modo mais eficiente com o TNF-alfa do que com os anticorpos convencionais, obstruindo assim sua interação com o receptor TNF-alfa de modo mais eficiente.

De acordo com a invenção, o TNF-alfa é derivado de qualquer espécie. Os exemplos das espécies relevantes à invenção incluem os coelhos, cabras, ratos, camundongos, vacas, jumentos, camelos, lhamas, macacos, asnos, porquinho da índia, galinhas, carneiros, cães, gatos, cavalos, e preferivelmente seres humanos.

O TNF-alfa é também um fragmento do TNF-alfa, capaz de elicitar uma resposta imune. o TNF-alfa é também um fragmento do TNF-alfa, capaz de ligar um anticorpo de domínio único levantado contra o TNF-alfa de comprimento cheio. Um anticorpo de domínio único direcionado contra o meio de anticorpo de domínio único TNF-alfa que é capaz de ligar ao TNF-alfa com uma afinidade melhor do que 10^{-6} M.

Uma modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF, no qual os anticorpos de domínio único compreendem



camelídeo VHH direcionado contra o TNF-alfa.

Um ou o mais anticorpos de domínio único do polipeptídeo anti-TNF que são direcionados contra um TNF-alfa podem ser da mesma seqüência. Alternativamente, todos não podem ter a mesma seqüência. Está dentro do escopo da invenção que um polipeptídeo anti-TNF compreende anticorpos de domínio único anti-TNF-alfa, onde nem todos compartilham da mesma seqüência, mas que são direcionados contra o mesmo alvo, um ou mais antígeno dos mesmos

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa, no qual um anticorpo de domínio único corresponde a uma seqüência representada por qualquer uma das SEQ ID n°: 1 a 16 e 79 a 84 como mostrado na tabela 1. As ditas seqüências são derivadas de anticorpos de cadeia pesada de camelídeo (VHHs) que são direcionados contra o TNF-alfa.

A presente invenção adicionalmente se relaciona a um polipeptídeo anti-TNF-alfa, no qual o dito anticorpo de domínio único é um VHH direcionado contra o TNF-alfa, no qual o VHH pertence a uma classe que tem seqüência semelhante à humana. A classe é caracterizada por o VHHs carregar um aminoácido do grupo que consiste de glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, do triptofano, metionina, serina, threonina, asparagina, glutamina na posição 45, tal como, por exemplo, L45 e um triptofano na posição 103, de acordo com a



numeração de Kabat. A nova classe de camelídeo de anticorpos de domínio único, descrita nesta invenção (tabela 1, exemplo 1) é representada por VHH#2B (SEQ ID n°: 3) e VHH#12B (SEQ ID n° 14) que contêm os resíduos hidrofóbicos em FR2 em combinação com o resíduo hidrofóbico triptofano na posição 103.

Outras classes semelhantes à humana de anticorpos camelídeos de domínio único representadas pela sequência VHH#1A (SEQ ID n° 1), VHH#4B (SEQ ID n° 12), VHH#8-29 (SEQ ID n° 81), VHH#8-41 (SEQ ID n° 82), VHH#8-42 (SEQ ID n° 83) e VHH#8-44 (SEQ ID n° 84) (tabela 1, exemplo 1) foram descritas no W0 03035694 e contêm os resíduos hidrofóbico FR2, tipicamente, encontrados em anticorpos convencionais de origem humana ou de outra espécie, mas compensa esta perda na hidrofiliabilidade pelo resíduo da arginina carregado nas posição 103 que substitui o resíduo conservado do triptofano presente no VH dos anticorpos de corrente dupla. Assim, os peptídeos que pertencem a estas duas classes que mostram uma alta homologia da sequência de aminoácido para as regiões de estrutura de VH humana e os ditos peptídeos podem ser diretamente administrados a um ser humano sem expectativa de uma resposta imune não desejada dos mesmos, e sem a carga de uma humanização adicional. A invenção se relaciona também aos ácidos nucléico capaz de codificar os ditos polipeptídeos.

Portanto, um aspecto da presente invenção permite a



administração direta de um polipeptídeo anti-TNF-alfa, no qual os anticorpos de domínio único pertencem à classe humanizada de VHH, e compreende uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID N°: 1, 3, 12, 14, 81, 82, 83, e 84 a um paciente na necessidade do mesmo.

Qualquer VHHs como usado pela invenção pode ser da classe tradicional ou das classes semelhantes à humana de anticorpos de camelídeo. Os ditos anticorpos podem ser direcionados contra o TNF-alfa inteiro ou um fragmento deste, ou um fragmento de uma sequência homóloga do mesmo. Estes polipeptídeos incluem os anticorpos de camelídeo de comprimento completo, nomeadamente domínios Fc e VHH, versões quiméricas de anticorpos de cadeia camelídeo de cadeia pesada com um domínio humano Fc ou VHH por si ou por fragmentos derivados.

A albumina VHH do anti-soro pode interagir de uma maneira mais eficiente com a albumina do soro do que em anticorpos convencionais que são conhecidos por ser uma proteína portadora. Como uma proteína portadora alguns dos determinantes antigênicos da albumina de soro podem ser inacessíveis para proteínas ligadas, peptídeos e por compostos químicos pequenos. Devido ao VHH ser conhecido por ligar determinantes antigênicos não convencionais ou não usuais, tais como as cavidades (WO 97/49805), a afinidade de tais VHH's para albumina circulante pode ser aumentada.

A presente invenção também se relaciona a encontrar um

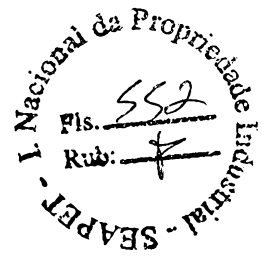


polipeptídeo anti-TNF como descrito aqui, e por compreender adicionalmente um ou mais anticorpos de domínio único direcionados contra uma ou mais proteína do soro de um paciente, surpreendentemente prolongo de maneira significativa à metade da vida da circulação do dito paciente comparada com a metade da vida do anticorpo de domínio único anti-TNF-alfa quando não parte a dita construção. Os exemplos de tais polipeptídeo são representados na tabela 5 pela SEQ ID no.: 30 a 43. Além deste, os ditos polipeptídeos foram encontrados para exibir as mesmas propriedades favoráveis dos anticorpos de domínio único tais como alta estabilidade permanecendo intacta nos ratos, resistência a pH extremo, estabilidade a alta temperatura e alta afinidade ao alvo.

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa também compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único direcionado contra um ou mais proteína do soro, o dito polipeptídeo anti-TNF-alfa compreendendo qualquer uma sequência representada pela SEQ ID n°: 30 a 43 (tabela 5).

Uma outra modalidade da presente invenção é polipeptídeo anti-TNF-alfa, no qual o anticorpo de domínio único da proteína anti-soro corresponde a uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID N°: 26 a 29 e 85 a 97 como mostrado na tabela 5.

A proteína do soro pode ser qualquer proteína



apropriada encontrada no soro do paciente. Em um aspecto da invenção, a dita proteína do soro ser qualquer albumina sérica, imunoglobulinas do soro, proteína ligante da tiroxina, transferrina, ou fibrinogênio. Dependendo da
5 intenção de uso tal como a meia vida requerida para o tratamento e/ou o compartimentalização do antígeno do alvo, o sócio VHH pode ser direcionado para uma das proteínas do soro acima.

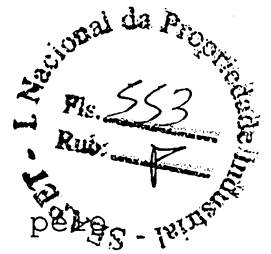
Um outro aspecto da invenção é um polipeptídeo anti-
10 TNF-alfa como aqui divulgado, adicionalmente, compreendendo pelo menos um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste de um polipeptídeo anti-IFN-gama, polipeptídeo receptor anti-TNF-alfa e polipeptídeo do receptor anti-IFN-gama.

É uma modalidade da invenção que um anticorpo de
15 domínio único direcionado contra IFN-gama corresponde a uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID no: 44 a 72 como mostrado na tabela 6.

De acordo com um aspecto da invenção, um anticorpo de domínio único é direcionado contra o receptor TNF-alfa. O
20 dito anticorpo de domínio único pode ser um camelídeo VHH.

De acordo com um aspecto da invenção, um anticorpo de domínio único é direcionado contra o receptor do IFN-gama. O dito anticorpo de domínio único pode ser um camelídeo VHH.

Um outro aspecto da invenção é um método para tratar
25 uma doença auto-imune ou uma condição como aqui citada, compreender a administração a um paciente de uma quantidade



eficaz de polipeptídeos anti-TNF-alfa que compreende pelo menos um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste de polipeptídeo anti-IFN-gama, polipeptídeo receptor anti-TNF-alfa e polipeptídeo receptor anti-IFN-gama, tais polipeptídeo juntos a cada outro como descrito de baixo.

Tais construções multi-específicas podem ter um potencial melhor para as construções inflamatórias mono-específicas do composto terapêutico.

Um aspecto da invenção é uma composição que compreende um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui revelado e pelo menos um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste de polipeptídeo anti-IFN-gama, polipeptídeo receptor anti-TNF-alfa e polipeptídeo receptor anti-IFN-gama, para as administrações simultâneas, separadas ou sequenciais a um paciente.

Um aspecto da invenção é um método para tratar a doença auto-imune que compreende administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo anti-TNF-alfa e pelo menos um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste de polipeptídeo anti-IFN-gama, polipeptídeo receptor anti-TNF-alfa e polipeptídeo receptor anti-IFN-gama, para as administrações simultâneas, separadas ou sequenciais a um paciente.

Um outro aspecto da invenção é um kit que contem um polipeptídeo anti-TNF-alfa e pelo menos um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste de polipeptídeo anti-IFN-



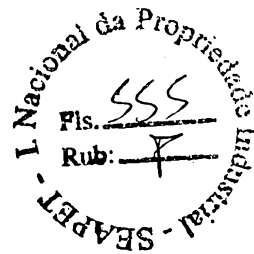
gama, polipeptídeo receptor anti-TNF-alfa e polipeptídeo receptor anti-IFN-gama, para as administrações simultâneas, separadas ou seqüenciais a um paciente. É um aspecto da invenção que o kit pode ser usado de acordo com a invenção.

5 É um aspecto da invenção que o kit pode ser usado para tratar doenças como aqui citadas.

Por meios de administração simultânea os polipeptídeos são administrados a um paciente ao mesmo tempo. Por exemplo, como uma mistura de polipeptídeo ou de uma composição que
10 compreende os ditos polipeptídeos. Os exemplos incluem, mas não se limitam a uma solução administrada de modo intravenoso, tabletes, líquido, creme tópico, etc., no qual cada preparação compreende os polipeptídeos de interesse.

Por meios de administração separada os polipeptídeos
15 são administrados a um paciente ao mesmo tempo ou substancialmente ao mesmo tempo. Os polipeptídeos estão presentes no kit como preparações separadas não misturadas. Por exemplo, os diferentes polipeptídeos podem estar presentes no kit como tabletes individuais. Os tabletes
20 podem ser administrados ao paciente através do engolimento de ambos os tabletes ao mesmo tempo, ou um tablete após o outro.

Por meios de administração simultânea os polipeptídeos são administrados a um paciente seqüencialmente. Os
25 polipeptídeos estão presentes no kit como preparações separadas e não misturadas. Há um intervalo do tempo entre



as doses. Por exemplo, um polipeptídeo pode ser administrado até 336, 312, 288, 264, 240, 216, 192, 168, 144, 120, 96, 72, 48, 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1, ou 0,5 horas após o outro componente.

5 Na administração seqüencial, um polipeptídeo pode ser administrado uma vez, ou qualquer número de vezes e em várias doses antes e/ou após a administração de um outro polipeptídeo. A administração seqüencial pode ser combinada com a administração simultânea ou seqüencial.

10 O uso médico do polipeptídeo anti-TNF-alfa descrito de baixo, se aplicam também à composição que compreende um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado e pelo menos um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste de polipeptídeo anti-IFN-gama, polipeptídeo receptor anti-TNF-
15 alfa e polipeptídeo receptor anti-IFN-gama, para as administrações simultâneas, separadas ou seqüenciais a um paciente como divulgado acima.

De acordo com um aspecto da invenção, um polipeptídeo anti-IFN-gama e um anticorpo de domínio único anti TNF-alfa
20 são direcionado contra o IFN-gama. O dito anticorpo de domínio único pode ser um camelídeo VHH.

É uma modalidade da invenção que um anticorpo de domínio único direcionado contra o IFN-gama corresponde a uma seqüência representada por qualquer uma das SEQ ID n°:
25 44 a 72 como mostrado na tabela 6.

De acordo com um aspecto da invenção, um anticorpo de



domínio único anti-TNF-alfa direcionado contra o receptor
TNF-alfa. O dito anticorpo de domínio único pode ser um
camelídeo VHH.

De acordo com um aspecto da invenção, um polipeptídeo
receptor anti-IFN-gama e um anticorpo de domínio único anti-
TNF-alfa são direcionados contra o receptor do IFN-gama. O
dito anticorpo de domínio único pode ser um camelídeo VHH.

Uma outra modalidade da presente invenção é um
polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado, no qual o
número de anticorpos de domínio único direcionados contra o
TNF-alfa é dois ou mais. Tais polipeptídeos anti-TNF-alfa
mutivalentes têm a vantagem de raramente ter alta afinidade
funcional para o alvo, mostrando mais propriedades
inibitória do que as previstas quando comparadas a seus
correspondentes monovalentes.

Os polipeptídeos multivalentes anti-TNF-alfa têm
afinidades funcionais de diversas ordens de magnitudes mais
altas do que dos polipeptídeos parentes monovalentes anti-
TNF-alfa. Os inventores descobriram que as afinidades
funcionais destes polipeptídeos multivalentes são muito mais
elevadas do daqueles relatados na arte anterior para
anticorpos bivalente e multivalentes. Surpreendentemente, os
polipeptídeos anti-TNF-alfa da presente invenção se ligam
diretamente (SEQ ID nº 77 e 78) ou através de uma sequência
de ligação curta que mostram as elevadas afinidades
funcionais esperadas teoricamente com os anticorpos

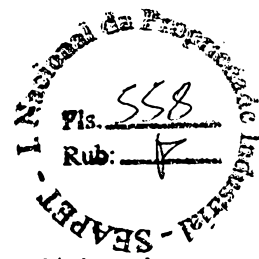


convencionais multivalentes da quatro cadeias.

Os inventores descobriram que tais atividades funcionais aumentadas podem ser detectadas preferivelmente com os antígenos compostos de multi-domínio e de proteínas multitemporicas, e também em ensaios de ligação direta ou em ensaios funcionais, por exemplo, ensaios e a citotoxicidade.

Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado, no qual o número de anticorpos de domínio único direcionados contra TNF-alfa é dois ou mais, o dito polipeptídeo anti-TNF-alfa compreende uma seqüência que corresponde a qualquer SEQ ID no.: 73 a 76.

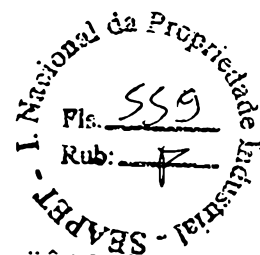
Os anticorpos de domínio único podem ser juntados para dar forma a qualquer dos polipeptídeos divulgados aqui compreendendo mais de um anticorpo de domínio único usando os métodos conhecidos na arte ou qualquer método futuro. Por exemplo, eles podem ser fundidos por reticulação química reagindo resíduos do aminoácido com um agente derivado orgânico tal como descrito por Blattler *et.al*, biochemistry 24,1517-1524; EP294703. Alternativamente, os anticorpos de domínio únicos podem ser geneticamente fundidos ao nível do DNA, por exemplo, a construção do polinucleotídeo formado que codifica a construção completa do polipeptídeo que compreende um ou mais anticorpos do domínio único antialvo e um ou mais anticorpos do domínio únicos da proteína anti-soro. Um método para produzir uma construção bivalente ou



multivalentes do polipeptídeo VHH é divulgado no pedido de patente PCT WO96/34103. Um meio de juntar anticorpos múltiplos de domínio único é através da rota genética por ligação das seqüências codificadas do anticorpo de domínio único diretamente ou através de um peptídeo ligador. Por exemplo, a extremidade terminal C do primeiro anticorpo de domínio único pode ser ligada à extremidade terminal N do seguinte anticorpo de domínio único. Este modo de ligação pode ser prolongado para ligar adicionalmente anticorpos de domínio único para a construção e a produção de construções funcionais tri-, tetra-, etc.

De acordo com um aspecto da presente invenção, os anticorpos de domínio único são ligados diretamente sem o uso de um ligador. De modo contrário para juntar os anticorpos convencionais volumosos onde uma seqüência ligadora é necessária para reter a atividade de ligação em duas subunidades, os polipeptídeos da invenção podem ser ligados diretamente (SEQ ID n° 77 e 78) evitando, assim, problemas em potencial da seqüência ligadora, tais como o antígeno quando administrado a um sujeito humano, e a instabilidade da seqüência ligadora que leva a desteciação das subunidades.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, os anticorpos de domínio único são ligados através de uma seqüência ligadora do peptídeo. Tal seqüência ligadora pode ser uma seqüência que corre de modo natural ou uma seqüência



que corre de modo não natural. É esperado que a sequência ligadora não seja imunogênica ao paciente para o qual o polipeptídeo anti-TNF-alfa é administrado. A sequência ligadora pode fornecer flexibilidade suficiente ao polipeptídeo multivalente anti-TNF-alfa, ao mesmo tempo sendo resistente à degradação proteolítica. Um exemplo não limitativo de uma sequência ligadora é uma que se derive da região de vezes do VHHS no WO 96/34103.

De acordo com um outro aspecto da invenção, os únicos anticorpos multivalentes de domínio único que compreendem mais de dois anticorpos de domínio único podem ser ligados um ao outro diretamente ou através de uma sequência ligadora. Tais construções são difíceis de se produzir com anticorpos convencionais e devido ao atraso das subunidades volumosas, a funcionalidade será perdida ou extremamente diminuída ao invés de aumentar consideravelmente como visto com o VHH da invenção comparada à construção monovalente (ver figura 12 para análises do gel de filtração de tais construções multivalentes de VHH).

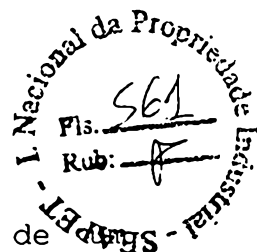
As construções do polipeptídeo divulgadas aqui podem ser feitas por técnicos versados de acordo com métodos conhecidos na arte ou em qualquer método futuro. Por exemplo, VHHS pode ser obtido usando os métodos conhecidos na arte como imunizar um camelo e obter hibridomas do mesmo, ou clonar uma biblioteca de anticorpos de domínio único usando as técnicas moleculares da biologia conhecida na arte



e subsequente selecionar por uso da exposição do bacteriófago.

De acordo com um aspecto da invenção um polipeptídeo anti-TNF-alfa pode ser uma sequência homóloga de um polipeptídeo comprimento completo do anti-TNF-alfa. De acordo com um outro aspecto da invenção, o polipeptídeo anti-TNF-alfa pode ser uma parte funcional de um polipeptídeo anti-TNF-alfa de comprimento completo. De acordo com um outro aspecto da invenção, um polipeptídeo anti-TNF-alfa pode ser uma sequência homóloga de um polipeptídeo anti-TNF-alfa de comprimento completo. De acordo com um outro aspecto da invenção, um polipeptídeo anti-TNF-alfa pode ser uma parte funcional de uma sequência homóloga de um polipeptídeo anti-TNF-alfa de comprimento completo. De acordo com um aspecto da invenção um polipeptídeo anti-TNF-alfa pode compreender uma sequência de um polipeptídeo anti-TNF-alfa.

De acordo com um aspecto da invenção um anticorpo de domínio único usado para formar um polipeptídeo anti-TNF-alfa pode ser um anticorpo domínio único completo (por exemplo, um VHH) ou uma sequência homóloga deste. De acordo com um outro aspecto da invenção, um anticorpo de domínio único usado para formar a construção do polipeptídeo pode ser uma parte funcional de um anticorpo de domínio único completo. De acordo com um outro aspecto da invenção, um anticorpo de domínio único usado para dar forma à construção

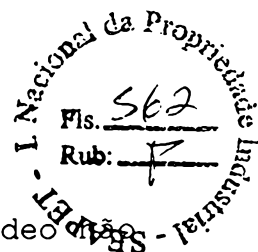


do polipeptídeo pode ser uma sequência homóloga de um anticorpo de domínio único completo. De acordo com um outro aspecto da invenção, um anticorpo de domínio único usado para dar forma à construção do polipeptídeo pode ser uma parte funcional de uma sequência homóloga de um anticorpo de domínio único completo.

Como usado aqui, uma sequência homóloga da presente invenção pode compreender adições, apagamentos ou substituições de um ou mais aminoácidos, que não alteram substancialmente as características funcionais dos polipeptídeos da invenção. O número de apagamentos ou de substituições de aminoácido é de preferivelmente até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 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 ou 70 aminoácidos.

Uma sequência homóloga de acordo com a presente invenção pode um polipeptídeo ser modificado pela adição, pelo apagamento ou pela substituição dos aminoácidos, dita modificação não altera substancialmente as características funcionais comparadas com o polipeptídeo não modificado.

Uma sequência homóloga de acordo com a presente invenção pode ser um polipeptídeo modificado pela adição, pelo apagamento ou pela substituição dos aminoácidos, a dita modificação que não altera substancialmente as



características funcionais comparadas com o polipeptídeo original
modificado.

Uma sequência homóloga de acordo com a presente
invenção pode ser uma sequência que exista em outra espécie
de camelídeo tal como, por exemplo, camelo, dromedário,
lhama, alpaca, guanaco etc.

Onde a sequência homóloga indica a identidade da
sequência, isto significa uma sequência que apresenta uma
elevada identidade da sequência (mais do que 70%, de 75%, de
80%, de 85%, de 90%, de 95% ou de 98% da identidade da
sequência) com a sequência pai e preferivelmente
caracterizada por propriedades similares da sequência pai,
ou seja, afinidade, e a dita identidade calculada usando
métodos conhecidos.

Alternativamente, uma sequência homóloga pode também
ser qualquer sequência de aminoácido resulte das
substituições permitidas para qualquer número de posições da
sequência pai de acordo com a fórmula abaixo:

Ser substituída por Ser, Thr, Gly, e Asn;

Arg substituída por um de Arg, His, Gin, Lys, e Glu;

Leu substituída por um de leu, Ile, Phe, Tyr, Met, e Val;

Pro substituído por um de Pro, Gly, Ala, e Thr;

Thr substituída por um de Thr, Pro, Ser, Ala, Gly, His, e Gin;

Ala substituída por um de Ala, Gly, Thr, e Pro;

Val substituída por um de Val, Met, Tyr, Phe, Ile, e Leu;

Gly substituída por um de Gly, Ala, Thr, Pro, e Ser;



Ile substituída por um de Ile, Met, Tyr, Phe, Val, e Leu;

Phe substituída por um de Phe, Trp, Met, Tyr, Ile, Val, e Leu;

Tyr substituída por um de Tyr, Trp, Met, Phe, Ile, Val, e Leu;

His substituída por um de His, Glu, Lys, Gin, Thr, e Arg;

5 Gin substituída por um de Gin, Glu, Lys, Asn, His, Thr, e Arg;

Asn substituída por um de Asn, Glu, Asp, Gin, e Ser;

Lys substituída por um de Lys, de Glu, Gln, His, e Arg;

Asp substituída por um de Asp, Glu, Asn;

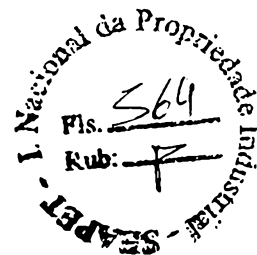
Glu substituída por um de Glu, Asp, Lys, Asn, Gin, His, e Arg;

10 Met substituída por um Met, Phe, Ile, Val, Leu, e Tyr.

Uma sequência homóloga do nucleotídeo de acordo com a presente invenção pode se referir às sequências do nucleotídeo de mais do que 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 ou 1000 nucleotídeos capazes de hibridizar ao
15 complemento reverso da sequência do nucleotídeo capaz de codificar a sequência da patente, sob estritas condições de hibridação (tais como aquelas descritas por Sambrook et al., Molecular Cloning Laboratório Manuel, Cold Spring, Harbor Laboratory press, New York).

20 Como aqui usado, uma parte funcional se refere a uma sequência de um anticorpo de domínio único que é de tamanho suficiente de modo que a interação de interesse seja mantida com afinidade de 1×10^{-6} M ou melhor.

25 Alternativamente, uma parte funcional compreende um apagamento parcial da sequência de aminoácido completa e ainda mantém o local de ligação e o domínio da proteína



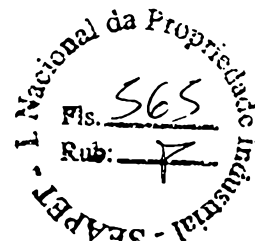
necessário para a ligação e interação com o alvo.

Como usados aqui, uma parte funcional se refere a menor do que 100% da sequência completa (por exemplo, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% e etc.), mas compreende cinco ou mais aminoácidos ou quinze ou mais nucleotídeos.

Os alvos como mencionados aqui, tais como o TNF-alfa, receptor TNF-alfa, proteínas do soro (por exemplo, albumina sérica, imunoglobulinas do soro, proteína ligante de tiroxina, transferrina, fibrinogênio) e o IFN-gama, o receptor IFN-gama pode ser fragmentos dos ditos alvos. Assim um alvo é também um fragmento do dito alvo, capaz de eliciar uma resposta imune. Um alvo é também um fragmento do dito alvo, capaz de ligar a um anticorpo de domínio único levantado contra o alvo de comprimento completo.

Um fragmento como aqui usado se refere a menor do que 100% da sequência (por exemplo, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% etc.), mas compreende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais aminoácidos. Um fragmento é de comprimento suficiente de modo que a interação de interesse é mantida com afinidade de 1×10^{-6} M ou melhor.

Um fragmento como aqui usado se refere também às inserções, aos apagamentos e às substituições opcionais de um ou mais aminoácido que não alteram substancialmente a habilidade do alvo em se ligar a um anticorpo de domínio

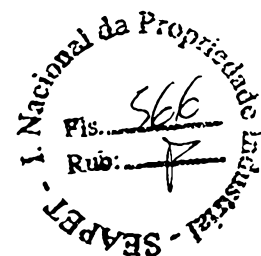


único levantado contra o alvo do tipo selvagem. O número de
apagamentos ou de substituições das inserções de aminoácido
é preferivelmente até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,
13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,
28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42,
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 ou 70
aminoácidos.

Uma seqüência homóloga da presente invenção pode
incluir um polipeptídeo anti-TNF-alfa que tenha sido
humanizado. A humanização dos anticorpos da nova classe de
VHHs adicionalmente poderia reduzir a possibilidade de
reação imunológica não desejada em um indivíduo humano sob
administração.

Uma modalidade da presente invenção se relaciona a um
método para preparar os polipeptídeos modificados baseados
em anticorpos do lhama para determinar os resíduos dos
aminoácidos de anticorpos de domínio variável (VHH) que
podem ser modificados sem diminuir a afinidade nativa do
domínio para o antígeno enquanto reduz sua imunogenicidade
em relação a uma espécie heteróloga; o uso de VHHs que tem
modificações nos resíduos identificados que são úteis para a
administração da espécie heteróloga; e ao VHH assim
modificado.

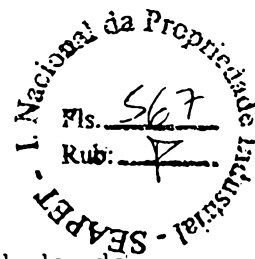
Mais especificamente, a invenção se relaciona à
preparação de VHHs modificado, que são modificadas pela



administração aos seres humanos, ao VHH resultante deles, e ao uso de tais VHHs "humanizado" no tratamento de doenças em seres humanos. Por imunização é entendido mutado de modo que a imunogenicidade sob administração em pacientes humanos seja menor ou inexistente. A humanização do polipeptídeo, de acordo com a presente invenção, compreende uma etapa de substituir um ou mais aminoácidos camelídeos por seus correspondentes humanos como encontrado no consenso da sequência humana, sem esse polipeptídeos perca seu caráter típico, isto é, a humanização não afeta significativamente a capacidade de ligação do antígeno do polipeptídeo resultante. Tais métodos são conhecidos por aqueles versados na arte.

A humanização de anticorpos de domínio único do camelídeo requer a introdução e a mutagênese de uma quantidade limitada de aminoácidos em uma única cadeia de polipeptídeo. Isto contrasta com a humanização do scFv, Fab, (Fab)₂ e IgG, que requer a introdução de mudanças do aminoácido em duas cadeias, na cadeia leve e pesada e na preservação do conjunto de ambas as cadeias.

Como um exemplo não limitativo, o polipeptídeo VHH#12B que contem resíduos similares ao humano no FR2 que foi humanizado. A humanização requer a mutagênese dos resíduos em FR1 nas posições 1 e 5 que foram introduzidas pelo iniciador usado para o repertório de clonagem e não ocorrem naturalmente na sequência do lhama. A mutagênese daqueles



resíduos não resultou na perda da ligação e/ou atividade de
inibição. A humanização requereu também a mutagênese dos
resíduos em FR3 na posição 74, 76, 83, 84, 93. A mutagênese
daqueles resíduos não resultou em uma perda dramática da
atividade de ligação e/ou inibição (ver figura 4). Combinar
as mutações de FR1 e de FR3, conseqüentemente, não afetou a
atividade de ligação e/ou inibição (figura 5). A humanização
requereu também a mutagênese dos resíduos em FR4 na posição
108. A mutagênese de Q108L resultou em um nível de produção
baixo no *Escherichia coli*. A posição 108 é exposta ao
solvente no camelídeo VHH, enquanto em anticorpos humanos
esta posição é ocultada em relação à interface VH-VL
(Spinelli, 1996; Nieba, 1997). O VHs isolado na posição 108
é exposto ao solvente. A introdução de um Leu não polar
hidrofóbico em vez de Gin polar pode ter um efeito drástico
no enovelamento/estabilidade intrínseca da molécula.

Como um exemplo não limitativo, o polipeptídeo
representado no VHH#3E contendo resíduos hallmark, na posição
37, 44, 45 e 47 com características hidrófilas, foi
humanizado. A recolocação dos resíduos hidrófilos por
resíduos humanos hidrofóbicos nas posições 44 e 45 (E44G e
R45L), não teve efeito na ligação e/ou inibição. Entretanto,
a perda da ligação e/ou da atividade de inibição foi
observada quando F37V e F47W foram introduzidos. Os dados de
Modelação confirmaram que o resíduo crítico 37 preserva a
integridade do laço de conformação CDR3 e na atividade (ver

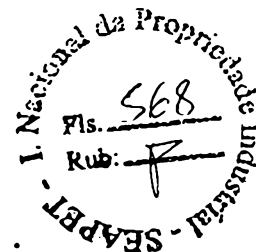


figura 6) (toda a numeração está de acordo com Kabat).

5 A SEQ ID n°: 3 e 14 indicam mais do que 90% de homologia da seqüência de aminoácido para as regiões da estrutura do VH humano e conseqüentemente o dito VHH pôde ser administrado aos pacientes diretamente sem expectativa de uma resposta imune do mesmo, e sem a carga adicional de humanização. Portanto, um aspecto da presente invenção permite a administração direta do polipeptídeo que compreende a SEQ ID N°s: 3 e 14, a seqüência homóloga
10 deste, ou uma parte funcional de uma seqüência homóloga deste a um paciente na necessidade do mesmo.

Uma modalidade da presente invenção é um método para humanizar um VHH que compreende as etapas de substituir alguns dos seguintes resíduos sozinho ou em combinação:

15 FR1 posição 1, 5, 28 e 30,
o aminoácido hallmark na posição 44 e 45 em FR2,
Resíduos FR3 74, 75, 76, 83, 84, 93 e 94;
e posições 103, 104, 108 e 111 no FR4;
numerados de acordo com a numeração de Kabat.

20 Uma modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa, ou um ácido nucléico capaz de codificar o dito polipeptídeo para o uso no tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de doenças que se relacionam aos processos inflamatórios. O TNF-alfa é envolvido em processos
25 inflamatórios, e a obstrução da ação do TNF-alfa que pode ter um efeito antiinflamatório, que é altamente desejável em



determinados estados da doença tais como, por exemplo, a doença de Crohn. Nossos exemplos demonstram VHHs de acordo com a invenção que ligam o TNF-alfa e ainda, bloqueiam sua ligação ao receptor TNF-alfa.

5 Os polipeptídeos anti-TNF-alfa da presente invenção são aplicáveis às doenças auto-imunes, tais como a doença de Addison (adrenal), doenças auto-imunes da orelha (auricular), doenças auto-imunes dos olhos (ocular), hepatite auto-imune (fígado), parotidites auto-imune
10 (glândula parótida), doença de Crohn (intestino), diabetes tipo I (pâncreas), epidimite (epididimite), glomerulonefrite (rins), doença de Graves (tireóide), síndrome do Guillain-Barre (células nervosas) doença de Hashimoto (tireóide), anemia hemolítica (células vermelhas do sangue), lupus
15 sistêmico eritematoso (tecidos múltiplos), infertilidade masculina (esperma), esclerose múltipla (células nervosas), miasthenia grave (junção neuromuscular), pênfigo (pele primária), sarna (doença de pele), febre reumática (coração e juntas), artrite reumática (juntas internas), sarcoidose
20 (tecidos múltiplos e órgãos), esclerodermia (pele e tecidos conjuntivos), síndrome de Sjogren (glândulas exócrinas, e outros tecidos), espondiloartropatias (eixo esquelético, e outros tecidos), tireoidite (tireóide), vasculites (vasos sanguíneos). Dentro do parêntese está o tecido afetado pela
25 doença. Esta lista de doenças auto-imunes é apenas exemplificativa e não limitativa.



As condições auto-imunes para que os polipeptídeos anti-TNF-alfa da presente invenção sejam aplicáveis incluem, por exemplo, AIDS, alergia atípica, asma bronquial, efizema, lepra, esquizofrenia, depressão herdada, transplante dos tecidos e dos órgãos, síndrome crônica da fadiga, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, infarto do miocárdio, pulsação, autismo, epilepsia, fenômeno de Arthus, anafilaxia, e toxicomania de álcool e de droga.

Nas condições auto-imunes acima identificadas, o tecido afetado é o alvo primário, em outros casos é o alvo secundário. Estas condições são em parte ou na maior parte síndromes auto-imunes. Conseqüentemente, o tratamento delas, é possível usando os mesmos métodos, ou os aspectos dos mesmos métodos que são revelados aqui, em combinação com outros métodos.

Uma outra modalidade da presente invenção é um uso de um polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo com a invenção, ou um ácido nucléico capaz de codificar o dito polipeptídeo para a preparação de um medicamento para tratar uma doença que se relaciona aos processos inflamatórios. Os exemplos de doenças incluem a artrite reumática, doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome inflamatória de Bowel e esclerose múltipla.

Os polipeptídeos e os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção podem ser administrados a um paciente por rotas convencionais, tais como de modo intravenoso.



Entretanto, uma propriedade especial do polipeptídeo anti-TNF-alfa da invenção é que eles penetram nas barreiras tais como nos tecidos das membranas e/ou tumores e agem localmente nos mesmos, e são suficientemente estáveis para suportar ambientes extremos, tal como o estômago. Portanto, um outro aspecto da presente invenção se relaciona à entrega de polipeptídeo anti-TNF-alfa.

Um paciente de acordo com a invenção pode ser qualquer mamífero suscetível ao tratamento por polipeptídeo terapêutico.

A entrega oral do polipeptídeo anti-TNF-alfa da invenção resulta na provisão de tais moléculas na forma ativa no cólon nos locais que são afetados pela doença. Estes locais podem estar altamente inflamados e conter células que produz TNF-alfa. Os polipeptídeos anti-TNF-alfa da invenção que ligam o TNF-alfa podem neutralizar o TNF-alfa no local, evitando a distribuição por todo o corpo, e assim limitando os efeitos colaterais negativos. Os microorganismos geneticamente modificados tal como *Micrococcus lactis* que são capazes de secretar o anticorpo ou as partes funcionais deste. Tais microorganismos modificados podem ser usados como veículos para a produção e a entrega local dos anticorpos ou partes funcionais deste no intestino. Usando uma variedade microbiana que produz o polipeptídeo anti-TNF-alfa, a síndrome inflamatória de Bowel poderia ser tratada.



Um outro aspecto da invenção envolve entregar polipeptídeo anti-TNF usando a expressão de superfície ou a secreção das bactérias não evasivas, tais como organismos gram-positivos hospedeiros como *Lactococcus spec.* usando um
5 vetor tal como descrito no WO00/23471.

Uma modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado para o uso no tratamento, prevenção e/ou em alívio dos sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa que seja
10 capaz de passar através do ambiente gástrico sem inativar a substância.

Os exemplos de doenças são qualquer uma que causa inflamação, incluindo, mas não se limitando à artrite reumática, doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome inflamatória da bacia, e esclerose múltipla. Como conhecido
15 por pessoas versadas na arte, uma vez na posse da dita construção do polipeptídeo, tecnologia da formulação pode ser aplicada para liberar uma quantidade máxima de polipeptídeos diretamente no local (no estômago, nos cólon e
20 etc.). Este método de entrega é importante no tratamento, prevenção e alívio dos sintomas de doenças cujos alvos são situados no sistema digestivo.

Um aspecto da invenção é um método para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de uma doença suscetível à
25 modulação por uma substância modulante TNF-alfa que seja capaz de passar através do ambiente gástrico sem ser



inativado, por administração oral do polipeptídeo anti-TNF-
alfa a um paciente como aqui divulgado.

Uma outra modalidade da presente invenção é um uso de
um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado para a
5 preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou
alivia os sintomas de doenças suscetíveis à modulação por
uma substância modulante TNF-alfa que seja capaz de passar
através do ambiente gástrico sem ser inativado.

Um aspecto da invenção é um método para entregar uma
10 substância modulante TNF-alfa ao sistema digestivo sem que a
dita substância seja inativada, por administração oral do
polipeptídeo anti-TNF-alfa a um paciente como aqui
divulgado.

Um aspecto da invenção é um método para entregar uma
15 substância modulante TNF-alfa na corrente sanguínea de um
paciente sem que a substância seja inativada, por
administração oral do polipeptídeo anti-TNF-alfa a um
paciente como aqui divulgado.

Uma outra modalidade da presente invenção é um
20 polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado para o uso no
tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas ou de doenças
suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-
alfa entregue ao trato vaginal e/ou retal.

Os exemplos de doenças são qualquer uma que causam
25 inflamação, incluindo, mas não se limitando à artrite
reumática, doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome



inflamatória da bacia, e esclerose múltipla. Em um exemplo não limitativo, uma formulação de acordo com a invenção compreende um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado, na forma de um gel, creme, supositório, filme, ou em forma de esponja ou como um anel vaginal que libera lentamente o ingrediente ativo com o passar do tempo (tais formulações são descritas nas patentes EP 707473, EP 684814 e US 5,629,001).

Um aspecto da invenção é um método para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa entregue ao trato vaginal e/ou retal, pela administração retal e/ou vaginal a um paciente de um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado.

Uma outra modalidade da presente invenção é um uso de um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado para a preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa entregue ao trato vaginal e/ou retal.

Um aspecto da invenção é um método para entregar uma substância modulante TNF-alfa ao trato vaginal e/ou retal sem que a dita substância seja inativa, administrando ao trato vaginal e/ou retal de um paciente um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado.

Um aspecto da invenção é um método para entregar uma



substância modulante TNF-alfa na corrente sanguínea de um paciente sem que a dita substância seja inativada, administrando ao trato vaginal e/ou retal de um paciente um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado.

5 Uma outra modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado, para o uso no tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa entregue ao nariz, trato respiratório superior e/ou
10 pulmão.

Os exemplos de doenças são qualquer uma que causar inflamação, incluindo, mas não se limitando à artrite reumática, doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome inflamatória da bacia, e esclerose múltipla. Em um exemplo
15 não limitativo, uma formulação de acordo com a invenção, compreende um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado na forma de um pulverizador nasal (por exemplo, um aerossol) ou inalador. Devido à construção do polipeptídeo ser pequena, esta pode alcançar seu alvo muito mais eficazmente
20 do que as moléculas IgG terapêuticas.

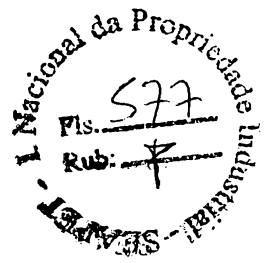
Um aspecto da invenção é um método para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante do TNF-alfa entregue ao trato respiratório superior e ao pulmão, administrando a
25 um paciente um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado, por inalação através da boca ou do nariz.



Uma outra modalidade da presente invenção é o uso de um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado para a preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa entregue ao nariz, trato respiratório superior e/ou pulmão, sem inativar o dito polipeptídeo.

Um aspecto da invenção é um método para entregar uma substância modulante TNF-alfa ao nariz, trato respiratório superior e pulmão sem inativação, administrando ao nariz, trato respiratório superior e/ou pulmão de um paciente um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado. Um aspecto da invenção é um método para entregar uma substância modulante TNF-alfa na corrente sanguínea de um paciente sem inativação administrando ao nariz, trato respiratório superior e/ou pulmão de um paciente um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado.

Uma modalidade da presente invenção é um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado para o uso no tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa entregue à mucosa intestinal, no qual a dita doença aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal. Por causa de seu pequeno tamanho, um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado pode passar através da mucosa intestinal e alcançar a corrente sanguínea mais eficientemente nos



pacientes que sofrem de doenças que causam aumento na permeabilidade da mucosa intestinal, como por exemplo, doença de Crohn.

Um aspecto da invenção é um método para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa entregue à mucosa intestinal, no qual a dita doença aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal, por administração oral do polipeptídeo anti-TNF-alfa a um paciente como aqui divulgado.

Este processo pode ser ainda, adicionalmente alcançado por um aspecto adicional da presente da invenção - o uso de portadores de transporte ativo. Neste aspecto da invenção, o VHH é fundido a um portador que aumenta a transferência através da parede intestinal na corrente sanguínea. Em um exemplo não limitativo, este "portador" é um segundo VHH que é fundido ao VHH terapêutico. Tais construções de fusão são feitas usando métodos conhecidos na arte. O "portador" VHH se liga especificamente a um receptor na parede intestinal que induz a transferência ativa através da parede.

Uma outra modalidade da presente invenção é um uso do polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado para a preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa entregue à mucosa intestinal, no qual a dita doença aumenta a permeabilidade



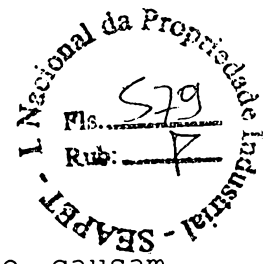
da mucosa intestinal.

Um aspecto da invenção é um método para entregar uma substância modulante TNF-alfa à mucosa intestinal sem ser inativada, pela administração oral a um paciente do polipeptídeo anti-TNF-alfa da invenção.

Um aspecto da invenção é um método para entregar uma substância modulante TNF-alfa sem ser inativada na corrente sanguínea de um paciente, pela administração oral a um paciente do polipeptídeo anti-TNF-alfa da invenção.

Este processo pode ainda ser adicionalmente obtido através de um aspecto adicional da presente da invenção - uso de portadores de transporte ativo. Neste aspecto da invenção, um polipeptídeo anti-TNF-alfa como descrito aqui é fundido a um portador que realça a transferência através da parede intestinal na corrente sanguínea. Em um exemplo não limitativo, este "portador" é um VHH que é fundido ao dito polipeptídeo. Tal fusão é feita usando métodos conhecidos na arte. O "portador" VHH se liga especificamente a um receptor na parede intestinal que induz a transferência ativa através da parede.

Uma modalidade da presente invenção é polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado para o uso no tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa que é capaz de passar eficazmente através dos tecidos por de baixo da língua.



Os exemplos de doenças são qualquer uma que causam inflamação, incluindo, mas não se limitando a artrite reumática, doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome inflamatória da bacia, e esclerose múltipla. Uma formulação da dita construção do polipeptídeo como aqui divulgada, por exemplo, tablete, pulverizador, gota é colocada sob a língua e absorvida através das membranas da mucosa na rede capilar sob a língua.

Um aspecto da invenção é um método para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa que é capaz de passar através dos tecidos por baixo da língua eficazmente, pela administração sublingual a um sujeito de uma construção do polipeptídeo, como aqui divulgada.

Uma outra modalidade da presente invenção é um uso do polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado para a preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou aliviar os sintomas de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa que possa passar através dos tecidos por baixo da língua.

Um aspecto da invenção é um método para entregar uma substância modulante TNF-alfa aos tecidos de baixo da língua sem ser inativada, administrando de modo sublingual a um sujeito o polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado.

Um aspecto da invenção é um método para entregar uma substância modulante TNF-alfa na corrente sanguínea de um



paciente sem ser inativada, administrando de modo oral ao
sujeito um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado.

Uma modalidade da presente invenção é um polipeptídeo
anti-TNF-alfa como aqui divulgado para o uso no tratamento,
5 prevenção e/ou alívio dos sintomas de doenças suscetíveis à
modulação por uma substância modulante TNF-alfa que é capaz
de passar eficazmente através da pele.

Os exemplos de doenças são qualquer uma que causam a
inflamação, incluindo, mas não se limitando à artrite
10 reumática, doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome
inflamatória da bacia, e esclerose múltipla. Uma formulação
da dita construção de polipeptídeo é, por exemplo, um creme,
película, pulverizador, gota, curativo, colocado para passar
através da pele.

15 Um aspecto da invenção é um método para tratar,
impedir e/ou aliviar os sintomas de doenças suscetíveis à
modulação por uma substância modulante TNF-alfa que é capaz
de passar eficazmente através da pele, administrando de modo
tópico a um paciente um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui
20 divulgado.

Uma outra modalidade da presente invenção é um uso de
um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado para a
preparação de um medicamento para tratar, impedir e/ou
aliviar os sintomas de doenças suscetíveis à modulação por
25 uma substância modulante TNF-alfa que é capaz de passar
eficazmente através da pele.



Um aspecto da invenção é um método para entregar uma substância modulante TNF-alfa sem ser inativada à pele, administrando de modo tópico a um paciente um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado.

5 Um aspecto da invenção é um método para entregar uma substância modulante TNF-alfa na corrente sanguínea de um paciente, administrando de modo tópico a um paciente um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado.

10 Em uma outra modalidade da presente invenção, o polipeptídeo anti-TNF-alfa adicionalmente compreende um portador anticorpo de domínio único (por exemplo, VHH) que age como um portador de transporte ativo para o transporte do dito polipeptídeo anti-TNF-alfa, do lúmen do pulmão ao sangue.

15 Um polipeptídeo anti-TNF-alfa adicionalmente compreendendo um portador que se liga especificamente a um receptor presente na superfície da mucosa (células epiteliais brônquicas) resultando no transporte ativo do polipeptídeo do lúmen do pulmão ao sangue. O portador de anticorpo de domínio único pode ser fundido à construção do polipeptídeo. Tais construções de fusão podem ser feitas usando métodos conhecidos na arte e são descritos aqui. O "portador" de anticorpo de domínio único se liga especificamente a um receptor na superfície da mucosa que
20 induz a transferência ativa através da superfície.
25

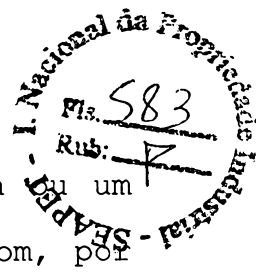
Um outro aspecto da presente invenção é um método para



determinar que anticorpos de domínio único (por exemplo VHHs) são transportados ativamente na circulação sanguínea pela administração nasal. Similarmente, uma biblioteca fagos VHH ingênua ou imune pode ser administrada nasalmente, e após diferentes intervalos de tempo após administração, o sangue ou os órgãos podem ser isolados para salvar os fagos que foram transportados ativamente à circulação sanguínea. Um exemplo não limitativo de um receptor para o transporte ativo do lúmen do pulmão para a circulação sanguínea é o Fc receptor N (FcRn). Um aspecto da invenção inclui as moléculas de VHH identificadas pelo método. Tal VHH pode então ser usado como um portador VHH para entrega de um VHH terapêutico ao alvo correspondente na circulação sanguínea por administração nasal.

Em um aspecto da invenção, pode-se usar um polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado, para selecionar os agentes que modulam a ligação do polipeptídeo TNF-alfa. Quando identificados em um ensaio que mede a ligação ou o dito deslocamento do polipeptídeo sozinho, os agentes terão que ser submetidos a um teste funcional para determinar se modulariam a ação do antígeno *in vivo*. Os exemplos de ensaios de seleção são dados primeiramente abaixo em relação a SEQ ID n°: 3, embora qualquer polipeptídeo anti-TNF-alfa como aqui divulgado possa ser apropriado.

Em um exemplo de uma experiência de deslocamento, os



bacteriófagos ou as células que expressam o TNF-alfa um
fragmento deste são incubados na ligação de tampão com, por
exemplo, um polipeptídeo representado pela SEQ ID N°: 3 que
foi rotulado, na presença ou na ausência de concentrações
5 crescentes de um modulador candidato. Para validar e
calibrar o ensaio, as reações da competição do controle
usando concentrações crescentes do dito polipeptídeo e que
não são rotulados poderem ser realizados. Após a incubação,
as células são lavadas extensivamente e limitadas, o
10 polipeptídeo é medido como apropriado para a dada etiqueta
(por exemplo, contagem de cintilação, fluorescência e etc.).
Uma diminuição pelo menos de 10% da quantidade do
polipeptídeo rotulado ligado na presença do modulador
candidato indica o deslocamento da ligação pelo modulador
15 candidato. Os moduladores candidatos são considerados
especificamente ligados neste ou outros ensaios aqui
descritos se eles deslocarem 50% do polipeptídeo rotulado
(dose de polipeptídeo subsaturado) em uma concentração de
1µM ou menos.

20 Alternativamente, a ligação ou o deslocamento da
ligação podem ser monitorados pela ressonância do plasma de
superfície (SPR). Os ensaios ressonância do plasma de
superfície podem ser usados como um método quantitativo para
medir a ligação entre duas moléculas pela mudança da massa
25 próxima a um sensor imobilizado causado pela ligação ou pela
perda da ligação de, por exemplo, o polipeptídeo



representado pela SEQ ID N°: 3 da fase aquosa para o TNF-
alfa imobilizado em uma membrana no sensor. Esta mudança na
massa é medida como unidades de ressonância versus o tempo
após a injeção ou a remoção do dito polipeptídeo ou
5 modulador candidato e medido usando um biosensor Biacore
(Biacore AB). O vWF, ou o fragmento deste podem ser, por
exemplo, imobilizado em uma microplaqueta do sensor (por
exemplo, chip CM5 classe de pesquisa; Biacore AB) em um
filme fino de membrana do lipídio de acordo com os métodos
10 descritos por Salamon et por al. (Salamon et al, 1996,
Biophys J. 71: 283-294; Salamon et al., 2001, Biophys. J.
80: 1557-1567; Salamon et al., 1999, Trends Biochem. Sci.
24: 213-219, cada um destes incorporado aqui por
referência).

15 Sarrio et al demonstrou que SPR pode ser usado para
detectar o ligante que se liga ao receptor da denosina GPCR
A(1) imobilizado em uma camada de lipídio no chipe (Sarrio
et al, 2000, Mol. Cell. Biol. 20. 5164-5174, incorporado
aqui por referência). As condições para a ligação de uma
20 construção do polipeptídeo da invenção em um ensaio de SPR
podem ser bem ajustadas por uma pessoa versada na arte
usando as condições relatadas por Sarrio et al. como um
ponto de partida.

O SPR pode ser testado por moduladores de ligação por
25 pelo menos em duas maneiras. Primeiramente, um polipeptídeo
representado pelo SEQ ID N°.: 3, por exemplo, pode ser



ligado para TNF-alfa immobilizada seguida por injeção do modulador candidato em uma concentração que varia de 0,1 nM a 1 μ M. O deslocamento do polipeptídeo ligado pode ser quantizado, permitindo a detecção da ligação do modulador.

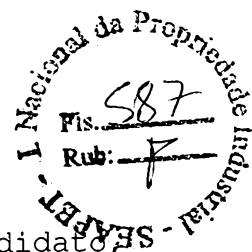
Alternativamente, a membrana de ligação TNF-alfa pode ser pré-incubado com um modulador candidato e ser desafiado com, por exemplo, um polipeptídeo representado pela SEQ ID N°.: 3.

Uma diferença em afinidade de ligação entre o dito polipeptídeo e TNF-alfa, pré-incubado com o modulador, comparado com aquele entre o dito polipeptídeo e TNF-alfa na ausência do modulador demonstrará a ligação ou o deslocamento do dito polipeptídeo na presença do modulador. Em um outro ensaio, uma diminuição de 10% ou mais na quantidade do dito polipeptídeo ligante na presença do modulador candidato, relativo à quantidade do dito polipeptídeo ligado na ausência do candidato modulador indica que o candidato modulador inibe a interação do TNF-alfa e do dito polipeptídeo.

Um outro método de detectar a inibição da ligação, por exemplo, um polipeptídeo representado pela SEQ ID N°: 3 para o TNF-alfa usa transferência de energia de fluorescente (FRET). FRET é um fenômeno mecânico do quantum que ocorre entre um doador (D) da fluorescência e um aceitador (A) da fluorescência na proximidade um do outro (geralmente $< 100\text{\AA}$ de separação) se o espectro de emissão de D sobrepor o espectro da excitação de A. As moléculas a serem testadas,



por exemplo, um polipeptídeo representado pela SEQ ID N°.: 3 e um TNF-alfa são rotulado com um par complementar de fluoróforo doador e aceitador. Quando a ligação estiver próxima ao TNF-alfa: a interação do polipeptídeo, a fluorescência emitida sobre a excitação do fluoróforo doador terá um comprimento de onda diferente daquele emitido em resposta a aquele comprimento de onda da excitação quando os ditos polipeptídeo e TNF-alfa não são ligados, fornecendo para quantificação de ligação versos moléculas não ligadas pela medida da intensidade da emissão a cada comprimento de onda. Fluoróforos doadores com os rótulos TNF-alfa são bem conhecidos na arte. De particular interesse são as variantes de A. Victoria GFP conhecido como Ciano FP (CFP, doador (d)) e FP amarelo (YFP, aceitador (a)). Como um exemplo, a variante de YFP pode ser feita como uma proteína de fusão com TNF-alfa. Os vetores para expressão de variantes de GFP enquanto as fusões (Clontech) bem como os reagentes rotulados de fluorofoforo (sondas moleculares) são conhecidos na arte. Adição de um modulador candidato para a mistura do polipeptídeo fluorescente rotulado e do YFP-TNF-alfa resultará em uma inibição de transferência de energia evidenciada, por exemplo, na diminuição da fluorescência de YFP em relação a uma amostra sem o modulador candidato. Em um ensaio usando o FRET para detecção do TNF-alfa: a interação do polipeptídeo, uma diminuição de 10% ou mais na intensidade da emissão fluorescente no comprimento de onda

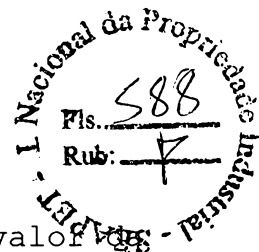


do aceitador nas amostras contendo um modulador candidato, em relação às amostras sem o modulador candidato, indicam que o modulador candidato inibe a interação do TNF-alfa:polipeptídeo.

5 Uma amostra como usada aqui pode ser qualquer amostra contendo TNF-alfa, tal como clínicas (por exemplo, frações de células, sangue total, plasma, soro, tecido, células, e etc.) derivadas de hospitais, agriculturas, medicina legal, pesquisas, ou outras amostras possíveis.

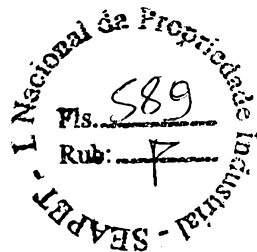
10 Uma variação no FRET usa a extinção da fluorescência para monitorar as interações moleculares. Uma molécula no par de interações pode ser rotulada com um fluoróforo, e o outro com uma molécula que extingue a fluorescência do fluoróforo quando trazida para próxima dela. Uma mudança na
15 fluorescência na excitação é indicativa de uma mudança na associação das moléculas rotuladas com o fluoróforo: par de extinções. Geralmente, um aumento na fluorescência do TNF-alfa rotulado é indicativo que a molécula de polipeptídeo que carrega o extintor foi deslocada. Para ensaios de
20 extinção houve um aumento de 10% ou mais de intensidade da emissão fluorescente nas amostras contendo um modulador candidato em relação às amostras sem o modulador candidato, isto indica que o modulador candidato inibe o TNF-alfa: interação do polipeptídeo anti-TNF-alfa.

25 Adicionalmente, a ressonância do plasma de superfície e aos métodos de superfície do FRET, a medida da polarização



da fluorescência é útil para quantizar a ligação. O valor da polarização da fluorescência para uma molécula fluorescentemente rotulada depende do tempo de correlação rotacional ou da taxa de distúrbio. Complexos, tais como aqueles formados pelo TNF-alfa associado com um polipeptídeo TNF-alfa rotulado fluorescentemente, tem valores mais elevados de polarização do que o polipeptídeo rotulado não complexado. A inclusão de um inibidor do candidato da interação do TNF-alfa:polipeptídeo anti-TNF-alfa resulta em uma diminuição na polarização da fluorescência, em relação a uma mistura sem o inibidor do candidato, caso o inibidor do candidato rompa ou iniba a interação do TNF-alfa com o dito polipeptídeo. A polarização da fluorescência é bem aceitável para identificar pequenas moléculas que rompem a formação do TNF-alfa: complexos do polipeptídeo anti-TNF-alfa. Uma diminuição de 10% ou mais na polarização da fluorescência nas amostras contendo um modulador candidato, em relação à polarização da fluorescência em uma amostra que falta o modulador candidato, indica que o modulador candidato inibe o TNF-alfa: interação do polipeptídeo TNF-alfa.

Uma alternativa para monitorar a interação do TNF-alfa: anti-TNF-alfa, usa um ensaio biosensor. Os biosensores ICS foram descritos na arte (Australian Membrane Biotechnology Research Institute; Cornell B. Braach-Maksvytis V, King L, Osman P. Raguse B. Wieczorek L, and Pace R. "A biosensor that uses ion-channel switches"



Natureza 1997, 387, 580). Nesta tecnologia, associação do TNF-alfa e um polipeptídeo anti-TNF-alfa é acoplado próximo dos canais de íons de gramicidina facilitados em biliares suspensos da membrana e assim a mudança mensurável na admitância (similar à impedância) do biosensor. Esta aproximação é linear de ordem seis de magnitude da mudança da admitância e é idealmente aceitável para seleção de alto rendimento em grande faixa para biblioteca combinatória de pequenas moléculas. Um aumento ou diminuição de 10% ou mais da mudança na admitância em uma amostra contendo um modulador candidato, em relação a admitância de uma amostra que não possui o modulador candidato, indica que o modulador candidato inibe a interação do TNF-alfa e o polipeptídeo anti-TNF-alfa. É importante observar que nos ensaios para testar a interação do TNF-alfa com o polipeptídeo anti-TNF-alfa, é possível que um modulador da interação não precisa necessariamente interagir diretamente com o domínio(s) das proteínas que interagem fisicamente com o dito polipeptídeo. É também possível que o modulador interagirá em uma posição removida do local de interação e causar, por exemplo, uma mudança adaptável nos TNF-alfa. Os moduladores (inibidores ou agonistas) que age desta maneira apesar do interesse como agentes para modular a ligação do TNF-alfa ao seu receptor.

Alguns dos ensaios de ligação descritos podem ser usados para determinar a presença de um agente em uma amostra, por exemplo, uma amostra do tecido, que liga o TNF-



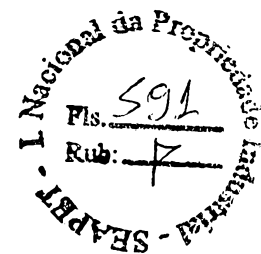
alfa, ou que afeta a ligação, por exemplo, de um polipeptídeo representado por qualquer SEQ ID No.: 3 ao TNF-alfa. O TNF-alfa é reagido com o dito polipeptídeo na presença ou na ausência da amostra, e a ligação do polipeptídeo são medidas como apropriadas para o ensaio da ligação que está sendo usado. Uma diminuição de 10% ou mais na ligação do dito polipeptídeo indica que amostra contém um agente que modula a ligação do dito polipeptídeo ao TNF-alfa. Naturalmente, o método acima generalizado pode facilmente ser aplicado para selecionar os moduladores candidatos que alteram a ligação entre qualquer polipeptídeo anti-TNF-alfa da invenção, uma sequência homóloga deste, uma parte funcional deste ou uma parte funcional de uma sequência homóloga deste, e o TNF-alfa ou um fragmento deste.

Uma modalidade da presente invenção é um agente desconhecido identificado pelo método aqui divulgado.

Uma modalidade da presente invenção é um agente desconhecido identificado pelo método aqui divulgado para o uso no tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de doenças que se relaciona aos processos inflamatórios.

Uma outra modalidade da presente invenção é um uso de um agente desconhecido identificado pelo método aqui divulgado para o uso no tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de doenças que se relaciona aos processos inflamatórios.

Os exemplos de doenças incluem artrite reumática,

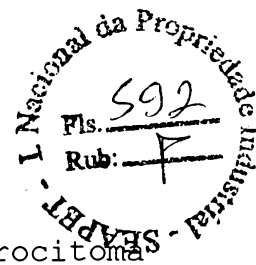


doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome inflamatória de Bowel e esclerose múltipla.

Uma célula que é útil de acordo com a invenção é selecionada, preferivelmente, do grupo que consiste em células bacterianas tais como, por exemplo, *E coli*, células de leveduras tal como, por exemplo, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, células de insetos ou células mamárias.

Uma célula útil de acordo com a invenção pode ser qualquer célula na qual uma seqüência do ácido nucléico codifica um polipeptídeo que compreende um anti-TNF-alfa da invenção, uma seqüência homóloga deste, uma parte funcional deste ou uma parte funcional de uma seqüência homóloga deste de acordo com a invenção pode ser introduzida de modo que o polipeptídeo seja expresso em níveis naturais ou níveis naturais acima, como definido aqui. Preferivelmente, um polipeptídeo da invenção que é expresso em uma célula exibe farmacologia normal ou quase normal, como definido aqui. Mais preferivelmente, um polipeptídeo da invenção que é expresso em uma célula compreende a seqüência do nucleotídeo capaz de codificar qualquer seqüências de aminoácido apresentada na tabela 1 ou capaz de codificar uma seqüência do aminoácido que seja pelo menos 70% idêntica à seqüência de aminoácido, apresentada na tabela 1.

De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, uma célula é selecionada do grupo que consiste de células-COS7, célula de CHO, célula de LM (TK-), célula NIH-

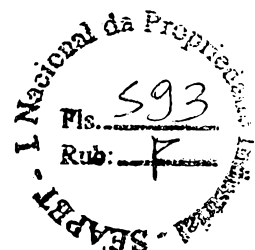


3T3, célula HEK-293, célula k-562 ou uma célula astrocitoma
1321N1, mas também em outras linhas de células
transfectáveis.

De maneira geral, "uma quantidade terapeuticamente
eficaz", "dose terapeuticamente eficaz" e "quantidade eficaz"
significam a quantidade necessária para conseguir o
resultado ou os resultados desejados (tratamento ou
prevenção da inflamação). Uma pessoa versada na arte
reconhecerá que o potencial e, conseqüentemente, "uma
quantidade eficaz" pode variar para os vários compostos que
inibem que modulam a ligação TNF-alfa usado na invenção. Uma
pessoa versada na arte pode prontamente avaliar o potencial
do composto.

Como usado aqui, o termo "composto" se refere ao
polipeptídeo anti-TNF-alfa da presente invenção, uma
composição ou um ácido nucléico capaz de codificar o dito
polipeptídeo, ou um agente identificado de acordo com o
método de seleção descrito aqui ou o dito polipeptídeo que
compreende um ou mais derivados de aminoácidos.

Por "farmaceuticamente aceitável" entende-se um
material que não é biológico ou de outro modo indesejável,
isto é, o material pode ser administrado a um indivíduo
junto com o composto sem causar nenhum efeito biológico
indesejáveis ou interagir de maneira a causar danos com
qualquer outro componente da composição farmacêutica em que
estiver contido.



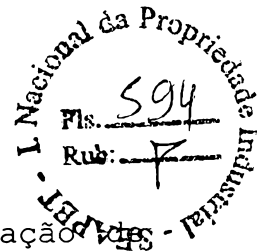
Os polipeptídeos anti-TNF-alfa como divulgados aqui
são úteis nas situações de tratamento ou prevenção a um
paciente e compreende administrar uma quantidade
farmaceuticamente eficaz de um composto ou de uma
5 composição.

Os polipeptídeos anti-TNF da presente invenção são
úteis para tratar ou impedir as condições relacionadas à
artrite reumática, doença de Crohn, colite ulcerosa,
síndrome inflamatória de Bowel e a esclerose múltipla em um
10 paciente e compreendem a administrar uma quantidade
farmaceuticamente eficaz de um composto ou de uma composição
que liga TNF-alfa.

Um aspecto da presente invenção é o uso de compostos
da invenção para tratar ou prevenir uma condição de
15 inflamação em um sujeito e em compreender administrar uma
quantidade farmaceuticamente eficaz de um composto em
combinação com outro, tal como, por exemplo, aspirina.

Os polipeptídeos anti-TNF-alfa como divulgados aqui
são úteis para tratar ou impedir as condições que se
20 relaciona à artrite reumática, doença de Crohn, colite
ulcerosa, síndrome inflamatória de Bowel e esclerose
múltipla em um paciente e compreende administrar uma
quantidade farmaceuticamente eficaz de um composto em
combinação com outro, tal como, por exemplo, aspirina.

A presente invenção não é limitada à administração das
25 formulações que compreendem um único composto da invenção.



Está dentro do escopo da invenção fornecer combinação de tratamentos na qual uma formulação é administrada a um paciente na necessidade deste compreendendo mais do que um composto da invenção.

5 As condições mediadas pelo TNF-alfa incluem, mas não são limitadas a artrite reumática, doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome inflamatória de Bowel e esclerose múltipla.

10 O composto útil na presente invenção pode ser formulado como composições farmacêuticas e ser administrado a um mamífero receptor, tal como um paciente humano ou um animal doméstico em uma variedade de formas adaptadas à rota de administração escolhida, isto é, oral ou parenteral, por inalação intranasal, intravenosa, intramuscular, tópicas ou
15 subcutâneas.

 O composto da presente invenção pode também ser administrado usando métodos de entrega da terapia de gene. Veja, por exemplo, a patente US 5,399,346 que é incorporado por referência em sua totalidade. Usando um método de
20 entrega da terapia do gene, as células primárias transfectadas com o gene para o composto da presente invenção podem adicionalmente ser transfectadas com os promotores específicos dos tecidos por órgãos alvos específicos, tecidos, desvio, tumores ou células.

25 Assim, o presente composto pode ser administrado sistemicamente, por exemplo, oralmente, em combinação com um



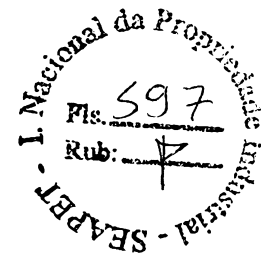
veículo farmacêuticamente aceitável tal como um diluente inerte ou um portador comestível assimilável. Podem ser incluídos em cápsulas duras ou macias de gelatina, podem ser comprimidos em tabletes, ou podem ser incorporados diretamente como alimento na dieta do paciente. Para administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser combinado com um ou mais excipientes e ser usado na forma de tabletes ingeríveis, tabletes orais, cápsulas, comprimidos, elixires, suspensões, xaropes, e similares. Tais composições e preparações devem conter pelo menos 0,1% do composto ativo. A porcentagem das composições e das preparações pode, naturalmente, ser variada e pode convenientemente estar entre cerca de 2 a aproximadamente 60% do peso de uma dada unidade de dosagem. A quantidade de composto ativo em tais composições terapêuticamente úteis é tal que um nível eficaz da dosagem é obtido.

Os tabletes, comprimidos, pílulas, cápsulas, e similares podem também conter o seguinte: ligantes tais como, goma adragante, acácia, amido de milho ou gelatina; excipientes tal como fosfato de dicálcio; agentes desagregadores tais como amido de milho, amido de batata, ácido alginico e similares; um lubrificante tal como o estearato de magnésio; e um agente adoçante tal como o sucrose, fructose, lactose ou aspartame ou um agente de sabor tal como hortelã, óleo de gaultéria, ou sabor de cereja pode ser adicionado. Quando a forma da unidade de



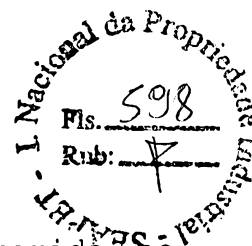
dosagem é uma cápsula, esta pode conter, além aos materiais do tipo acima, um portador líquido, tal como um óleo vegetal ou um glicol de polietileno. Vários outros materiais podem estar presentes nos revestimentos para modificar a forma física da dosagem contínua da unidade. Por exemplo, 5 tabletes, pílulas, ou cápsulas que podem ser revestidas com gelatina, cera, gomalaca, açúcar e similares. Um xarope ou um elixir pode conter no composto ativo, como agente adoçante sacarose ou frutose, como preservativos metil e propilparabens, uma tintura e agente de sabor tais como 10 cereja ou laranja. Naturalmente, qualquer material usado para preparar qualquer forma da unidade de dosagem deve ser farmacêuticamente aceitável e substancialmente não tóxico nas quantidades empregadas. Adicionalmente, o composto ativo 15 pode ser incorporado em dispositivos e preparações de sustentadas.

O composto ativo pode também ser administrado de modo intravenoso ou intraperitonealmente por infusão ou por injeção. As soluções do composto ativo ou de seus sais podem ser preparadas em água, opcionalmente misturada com um 20 surfactante não tóxico. As dispersões podem também ser preparadas em glicerol, glicóis de polietileno líquidos, triacetina, e em misturas destes e em óleos. Sob circunstâncias ordinárias de armazenamento e de uso, estas 25 preparações contêm um preservativo para impedir o crescimento de microorganismos.



As formas de dosagens farmacêuticas apropriadas para injeção ou infusão podem incluir soluções aquosas ou dispersões estéreis ou pós estéril que compreendem o ingrediente ativo que são adaptados para preparação extemporânea de soluções de dispersões injetáveis ou infusões estéril, opcionalmente encapsuladas nos liposomas. Em todos os casos, a forma de dosagem final deve ser estéril, líquido e estável sob as condições de fabricação e de armazenagem. O portador ou o veículo líquido podem ser um meio de dispersão líquido ou solvente que compreende, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, o glicerol, glicol de propileno, glicóis de polietileno líquidos, e similares), óleos vegetais, etéres gliceril não tóxico, e misturas apropriadas destes. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pela formação dos liposomas, pela manutenção do tamanho da partícula requerido no caso de dispersões ou pelo uso dos surfactantes. A prevenção da ação dos microorganismos pode ser causada por vários agentes antibacteriano e antifungal, por exemplo, parabéns, clorobutanol, fenol, ácido sorbico, timerosal e similares. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, tampões ou cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injetáveis pode causar pelo uso nas composições dos agentes de atraso na absorção, por exemplo, monostearato de alumínio e gelatina.

As soluções injetáveis estéril são preparadas



incorporando o composto ativo na quantidade requerida no
solvente apropriado com os vários outros ingredientes
enumerados acima, como necessário, seguido pelo filtro de
esterilização. No caso de pós-estéreis para preparação de
5 soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos da
preparação são secos a vácuo e as técnicas congelamento a
seco, que rendem um pó do ingrediente ativo mais qualquer
ingrediente desejado presente nas soluções filtradas
estéreis previamente.

10 Para administração tópica, o presente composto pode
ser aplicado na forma pura, isto é, quando são líquidos.
Entretanto, será geralmente desejável administrá-los à pele
como composições ou formulações, em combinação com um
portador dermatologicamente aceitável, que pode ser sólido
15 ou líquido.

Os portadores contínuos úteis incluem sólidos
divididos finamente, tais como, talco, argila, celulose
microcristalina, silicone, alumina e similares. Os
portadores líquidos úteis incluem a água, hidroxialquis ou
20 glicóis ou misturas de água-álcool/glicol, em que o presente
composto pode ser destelvido ou dispersado em níveis
eficazes, opcionalmente com a ajuda de surfactantes não
tóxico. Os adjuvantes tais como fragrâncias e agentes
antimicrobiais adicionais que podem ser adicionados para
25 otimizar as propriedades para um determinado uso. As
composições líquidas resultantes podem ser aplicadas em



lenços absorventes, usadas para impregnar as bandagens e outros curativos, ou pulverizado na área afetada usando sprays ou aerossol do tipo bomba.

Os espessantes tais como polímeros sintéticos, ácidos graxos, sais e etéres do ácido graxos, álcoois graxos, celulosas modificadas ou materiais minerais modificados também podem ser empregados com portadores líquidos para formar pastas, géis, ungüentos, sabões, e similares, para aplicação diretamente à pele do usuário.

Os exemplos de composições dermatológicas úteis que podem ser usadas para entregar o composto à pele são conhecidos na arte; por exemplo, ver Jacquet et al. (Patente US 4,608,392), Geria (Patente US 4,992,478), Smith et al. (Patente US 4,559,157) e Wortzman (Patente US 4,820,508).

As dosagens úteis do composto podem ser determinadas comparando sua atividade *in vitro*, e sua atividade *in vivo* em modelos animais. Os métodos para a extrapolação de dosagens eficazes nos ratos, e outros animais, para seres humanos são conhecidos na arte; por exemplo, ver patente US 4,938,949.

Geralmente, a concentração dos compostos em uma composição líquida, tal como uma loção, será de aproximadamente 0,1 a 25 wt-%, preferivelmente de aproximadamente 0,5 a 10 wt-%. A concentração em uma composição semi-sólida tal como um gel ou um pó será de aproximadamente 0,1 a 5 wt-%, preferivelmente



aproximadamente 0,5 a 2,5 wt-%.

A quantidade do composto, ou um sal ou um derivado ativo deste, requerida para o uso no tratamento varia não somente com o sal em particular selecionado, mas também com a rota da administração, a condição e a idade do paciente que esta sendo tratado e finalmente com a descrição do médico ou do clínico assistente. Também a dosagem do composto varia dependendo das células alvo, tumor, tecido, desvio, ou órgão.

A dose desejada pode convenientemente ser apresentada em uma única dose ou como em diversas doses administradas em intervalos apropriados, por exemplo, como dois, três, quatro ou mais sub-doses por dia. A própria sub-dose pode ser ainda mais dividida, por exemplo, em um número de administrações espaçadas discretas, tais como, múltiplas inalações de um inalador ou pela aplicação de uma pluralidade de gotas no olho.

Um regime de administração pode incluir um longo período, no tratamento diário. Por "longo prazo" significa dizer que pelo menos duas semanas e preferivelmente, várias semanas, meses, ou anos de duração. As modificações necessárias nesta faixa de dosagem podem ser determinadas por uma pessoa versada na arte usando somente a experimentação rotineira dada nos ensinamentos daqui. Ver Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, Pa. A dosagem pode também ser



ajustada pelo médico para cada caso durante qualquer complicação eventual.

A invenção fornece para um agente que é um modulador de interações de TNF-alfa/TNF-alfa-receptor.

5 O agente candidato pode ser um agente sintético, ou uma mistura dos agentes, ou pode ser um produto natural (por exemplo, um extrato de planta ou uma cultura superflutuante). Um agente candidato de acordo com a invenção inclui uma pequena molécula que possa ser
10 sintetizada, um extrato natural, peptídeos, proteínas, hidratos de carbono, lipídios e etc.

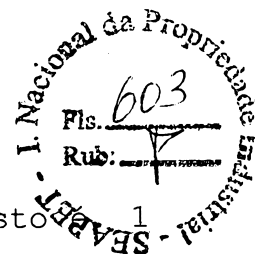
Os agentes moduladores candidatos das grandes bibliotecas de agentes sintéticos ou naturais podem ser selecionados. Os meios numerosos são usados normalmente para
15 a síntese aleatória e direcionada da sacarina, peptídeo, e agentes baseados no ácido nucléico. As bibliotecas dos agentes sintéticos estão comercialmente disponíveis por várias companhias incluindo Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon
20 Associates (Merrimack, NH), e Microsource (New Milford, CT). Uma biblioteca química rara está disponível pela Aldrich (Milwaukee, WI). As bibliotecas combinatoriais estão disponíveis e podem ser preparadas. Alternativamente, as bibliotecas de agentes naturais na forma de extratos
25 bacterianos, de fungos, das plantas e dos animais estão disponíveis, por exemplo, pela Pan Laboratories (Bothell,



WA) ou MycoSearch (NC), ou são prontamente produzidos pelos métodos conhecidos na arte. Adicionalmente, as bibliotecas e os agentes naturais e sintéticos são prontamente modificados meios químicos, físicos e bioquímicos convencionais.

5 Os agentes úteis podem ser encontrados dentro de numerosas classes químicas. Os agentes úteis podem ser agentes orgânicos, ou pequenos agentes orgânicos. Os pequenos agentes orgânicos têm um peso molecular maior do que 50, contudo menor do que cerca de 2,500 daltons, 10 preferivelmente menor do que aproximadamente 750, mais preferivelmente menor do que aproximadamente 350 daltons. As classes exemplares incluem heterociclicos, peptídeos, sacarídeos, estereoides, e similares. Os agentes podem ser modificados para aumentar a eficácia, estabilidade, 15 compatibilidade farmacêutica, e similares. A identificação estrutural de um agente pode ser usada para identificar, gerar, ou selecionar agentes adicionais. Por exemplo, onde os agentes do peptídeo são identificados, podem ser modificados em uma variedade de modo a realçar sua 20 estabilidade, tal como usar um aminoácido não natural, tal como um aminoácido D, particularmente alanina D, funcionalizando o amino ou término carboxílico, por exemplo, para o grupo amino, a acilação ou a alquilação, e para o grupo carboxil, esterificação ou amidificação, ou similares.

25 Para seleção primária, uma concentração útil de um agente do candidato de acordo com a invenção é de

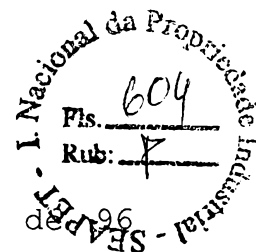


aproximadamente 10 μM a cerca de 100 μM , ou mais (isto é, 10 μM , 100 μM , 1 M etc.). A concentração primária da seleção será usada como um limite superior, junto com nove concentrações adicionais, onde as concentrações adicionais são determinadas reduzindo a concentração primária da seleção em intervalos de $\log$ (por exemplo, para mais 9 concentrações) para as seleções secundárias ou para gerar curvas da concentração.

O kit de seleção de alto rendimento

O kit de seleção de alto rendimento de acordo com a invenção compreende todos os meios necessários para executar a detecção de um agente que modula interações do receptor TNF-alfa/TNF-alfa pela interação com TNF-alfa na presença de um polipeptídeo, preferivelmente em uma concentração na faixa de 1 μM para 1 mM.

O kit compreende o seguinte. Células recombinante da invenção, compreendendo e expressando a sequência do nucleotídeo que codifica TNF-alfa, que crescem de acordo com o kit em um apóio sólido, tal como uma placa microtiter, mais preferivelmente uma placa microtiter de 96 poços, de acordo com métodos bem conhecidos por aqueles versados na arte especialmente como descrito no WO 00/02045. Alternativamente, o TNF-alfa é fornecido em uma forma purificada a ser imobilizado, por exemplo, em uma placa microtiter de 96 poços por uma pessoa versada na arte. Alternativamente o TNF-alfa é fornecido no kit pré-



imobilizado, por exemplo, em uma placa microtiter de 96 poços. O TNF-alfa pode ser o TNF-alfa inteiro ou fragmento deste.

Os agentes moduladores de acordo com a invenção, em concentrações de aproximadamente 1 μ M a 1 mM ou mais, são adicionados aos poços definidos na presença de uma concentração apropriada da dita concentração da construção do dito polipeptídeo preferivelmente na faixa de 1 μ M a 1 mM. Os kits podem conter mais do que um polipeptídeo anti-TNF-alfa (por exemplo, um ou mais de um polipeptídeo representado por qualquer SEQ ID n°: 1 a 15 ou outro polipeptídeo anti-TNF-alfa, uma sequência homologa deste, uma parte funcional deste, ou uma porção funcional deste de uma sequência homologa deste).

Ensaaios de ligação são realizados de acordo com os métodos já revelados aqui e os resultados são comparados ao nível da linha de base, por exemplo, TNF-alfa que se liga a um polipeptídeo, como por exemplo, um polipeptídeo anti-TNF-alfa, uma sequência homologa deste, uma parte funcional deste, ou uma porção funcional deste de uma sequência homologa deste, mas na ausência de agente modulador adicionado. Os poços mostram pelo menos 2 vezes, preferivelmente 5 vezes, e mais preferivelmente 10 vezes e mais preferivelmente ainda 100 vezes ou mais aumentando ou diminuindo a ligação do vWF-polipeptídeo (por exemplo) quando comparado ao nível de atividade na ausência do



modulador, são selecionados para uma análise adicional.

Outros kits úteis de acordo com a invenção

A invenção prove kits úteis para selecionar moduladores da ligação do receptor TNF-alfa/TNF-alfa, bem como os kits úteis para o diagnóstico de doenças caracterizada pela disfunção do TNF-alfa. A invenção fornece também kits úteis para selecionar moduladores de doenças, bem como kits para seu diagnóstico, a dita doença é caracterizada por um ou mais processo envolvendo TNF-alfa.

Os kits úteis de acordo com a invenção podem incluir um TNF-alfa isolado. Alternativamente, ou adicionalmente, um kit pode compreender as células transformadas para expressar o TNF-alfa. Em uma modalidade adicional, um kit de acordo com a invenção pode compreender um polinucleotídeo que codifica o TNF-alfa. Em uma modalidade mais adicional, um kit de acordo com a invenção pode compreender os iniciadores específicos úteis para a amplificação do TNF-alfa. Os kits úteis de acordo com a invenção podem compreender um polipeptídeo isolado do TNF-alfa, um homologue deste, ou uma parte funcional deste. Um kit de acordo com a invenção pode compreender células transformadas para expressar o dito polipeptídeo. Os kits podem conter mais de um polipeptídeo. Em uma modalidade adicional, um kit de acordo com a invenção pode compreender um polinucleotídeo que codifica o TNF-alfa. Em uma modalidade adicional do destilador, um kit de acordo com a invenção pode compreender os iniciadores específicos



úteis para a amplificação de uma macromolécula tal como, exemplo, TNF-alfa. Todos os kits de acordo com a invenção compreenderão os itens relatados ou combinações dos itens e conseqüentemente materiais de embalagem dos mesmos. Os kits também incluirão instruções para o uso.

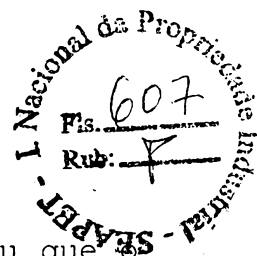
EXEMPLOS

A invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos não limitativos.

Exemplo 1: Exemplo de anticorpos camelídeo contra o fator de necrose tumoral alfa humano

1) Construção da biblioteca e imunização

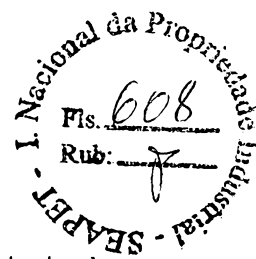
A lhama (*Llama glama*) foi imunizada com TNF-alfa humano. Para a imunização, a citonina foi formulada com uma emulsão com um adjuntor animal-amigável apropriado, (Specoll, CEDI diagnostics B. V.). O coquetel do antígeno foi administrado por injeção intramuscular de ponto duplo no pescoço. O animal recebeu 6 injeções da emulsão, contendo 100 µg do TNF-alfa em intervalos semanais. Em diferentes momentos durante a imunização, 10 ml das amostras de sangue foram coletadas do animal e foram preparados. A indução de uma resposta imune humoral foi verificada usando as amostras do soro em um teste ELISA, com TNF (dados não mostrados). Cinco dias após a última imunização, uma amostra do sangue de 150 ml foi coletada. Desta amostra, os anticorpos de cadeias pesadas convencionais (HcAbs) foram fracionados



(Lauwereys et al. 1998) e usado no ELISA, que revelou que o HcAbs foi responsável para a resposta imune humoral específica do antígeno (dados não mostrados). Os linfócitos periféricos do sangue (PBLs), como a fonte genética da imunoglobulina do lhama de cadeia pesada (HcAbs), foram isolados de 150 ml da amostra do sangue usando um gradiente de Ficoll-Paque (Armersham Biosciences) rendimento 5×10^8 PBLs. A diversidade máxima dos anticorpos é esperada ser igual ao número de linfócitos-B amostrados, que é aproximadamente 10 % do número de PBLs (5×10^7). A fração de anticorpos de cadeia pesada do lhama é até 20% do número de linfócitos-B. Conseqüentemente, a máxima diversidade do HcAbs na amostra de um sangue de 150 ml é calculada como 10^7 moléculas diferentes. O RNA total (em torno de 400µg) foi isolado destas células usando uma extração do ácido tiocianato de guanidina (Chomczynski e Sacchi, 1987).

O cDNA foi preparado em 100 µg total de RNA com transcriptase reversa MMLV (Gibco BRL) e iniciador oligo dT ou inicializador randômicos hexamucleotídeos. O cDNA foi purificado com uma extração de fenol/cloroforme, seguida por uma precipitação de etanol e subseqüentemente foi usado como molde para amplificar especificamente a biblioteca de VHH.

O repertório de VHH foi amplificado usando o cDNA oligo-dT carregado como o molde com um inicializador da estrutura simples degenerada (FR1) ABL013 (5'-GAGGTBCAR**CTGCAG**GASTCYGG-3'), introduzindo um local da



limitação de PstI (em realce), em combinação com o iniciador oligo-dT como descrito na EP01205100.9. Esta amplificação rende dois fragmentos 1650 bp e 1300 bp, o último sendo o produto derivado dos genes HcAb CH1-apagado. O menor produto PCR era gel purificado e digerido subsequentelemente com PstI e BstEII. O local do BstEII freqüentemente ocorre dentro do FR4 da cadeia pesada derivada do VHH que codifica os fragmentos do DNA.

Alternativamente, o repertório VHH foi amplificado em uma aproximação da dobradiça dependente usando dois iniciadores oligonucleotídeo específicos IgG. Em uma única reação PCR curta (5'-AACAGTTAAGCTTCCGCTTGCGGCCGGGAGCTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3') ou longa (5'-AACAGTTAAGCTTCCGCTTGCGGCCGCTGGTTGTGGTTTTTGGTGTCTTGGGTT-3) o

iniciador da dobradiça conhecido por ser específico para HcAbs foi combinado com o iniciador FR1 ABL013 (ver acima). Um local de restrição PstI e NotI (em negrito e sublinhado) foi introduzido dentro dos iniciadores FR1 e da dobradiça respectivamente, para permitir a clonagem. Subsequentelemente, os fragmentos do DNA foram ligados no vetor pAX004 phagemid PstI-BstII ou PstI-NotI digerido, que é idêntico a pHEN1 (Hoogenboom et. al., 1991), mas codificam um carboxiterminal(His)₆- e c-myc-tag para purificação e detecção respectivamente. A mistura da ligação foi desalinizada em um filtro de Microcon (YM-50, millipore) e

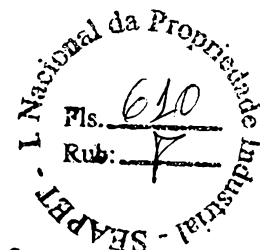


eletroporado em células *E. coli* TG1 para obter uma biblioteca que contem $1,8 \times 10^7$ clones. As células transformadas cresceram durante a noite a 37°C em uma placa simples de 20x20 cm com LB contendo 100µg/ml de ampicilina e 2 % de glicose. As colônias foram raspadas das placas usando o meio 2xTY e armazenado a 80°C em 20% de glicerol.

Quanto o controle de qualidade a porcentagem de inserção contendo clones foi verificado em 24 clones para cada biblioteca por PCR usando um vetor de combinação baseado em iniciadores. Esta análise revelou que 95 % dos clones contendo um VHH codificado inserido. A variabilidade foi examinada por análise de impressão digital HinfI do fragmento amplificado VHH destes 24 clones, desse modo mostrando que todos os clones era de fato diferentes (dados não mostrados).

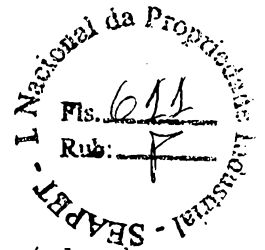
2) Seleção dos VHH's anti-TNF antagonico

Ambas as bibliotecas de fagos foram preparada. Para salvar o repertório de fagos policlonais, bibliotecas foram crescidas à fase logarítmica (OD600 = 0,5) a 37°C em 2xTY que contem 100µg de ampicilina e 2% de glicose e subsequêntemente superinfectado com o fago ajudante M13K07 por 30 minutos a 37°C. As células infectadas foram empelotadas por 5 minutos a 4000 RPM e resuspensa em 2xTY contendo 100 µg/ml ampicilina e 25 µg/ml de kanamicina. O bacteriófago foi propagado pelo crescimento durante a noite a 37°C e 250 RPM. Durante a noite as culturas foram



centrifugadas por 15 minutos a 4500 RPM e os bacteriófagos foram precipitados com um quinto volume de [20% de polietileneglicol 6000, 1,5 M NaCl]-solução por incubação por 30 minutos no gelo. Os bacteriófagos foram empelotados por centrifugação por 15 minutos a 4000xg e 4°C. Após a resuspensão dos bacteriófagos em PBS, restos celulares foram empelotados por centrifugação por 1 minuto a velocidade máxima (15000xg) em tubos de microcentrifuge. O sobrenadante que contem as partículas dos bacteriófagos foi transferido para um novo tubo e novamente os bacteriófagos foram precipitados como descrito acima. Os bacteriófagos foram destelvidos em PBS e separados do que permaneceu das células restantes como mencionado acima. O título dos bacteriófagos foram determinados pela infecção das células TG1 logarítmicas seguidas para plaquear no meio seletivo. A biblioteca foi selecionada usando TNF-alfa biotinilado *in vitro*. A biotinilação foi realizada como descrito por Magni et al (Anal Biochem 2001, 298, 181-188). A incorporação de biotina em TNF foi avaliada pela análise e detecção com o conjugado fosfatase alcalina extravidina (sigma). A funcionalidade da proteína modificada foi avaliada para que sua habilidade em ligar o recombinante revestido da fase sólida a um receptor p75.

Os VHH foram selecionados pela capturação do TNF-alfa biotinilado (10 a 400 ng por poço durante 2 horas a temperatura ambiente) nas placas microtiter revestidas de



estreptavidina (revestidas com o 100 μ l de 10 μ g/ml de estreptavidina durante 16 horas a +4°C). O VHH antagônico foi obtido pela eluição com um excesso do receptor, ainda com o domínio extracelular ligante ou com células que expressam o receptor. Após 2 horas de incubação dos bacteriófagos com citocina capturada, os bacteriófagos não específicos foram lavados, enquanto que os bacteriófagos específicos mostrando VHH antagônico foram eluídos por 30 minutos com o receptor (o domínio extracelular de CD120b ou de p75; 10 μ M) ou com o receptor que mostra células ($>10^5$ KYM células por poço). Os elevados enriquecimentos, isto é a taxa do número de bacteriófagos eluídos com receptor e aqueles eluídos pela albumina sérica (50 μ g por poço), maior do que o fator 20 sugerido para a seleção bem sucedida dos clones específicos TNF-alfa. Alternativamente, em vez da eluição com receptor, um procedimento padrão foi aplicado, no qual um baixo pH causa a desnaturação do VHH e/ou do antígeno (0,1M, pH 2,5 do tampão de glicina). A fase Log de crescimento das células do E. coli foram infectadas com bacteriófagos eluídos e neutralizados e plaqueados no meio seletivo.

Os clones foram escolhidos individualmente e cresceram na placa microtiter para a produção de VHH no sobrenadante da cultura. A seleção em ELISA com o TNF-alfa capturado em placas revestidas com extravidina revelou cerca de aproximadamente 50% de clones positivos. A análise de



impressão digital Hinfl mostrou que 13 diferentes clones foram selecionados, os quais cresceram e foram induzidos em 50 ml da escala. As seqüências dos dito clones são mostradas na tabela 1.

5 Cinco clones, codificado VHH#1A, #2B, #3E, #3G, #7B e #12B, com diferentes seqüências (figura 1) foram caracterizados mais detalhadamente. VHH#3E, #3G e #7B são fragmentos do anticorpo de domínio único que carregam o resíduo hidrofílico típico na posição 45 (arginina) e a
10 fenilalanina à substituição do triptofano na posição 47 em FR2 confere desse modo às características vantajosas em termos de solubilidade. VHH#1A contém os resíduos hidrofóbicos FR2 encontrados tipicamente em anticorpos cadeia dupla de origem humana ou de outras 10 espécies, mas
15 para compensar esta perda na hidrofilicidade pelo resíduo da arginina carregado à posição 103 que substitui o resíduo do triptofano conservado presente no VH dos anticorpos de cadeia dupla (PCT/EP02/07804). Uma nova classe dos anticorpos humanizados de domínio único dos camelídeos
20 descritos nesta invenção é representada por VHH#2B e por VHH#12B, que contem os resíduos hidrofóbicos em FR2 em combinação com o resíduo triptofano hidrofobico na posição 103. As quantidades maiores de fragmentos de anticorpos foram expressas pela cultura na escala de 50 ml e
25 purificadas por IMAC usando resina TALON (Clontech). Após a diálise contra o PBS para remover o imidazol eluente a



quantidade de VHH foi determinada por OD280; aproximadamente 300 µg de VHH foi obtido de cada clone. Este material foi usado para determinar a sensibilidade da detecção (biotinilatada) do TNF em ELISA. Para esta finalidade que uma placa microtiter revestida com estreptavidina (10µg/ml) foi empregado para a captura de TNF biotinilatado (1 µg/ml), o VHH foi diluído em 0,2% de caseína/PBS e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. O VHH de ligação foi detectado com anti-MYC mAB 9E10 (0,5 µg/ml) e conjugate AP anti-rato (1000-vezes diluídas, sigma). Os resultados são mostrados na figura 2.

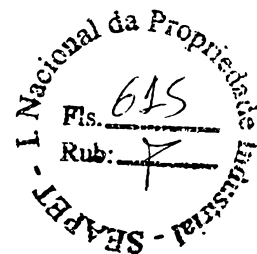
3) Determinação do efeito antagônico o no ensaio de citotoxicidade com a linha de células KYM

A citotoxicidade/citostases do TNF-alfa induzido foi determinada pelo ensaio calorimétrico MTT como descrita por Vandenameele e colegas (Vandenameele, P., Declercq, W., Vercammen, D., Van de Craen, M., Grooten, J., Loetscher, H., Brockhaus, M., Lesslauer, W., Fiers, (1992). A caracterização funcional em um receptor do fator de necrosia tumoral humana p75 em células T rato/camundongo transfectada. J. Exp. Med. 176, 1015- 1024.). MTT brometo de tetrazolium 3-(4,5-cimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) é um substrato de carcaça amarela pálida que clivado por células vivendo para render um produto formazan azul escuro. Este processo requer mitocôndria ativa, e células mortas frescas não clivada em quantidades significativas de MTT. Células



KYM (Sekiguchi M, Shiroko Y, Suzuki T, Imada M, Miyahara M, Fujii G. (1985) Caracterização de uma cadeia de células rabdomiossarcoma humana na cultura de tecidos. Biomed. Pharmacother. 39. 372-380.) foram semeados em 96 poços de
5 plaquetas microtiter e cultivados na presença ou ausência do TNF-alfa (0,216 ng/ml ou aprox. 5 pM do trimer). Adicionalmente, as quantidades variáveis de TNF de anticorpos (VHH ou Remicade) foram incluídos durante a
10 cultura a uma concentração final de 500 µg/ml e as placas foram incubadas a 37°C para conseguir a clivagem de MTT por enzimas mitocondriais. O produto formazon formado, que aparece como cristais embaçados escuros no fundo do poço, foram destelvidos pela adição do ácido isopropanol (40 mM HCl no isopropanol) ou DMSO. A absorvência é medida em 570 nm.
15

O ensaio MTT (figura 3) mostra que VHH#1A, que tem arginina na posição 103 em combinação com resíduos hidrofóbicos similares ao humano em FR2, tem um efeito antagônico moderado (IC₅₀ ~100nM). VHH#7B com os resíduos
20 hidrofílicos característicos em FR2 não impede a ligação do TNF-α a seu ligante apesar de sua sensível detecção a citocina em ELISA (curva não mostrada). Em contraste, VHH#3E e #3G com resíduos hidrofílicos do hallmark FR2 15 são VHH's antagônicos muito potentes (IC₅₀ de 20 nM). VHH#3E e #3G
25 têm um grau elevado de homologia e são relacionados de modo clonados (Harmsen et al., Mol. Immunol. 37, 579-590), mas



VHH#3E são mais potentes, provavelmente devido ao fato de que eles têm uma afinidade mais elevada do que VHH#3G (figura 2). Os anticorpos monoclonais (chimeric) Remicade são fragmento muito potentes (IC50 de 80 pM), mas seu
5 fragmento Fab derivado perde muito da eficácia (IC50 é 3nM, 30 vezes menor do que o mAB intato). Isto mostra claramente o efeito da avidéz da interação entre os anticorpos e a citocina: o mAB com dois locais de ligação interage mais eficientemente com a molécula trimerica de TNF através da
10 ligação cooperativa. Os fragmentos de VHH são estritamente monovalentes e conseqüentemente foram especulados para aumentar a avidéz para fundir geneticamente os genes VHH podendo aumentar sua eficácia antagônica (veja, o exemplo 4).

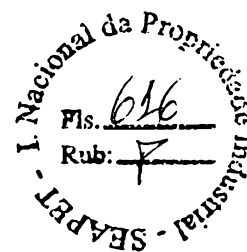
15 Estas experiências mostram que uma nova classe de VHH similar à humana tem a ligação autêntica e as características funcionais, permitindo assim sua aplicação para as finalidades terapêuticas.

Exemplo 2: Humanização do VHH#12B e VHH#3E pelo local
20 direcionado a mutagênese

1) Homologia entre VHH#3E/VHH#12B e a cadeia pesada germinais humana da região-V DP-47

Alinhamento do VHH#12B e de uma seqüência germinal humana VH3 (DP-47) revelou um grau elevado de homologia:

- 4 AA mudanças de FR1 nas posição 1,5, 28 e 30
- 5 AA mudanças de FR3 nas posição 74,76,83,84 e 93



- 1 AA mudança de FR4 na posição 108

Como representados na sequência de alinhamento a seguir:

5

DP-47 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMS WVRQAPGKGLEWVS
 AISGSGGSTYY VHH#12B QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFE NHWMY
 WVRQAPGKGLEWVS TVNTNGLITRY

10

DP-47 ADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK -----
 VHH#12B ADSVKG RFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTK
VLPPYSDDSRTNAD WGQGTQVTVSS

15

O inibidor específico para a citocina do TNF-alfa, com homologia elevada ao gene humano DP-47 germinal era conseqüentemente um candidato ideal para adicionalmente humanizar e avaliar a influência da mutagênese na capacidade de inibição em ELISA.

20

O alinhamento de VHH#3E e um germinal VH3humano (DP-47) revelaram a presença de resíduos aminoácidos hidrofílicos em FR2 de VHH#3E comparado aos resíduos hidrofóbicos em DP-47.

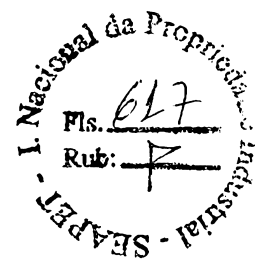
25

DP-47 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMS-----
 WVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYY
 VHH#3E QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS DHSGYTYTIG
 WFRQAPGKEREFVA RIYWSSGNTYY

30

DP-47 ADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK -----
 VHH#3E ADSVKG FAISRDIKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAA
RDGIPTSRSVESYNY WGQGTQVTVSS

A avaliação do efeito de substituir a hidrófila por resíduos hidrofóbicos como presente no VH humano é importante, porque que a maioria das seqüências VHH do



camelídeo contêm resíduos hidrofílico.

2) Mutagênese do VHH#12B

O VHH#12B foi mutado usando um não PCR baseado no local direcionado ao método da mutagênese como descrito por Chen e por Ruffner e comercializado por Stratagene (Quickchange site-directed mutagenesis). O DNA do plasmídeo foi usado como molde em combinação com 2 iniciadores mutagênicos que introduzem a mutação desejada. Os 2 iniciadores são cada um complementares as fitas opostas do DNA do plasmídeo. Em uma reação da polimerase que usa a polimerase do DNA Pfu cada fita é estendida da sequência primária durante um programa cíclico usando um número limitado de ciclos. Isto resulta em uma mistura do tipo selvagem e de fitas mutadas. A digestão com DpnI resulta na seleção da fita de DNA sintetizada mutada *in vivo*, desde que somente a fita do molde seja sensível para a digestão. O DNA foi precipitado e transformado a *E. coli* e analisado para a mutação requerida pela análise da sequência. O VHH mutante gerado e os iniciadores mutagênicos são listados na tabela 2. O plasmídeo foi preparado dos clones mutantes e foram transformado em células electrocompetente WK6. Uma única colônia foi usada para iniciar uma cultura durante a noite em LB que contem 2% glicose e ampicilina 100 µg/ml. Esta cultura durante a noite foi 100 vezes diluída em 300 ml no meio TB contendo ampicilina 100 µg/ml, e incubada a 37°C até OD_{600nm}=2, quando 1 mM MgSO₄ (concentrações finais) foram



adicionados e a cultura foi incubada por mais 3 horas a 37°C.

As culturas foram centrifugadas por 20 minutos a 4.500 RPM a 4°C. A pelota foi congelada durante a noite ou por 1 hora a -20°C. Em seguida, a pelota degelou a temperatura ambiente por 40 minutos, foi resuspensa em 20 ml PBS/1mM EDTA/1M NaCl e foi agitada no gelo por 1 hora. A fração de periplasmica foi isolada por centrifugação por 20 minutos a 4°C em 4.500 RPM. O sobrenadante que contem o VHH foi carregado em TALON (ClonTech) e purificado à homogeneidade. O rendimento de VHH foi determinado usando o coeficiente de extinção calculado. Todos os VHH mutantes são comparáveis ao tipo selvagem. Os mutantes foram analisados pela sua capacidade de inibição no ensaio de ligação do receptor in vitro. Uma placa microtiter foi revestida durante a noite a 4°C com Enbrel (Wyeth) a 2µg/ml em PBS. A placa foi lavada cinco vezes com PBS-Tween e bloqueada por 1 hora a temperatura ambiente com caseína PBS contendo 1%. A placa foi lavada cinco vezes com PBS-Tween. O TNF-alfa humano biotinilatado (80µg/ml) foi pré-incubado com uma série de diluição do mutante ou do tipo selvagem VHH#12B por 1 hora em temperatura ambiente e a mistura foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente nos poços da placa microtiter. A placa foi lavada cinco vezes com PBS-tween. O TNF-α ligado foi detectado para usar (1/1000 de diluição) paranitrofenil fosfato (pNPP). Os sinais foram medidos após 30 minutos em 405 nm. Os resultados foram apresentados nas figuras 4 e 5.



O IC50 aumentou 3-vezes de 66 nM (tipo selvagem) a 200 nM (mutante Q1E+Q5L+A74S+Y76N+K83R+P84A). A mutação da posição T93A resultou na perda da inibição (dados não mostrados). As posições que ainda necessitam ser humanizadas são: E28, E30 e Q108. Entretanto, E28 e E30 são parte da estrutura canônica H1 e assim parte do CDR1 de acordo com o sistema de numeração de Chothia. As seqüências de aminoácido dos VHHs mutantes são apresentadas na tabela 4 SEQ ID nº: 17 a 19.

3) Mutagênese de VHH#3E

O VHH#3E foi mutado usando um não PCR baseado no local direcionado ao método da mutagênese como descrito acima. O VHH's mutantes obtidos e os iniciadores mutagênico são listados na tabela 3.

Todos os VHH mutantes são comparáveis ao tipo selvagem. Os VHH's mutantes purificados foram analisados pela ligação em ELISA e pela sua capacidade de inibição no ensaio de ligação ao receptor para o método descrito acima.

Os resultados de ELISA são mostrados na figura 6, aqueles do ensaio de ligação do receptor na figura 7.

As seqüências de aminoácidos dos VHHs mutantes são apresentadas na tabela 4 SEQ ID nº 21 a 24.

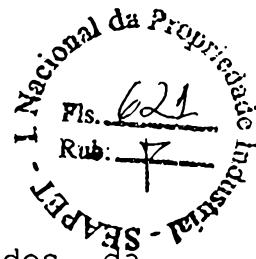
Exemplo 3: Isolamento do VHH antagônico contra o TNF-alfa do rato

1) Seleção do VHH TNF-alfa anti-rato

Para realizar um estudo da eficácia em modelos de ratos para IBD ou doença de Crohn VHH específico TNF do rato



foi selecionado. Conseqüentemente, um lhama foi imunizado com TNF-alfa do rato como descrito no exemplo 1. O RNA foi extraído da amostra do PBL 4 e 10 dias após a última imunização, assim como de uma biopsia feita de um gânglio linfático após o dia 4. O RNA total foi convertido no iniciador aleatório ou no cDNA iniciado oligo-dT e usou-se como o molde para a amplificação dos segmentos de gene codificadores do VHH usando iniciador derivado Ig ou uma combinação de iniciador oligo-dT e um iniciador Ig único (ver o exemplo 1). Com iniciadores Ig uma biblioteca que contém $8,5 \times 10^7$ clones foi gerada do primeiro PBL's, e uma biblioteca com 7×10^6 clones para a segunda amostra de PBL e $5,8 \times 10^8$ clones para o gânglio linfático. Usando a combinação do inicializador oligo-dT e as bibliotecas do iniciador Ig da primeira amostra PBL foram feitos contendo $1,2 \times 10^8$ clones, da segunda amostra de uma biblioteca de PBL's $5,7 \times 10^7$ clones e o gânglio linfático derivado da biblioteca contendo 2×10^8 clones. As bibliotecas foram conciliadas independentemente da combinação usada dos iniciadores e o resultado das duas bibliotecas foram crescidas para a propagação dos bacteriófagos como descrito anteriormente. As seleções foram executadas sobre TNF-alfa do rato biotinilatada capturado em estreptavidina revestida, bacteriófagos ligantes foram eluídos pela competição com o receptor humano p75, que é conhecido por reagir com o TNF-alfa do rato. Dois VHH específicos do TNF-alfa do rato



distintos (VHH#;m3F e VHH#;m9E) foram selecionados da biblioteca obtida pela amplificação com iniciadores derivados Ig, enquanto dois VHH relacionados próximos foram recuperados da biblioteca construída pelo PCR com iniciador olido-dT e iniciador Ig (figura 8).

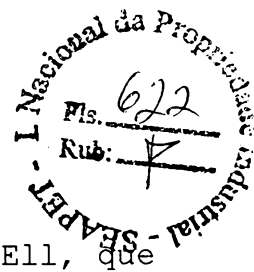
2) Determinação da eficácia antagônica no ensaio de citotoxicidade com a linha da célula L929 (figura 9)

O mesmo tipo de ensaio foi aplicado como descrito no exemplo 1, mas com a linha de célula murina L929. VHH#;m3F e VHH#;m4B (figura 9) voltando a ser 10 vezes mais potente do que os outros dois VHH.

Exemplo 4: Alcançar a eficácia antagônica aumentando a aditividade usando anticorpos camelídeos multivalentes

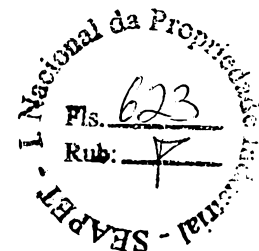
1) Eficácia antagônica do bi-, tri- e tetravalente VHH contra o TNF alfa do ser humano e do rato

O vetor de produção E. coli PaX11 (figura 10) foi projetado, para permite a clonagem em duas etapas do VHH bivalente ou biespecifico. O carboxi terminal VHH do é primeiro clonado com PstI e BstII, enquanto que na segunda etapa o outro VHH é inserido por SfiI e NotI, que não cortam dentro do primeiro fragmento do gene. O procedimento evita o e aplicação de novos locais para a amplificação e, assim o risco de introduzir erros de PCR. Com este vetor o derivado bivalente do TNF-alfa anti-humano antagônico VHH#3E foi gerado. O vetor do plasmídeo que codifica o VHH bivalente foi usado para gerar um derivado tri- e tetramérico, que foi



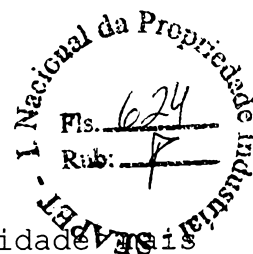
realizado pela digestão parcial do plasmídeo com BstEII, que
ocorre em ambos os segmentos do gene VHH. O vetor
linearizado purificado do gel, subsequenteemente foi
defosforilado e usado como aceitador para a clonagem do
5 fragmento BstEII de aprox. 350 bp que foram obtidos pela
digestão completa do mesmo plasmídeo. A ligação do fragmento
BstEII sozinho antes da adição ao vetor realça a inserção de
segmentos de gene codificante de VHH multimérico. Após a
transformação em E. coli TG1 o resultado dos clones foram
10 selecionados por PCR com os iniciadores de M13Rev e M13Fwd;
tendo em vista que BstEII é um cortador assimétrico
(saliência NT 5) somente as inserções corretamente
orientadas foram obtidas como foi confirmado digerindo o
plasmídeo com PstI sozinho (350 bp) ou duplo digerindo com
15 EcoRI e HindIII (1000 bp para bivalente (BIV 3E, SEQ ID n° :
73), 1350 bp para trivalente (TRI E3, SEQ ID n°: 74) e 1700
bp para tetraivalente (TETRA 3E, SEQ ID n°: 75), (dados não
mostrados). As seqüências são listadas na tabela 7.

Os clones foram crescidos e induzidos na escala de 50
20 ml, as frações periplasmicas preparadas e usadas para a
purificação IMAC com resina TALON. A análise dos produtos
purificado em Coomassiecorou PAGE revelado níveis bons de
produção (entre 2 e 10 mg por litro de cultura das células)
de VHH multivalente intacto (ver figura 11). A aparência
25 molecular do VHH purificado IMAC foi determinada pelo gel de
filtração em uma coluna de Superdex 75HR e conforme esperado



as moléculas com avidéz mais elevada vieram mais cedo da
coluna (ver figura 12).

A eficácia antagônica foi analisada com o ensaio
baseado em células usando células KYM. As células foram
semeadas em placas de microtiter e cultivadas na presença ou
na ausência do TNF-alfa (1,29ng/ml ou aprox. 25 pM do
trímero). Os ensaios (figura 13) revelaram que as moléculas
monovalentes usadas neste estudo tiveram características
antagônicas mais pobres, o que é refletido pelos seus
valores IC50: o derivado Fab do anticorpo quimérico Remicade
tem um IC50 de 2 nM e para VHH#3E é 12 nM (ver também figura
3). A aditividade das moléculas usadas passou a ter uma
influência dramática na eficácia antagônica como foi
observado com a molécula IgG bivalente Remicade, que foi 40
vezes mais efetiva (IC50 50 pM) do que o Fab. O TNF-alfa é
uma molécula trimerica que interage a um receptor dimérico e
conseqüentemente é esperado que a aditividade do IgG permita
a ligação mútua dos dois determinantes antigênicos na
citocina e suporta a formação de grandes complexos como foi
descrito anteriormente (Santora et al, anal. Biochem.
299.119-129). Surpreendentemente, aumentar a aditividade do
VHH do monômero ao dimer tem um efeito mais espetacular do
que o observado com Remicade, pois o IC50 do dimer (30 pM) é
400 vezes mais baixa do que do monômero. Aumentando a
aditividade mesmo que conduza a um comportamento antagônico
melhor: o VHH trimerico tem um IC50 de 20 pM e o formato



tetravalente 6 pM. Todos os formatos de aditividade mais alta do VHH é mais eficientes do que Remicade, enquanto o formato tetravalente é ainda melhor do que Enbrel, que consiste no domínio extracelular do receptor p75 fundido ao Fc de um IgG e, portanto, tem um modo de ligação bivalente.

O mesmo efeito inesperado do aditividade no comportamento antagônico foi observado com o VHH gerado contra do TNF do rato (figura 14). O mesmo tipo de ensaio de citotoxicidade foi realizado usando MTT como substrato e TNF-alfa do rato (65 pg/ml ou 1,3 pM), mas com a linha de células murine L929, que expressa o receptor específico do rato. Três diferentes VHH (monovalentes) antagônicos foram identificados 9E e 3F codificados, dos quais o primeiro têm 25 nM de IC50 e o último 2 nM (ver também exemplo 3). Conversão de 3F em formato bivalente (BIV#m3F, SEQ ID n°: 76) que renderam um aumento em IC50 de 1000 vezes (2 pM), demonstrando desse modo mais uma vez que a aditividade aumentada do anticorpo leva a uma melhoria inesperada das características antagônicas.

2) Comparação com a fusão VHH-fc

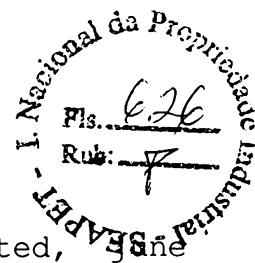
O VHH#3E, direcionado contra o TNF humano, foi clonado via PstI e BstEII em um vetor adaptado derivado de pCDNA3, gerando assim uma fusão genética ao CH1 apagado da parte Fc do IgG1 humano. Após a confirmação pela sequência, a construção do plasmídeo foi transfectada à linha NSO das células do mieloma. A linha de células obtidas cresceu e a



fusão de VHH-Fc foi secretada no sobrenadante da cultura. O produto purificado com uma resina anti-humana de Fc VHH e analisado em um gel corado com Coomassie (figura 15). Na presença de DTT a fusão era visível como uma proteína kDa 45, na ausência do DTT a molécula dimérica com um peso molecular de 90 kDa poderia ser observada. Este produto dimérica resulta da ligação de duas cadeias por duas pontes do bissulfeto, que se originam dos resíduos de cisteína situados na região de dobra. A fusão VHH foi testada no bioensaio com a linha de células humana KYM giradas para ser 5-vezes menos eficaz do que o VHH bivalente apesar do fato de que ambas as moléculas têm a mesma aditividade e que ambas originam de VHH#3E (figura 16). Provavelmente, o obstáculo estérico pela cauda volumosa de Fc pôde causar esta discrepância.

Exemplo 5: Cálculo de homologias entre os anticorpos de domínio único e antialvo da invenção

O grau de homologia entre a sequência de aminoácidos e os anticorpos de domínio único da presente invenção foi calculado usando o editor de alinhamento de sequência Bioedit. Os cálculos indicam a proporção de resíduos idênticos entre todas as seqüências enquanto são alinhados por Clustal W. (Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight



matrix choice. Nucleic Acids Research, submitted, (1994). A tabela 8 indica a fração de homologia entre a albumina anti-soro VHHs da invenção. A tabela 9 indica fração de homologia entre anti-TNF-alfas da invenção. A tabela 10 indica a percentagem da homologia entre o anti-TFN-gama VHHs da invenção.

Exemplo 6: Expressão de um fragmento VHH-CDR3 de VHH#3E

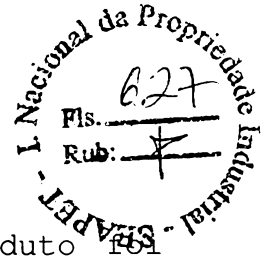
A região CDR3 de VHH#3E foi amplificada usando um iniciador de sentido situado na região da estrutura 4 (direta: CCCCTGGCCCCAGTAGTTATACG) e iniciador contra sentido situado na região da estrutura 3 (reversa: TGTGCAGCAAGAGACGG). Para clonar o CDR-3 em pAX10, um segundo ciclo de amplificação PCR foi executado com os seguintes iniciadores introduzindo os locais de restrição requeridos: O iniciador reverso SfiI:

GTCCTCGCMCTGCGGCCAGCCGGCCTGTGCAGCMGAGACGG

iniciador direto NotI:

GTCCTCGCMCTGCGGCCGCCCCCTGGCCCCAGTAGTTATACG

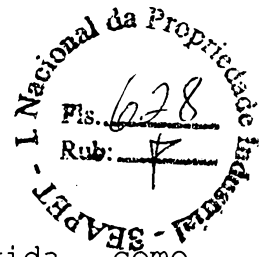
as reações PCR foram realizadas em 50 µl de volume da reação usando 50pmol de cada iniciador. As condições de reação para o PCR primário foram de 11 minutos a 94°C, seguidos por 30, 60 e 120 segundos a 94, 55, e 72°C por 30 ciclos, e 5 minutos a 72°C. Todas as reações foram realizadas com 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTP e 1,25U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Roche Diagnostics Brussels,



Belgium). Após a clivagem com Sfil e Not1 o produto foi clonado em pAX10.

Exemplo 7: Teste de estabilidade dos fragmentos de anticorpos específicos para TNF α humano

5 Administrando oralmente as proteínas a um sujeito para desnaturação ao pH ácido do estômago e também para degradação da pepsina. Nós selecionamos as condições para estudar a resistência do VHH#3E a pepsina que são supostamente reproduziu o ambiente gástrico. VHH#3E um VHH
10 específico para TNF α humano foi produzido como proteína IMAC e recombinante em *E. coli* e purificado à homogeneidade por cromatografia de gel filtragem. A concentração de proteína depois que a purificação foi determinada espectrofotometricamente usando o coeficiente de extinção
15 molar calculado em 280nm. Soluções diluídas a 100 micrograma/ml foram preparadas em tampão Mclivaine (J. Biol. Chem. 49.1921. 183) em pH 2, 3 e 4 respectivamente. Estas soluções foram subsequentemente incubadas por 15 minutos a 37°C, previamente a adição da pepsina da mucosa gástrica do
20 porco em uma relação de 1/30 w/w. Sessenta minutos após ter adicionado a protease uma amostra foi coletada e imediatamente diluída 100-vezes em PBS pH 7,4 contendo 0,1% de caseína para inativar a pepsina. Sete diluições adicionais foram preparadas três vezes desta amostra
25 avaliando a presença do fragmento do anticorpo funcional por ELISA. Diluições idênticas foram preparadas de uma alíquota



coletada antes da adição da protease servida como referência. Em ELISA o ensaio do TNF α biotinilatado foi capturado nos poços de uma placa de microtiter revestida com neutravidin. Tanto as diluições em série similares a amostra de referência quanto a pepsina tratada foram preparadas e 100 microlitros destas diluições foram adicionados aos poços. Após a incubação por 1 hora as placas foram lavadas. Para a detecção da ligação do VHH capturado do TNF α um anti-soro do anti-VHH policlonal do coelho (R42) e a um conjugado de fosfatase alcalino de IgG anti-coelho foi usado. Após a lavagem, as placas foram desenvolvidas com fosfato paranitrofenil. Os dados traçados na figura 17 mostram curvas similares para todas as amostras expostas às condições digestivas bem como para as amostras de referência. Isto indica que o VHH#3E retém essencialmente sua atividade funcional sob todas as condições escolhidas.

Exemplo 8: Administração oral do TNF α anti-humano VHH específico em ratos

Uma solução do anticorpo que contem o TNF α específico anti-humano VHH#3E (100 microgramas por mililitro em PBS diluído 100 vezes) foi preparada. Três ratos que foram privados de beber água por 12 horas e subsequentemente com livre acesso a solução do anticorpo durante as duas horas seguintes. Os ratos foram sacrificados e seus estômagos dissecados. O conteúdo dos estômagos foi coletado imediatamente pela lavagem do estômago com o 500 microlitros



de PBS contendo 1% de BSA. Este material extraído foi usado
subseqüentemente usado para preparar uma série de 3
diluições, começando em uma diluição de 1/5 do material não
diluído. Cem microlitros destas amostras foram transferidas
5 aos poços individuais de uma placa microtiter revestida com
o TNF α humano. Após a incubação por 1 hora e depois de uma
lavagem extensiva a presença do material imuno reativo foi
avaliada com um anti-soro do anti-VHH policlonal (R42) do
coelho seguido pela incubação com um conjugado fosfatase
10 alcalino anticoelho. ELISA foi desenvolvido com acetado de
paranitrofenil. Os sinais de ELISA obtidos após 10 minutos
demonstraram claramente a presença de VHH#3E funcional no
fluxo gástrico destes ratos. Através da comparação da curva
padrão, determinamos que concentração de fragmento funcional
15 do anticorpo no fluxo gástrico é 1,5, 12,6 e 8,6
microgramas/ml para os três ratos testados.

Exemplo 9: Eficácia em um modelo animal para IBD

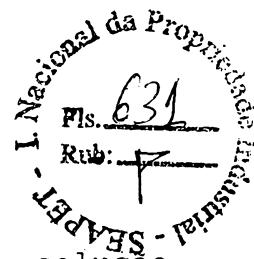
1) A eficácia das construções de VHH bivalente
aplicadas através das várias rotas de administração foi
20 avaliada em um modelo induzido de DSS (dextran sulfato de
sódio) de colite crônica em ratos BALB/c. Este modelo foi
descrito originalmente por Okayasu et al. [Okayasu et al.
Gastroenterology 1990; 98: 694-702] e modificado por
Kojouharoff et. al [G. Kojouharoff et al. Clin. Exp.
25 Immunol. 1997; 107: 353-8]. Os animais foram obtidos de
Charles River Laboratories, Alemanha, com uma idade de 11



semanas e foram mantido até alcançaram um peso corporal entre 21 e 22g. A colite crônica foi induzida nos animais por quatro ciclos de tratamento DSS. Cada ciclo consistiu em um intervalo de tratamento (7 dias) com DSS, onde o DSS foi fornecido com água a uma concentração de 5% (w/v) e a um intervalo de recuperação (12 dias) sem nenhum DSS presente na água. O último período de recuperação foi prolongado por 12 a 21 dias para chegar a um estado de inflamação que se tornasse crônica ou aguda no momento do tratamento. Subseqüentemente, ao último intervalo de recuperação os ratos foram separados aleatoriamente em grupos de 8 ratos e o tratamento com a construção de VHH foi iniciado. O intervalo do tratamento era de 2 semanas. Uma semana após o fim do intervalo do tratamento, os animais foram sacrificados, o intestino foi dissecado e examinado histologicamente. O ajuste experimental foi mostrado esquematicamente na figura 18.

2) Programação do tratamento VHH

Durante o período de tratamento do VHH, os ratos (8 animais por grupo) foram tratados diariamente por 14 dias consecutivos com VHH#3F bivalente (VHH#m3F-VHH#;m3F; SEQ ID nº 76) pela aplicação intragástrica ou intravenosa de 100 µg de VHH bivalente 3F. Um grupo adicional dos animais foi tratado de modo retal com o VHH#3F bivalente todos os outros dias por um período de 14 dias. Em todos os grupos de tratamento uma dose de 100 µg do VHH#3F bivalente foi



aplicado a uma concentração de 1 mg/ml em uma solução tamponada. Os grupos de controle negativos receberam 100 µl de PBS sob condições de outra maneira idênticas. O programa de tratamento é mostrado na tabela 11.

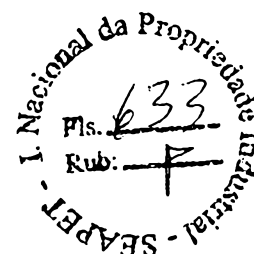
5 3) Resutado

Após os ratos terem sido sacrificados o peso do corpo foi determinado e cólon dissecado. O comprimento do cólon dissecado foi determinado e a histologia do cólon foi avaliada pela coloração hematoxilina eolin (HE) (condições padrão). Quando comparada aos controles negativos (tratamento PBS) que os grupos tratados com nanocorpo bivalente 3F mostraram que o comprimento do cólon prolongado bem como um escore histológico melhorado [G. Kojouharoff et al. Clin. Exp. Immunol. 1997; 107: 353-8] que demonstra a

10

15 eficácia do tratamento.

Nome	SEQ ID NO	Sequência
VHH#1A	1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFDPSVSWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLIPEDTALYYCAR SPSGSFRGQGTQVTVSS
VHH#7B	2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FRV NAMGWYRQVPGNQREFVA IITSGDNLNYADAVKGRFTISTDNVKKTVY LQMNVLKPEDTAVYYCNAI LQTSRWSIPSNYWGQGTQVTVSS
VHH#2B	3	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS TVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNLSLKSEDTAVYYCTK VVPYSDDSR TNADWGQGTQVTVSS
VHH#3E	4	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKE REFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLT MNLEPEDTAV YYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
VHH#3G	5	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFSAHSVYTMGWFRQAPGKERE FVARIYWSSANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLLMNSLKPEDTAVYY CAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSS
VHH#10A	6	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FRV NAMGWYRQVPGNQREFVA IITSSDTNDTTNYADAVKGRFTISTDNVKKTVY LQMNVLKPEDTAVYYC NAVLQTSRWSIPSNYWGQGTQVTVSS
VHH#2G	7	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCTTSGRTISVYAMGWFRQAPGKERE FVA SISGSGAITPYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCAA SRYARYRDVHAYDYWGQGTQVTVSS
VHH#1F	8	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASRTFSRYVVGWFRQAPGKERE FVA TISWNGEHTYYADSVKGRYTI SRDNAKNTVYLQMGSLKPEDTAVYYCAA RSFWGYNVEQRDFGSWGQGTPTVTVSS
VHH#9C	9	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FRV NAMGWYRQVPGNQREFVA ITNDTTNYADAVKGRFTISTDNVKKTVY LQMNVLKPEDTAVYYCNTVI QTSRWNIPTNYWGQGTQVTVSS
VHH#11E	10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FRV NAMGWYRQVPGNQREFVA IISGDTTNYADAVKGRFTISTDNVKKTVY LQMNVLSEDTAVYYCNAVL QTSRWSIPSNYWGQGTQVTVSS
VHH#10C	11	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLACVASGSIFSIDVMGWYRQAPGQORELVA TITNSWTTNYADSVKGRFTISRDNAKNVVYLQMNLSLKLEDTAVYYCNAR RWYQPEAWGQGTQVTVSS
VHH#4B	12	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHWMYWVRQAPGKGLEWVS TINTNGLITDYIHSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKSEDTAVYYCAL NQAGLSRGQGTQVTVSS
VHH#10D	13	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASRRTFSGYAMGWFRQAPGKERE FVA VVS GTGTIAYYADSVKGRFTISRDN AENTVYLQMNLSLKPEDTGLYYCAV GPSSSRWYYRGASLV DYWGKGLTVTVSS
VHH#12B	14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF EFENHWMYWVRQAPGKGLEWVS TVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDN AKYTLYLQMNLSLKSEDTAVYYCTK VLPPYSDDSR TNADWGQGTQVTVSS
VHH#m9A	79	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGLTSSYITGWFRQAPGKERE FVG AVSWSSSTIVYADSV EGRFTISRDNHQNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAA RPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS
VHH#m9E	15	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGLTSSYITGWFRQAPGKERE FVG AVSWSSSTIVYADSV EGRFTISRDNHQNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAA RPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS



VHH#m3F	16	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVG AVSWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLMNSLKPEDTAVYYCAA RPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS
VHH#m4B	80	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCGVSGLSFSGYTMGWFRQAPGKEREFAA AIGWNSGTTEYRNSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA SPKYMTAYERSYDFWGQGTQVTVSS
VHH#8-29	81	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGDSWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYKDSVTGRFTISRDNKNTLHLEMNRLKPEDTALYYCAR DPSGKLRGPGTQVTVSS
VHH#8-41	82	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGDSWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYKDSVTGRFTISRDNKNTLHLEMNRLKPEDTALYYCAR DPSGKLRGPGTQVTVSS
VHH#8-42	83	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGDSWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYKDSVTGRFTISRDNKNTLHLEMNRLKPEDTALYYCAR DPSGKLRGPGTQVTVSS
VHH#8-44	84	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHWMYWVRQAPGKGLEWVS TINTNGLITNYIHSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLKSEDTAVYYCAL NQAGLSRGQGTQVTVSS

Tabela 1: Lista da sequência de amino-ácido dos peptídeos dos aspectos da presente invenção direcionados contra o TNF-alfa.

Mutação	Molde	Sequência primária
A74S+Y76N+ K83R+P84A	Tipo selvagem	5'-AGA GAC AAC TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG-3' Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
Q1E+Q5L+A7 4S+Y76N+K8 3R+P84A	A74S+Y76N+ K83R+P84A	5'-C ATG GCT GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GG-3' Met Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser
Q1E+Q5L+A7 4S+Y76N+K8 3R+P84A+T9 3A	Q1E+Q5L+A7 4S+Y76N+K8 3R+P84A	5'-G GAC ACG GCC GTC TAT TAC TGT GCA AAA GTA CTT C-3' Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Leu

Tabela 2: Lista das reações do mutagênese, mutagênico primário e moldes usados para a mutagênese do VHH#12B.

Mutação	Molde	Sequência primária
F37V	Tipo selvagem	5'-ACC TAT ACC ATT GGC TGG GTC CGC CAG GCT-3' Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala
E44G	Tipo selvagem	5'-CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CGT GAG TTT-3' Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe
R45L	Tipo selvagem	5'-A GGG AAG GAG CTT GAG TTT GTA GCG CGT AT-3' Gly Lys Glu Leu Glu Phe Val Ala Arg
F47W	Tipo selvagem	5'-A GGG AAG GAG CGT GAG TGG GTA GCG CGT AT-3' Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ala Arg

Tabela 3: Lista das reações do mutagênese, de primers mutagenic e placas usadas para a mutagênese do VHH#3E.

Seq ID	Nome	Sequência
17	VHH#12B A74S+Y76N +K83R+P84 A	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEW VSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCTKVLPPYSDDSR TNADWGQGTQVTVSS
18	VHH#12B Q1E+Q5L+A 74S+Y76N+ K83R+P84A	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEW VSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCTKVLPPYSDDSR TNADWGQGTQVTVSS
19	VHH#12B Q1E+Q5L+A 74S+Y76N+ K83R+P84A +T93A	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEW VSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKVLPPYSDDSR TNADWGQGTQVTVSS
20	VHH#12B Wild type	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEW VSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDN AKYTLYLQMNSLKSEDTAVY YCTKVLPPYSDDSR TNADWGQGTQVTVSS
21	VHH#3E F37V	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWVRQAPG KREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLT MNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSR SVESYNYWGQGTQVTVSS
22	VHH#3E E44G	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPG KGRFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLT MNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSR SVESYNYWG

		QGTQVTVSS
23	VHH#3E R45L	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPG KELEFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMNNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
24	VHH#3E F47W	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPG KEREWVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMNNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
25	VHH#3E Tipo selvagem	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPG KEREVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMNNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS

Tabela 4: Vista geral do VHH do tipo humanizado e selvagem.

Nome	SEQ ID	Sequência
		Albumina do soro anti-rato
MSA21	26	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWV SGISSLG DSTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSLKPEDTAVYYC TIGGSLNPGGQGTQVTVSS
MSA24	27	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCEASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWV SSISGSGSNTIYADSVKDRFTISRDNASTLYLQMNLSLKPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTQVTVSS
MSA210	28	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISSDSGKKNYADSVKGRFTISRDNAMKMLFLQMNLSLKPEDTAVYYC VIGRGPSSQGTQVTVSS
MSA212	29	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISADGSDKRYADSVKGRFTISRDNAGKMLTLDMNLSLKPEDTAVYYC VIGRGPASQGTQVTVSS
MSAc16	85	AVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCVVSQTTFSSAAMGWFRQAPGKEREV GAIKWSGTSTYYTDSVKGRFTISRDNVKNVYLMNLSLKPEDTGVTYC AADRDYRDRMGPMTTTDFRFGQGTQVTVSS
MSAc11 2	86	QVKLEESGGGLVQTGGSLRLSCEASGRTFSSFAMGWFRQAPGREREV ASIGSSGITTYADSVKGRFTISRDNANTVYLMNLSLKPEDTGLCYC AVNRYGIPYRSGTQYQNWGQGTQVTVSS
MSAc11 0	87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGLTFNDYAMGWFRQAPGKERDMV ATISIGGRYYADSVKGRFTISRDNANTVYLMNLSLKPEDTAIYYCV AHRQTVVRGPYLLWGQGTQVTVSS
MSAc11 4	88	QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREV AGSGRSNSYNYSDSVKGRFTISRDNANTVYLMNLSLKPEDTAVYYC AASTNLWPRDRNLYAYWGQGTQVTVSS
MSAc11 6	89	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRSLGIYRMGWFRQVPGKEREV AAISWSGGTTRYLDSVKGRFTISRSTKNAVYLMNLSLKPEDTAVYYC AVDSSGRLYWTLSTSYDYWGQGTQVTVSS
MSAc11 9	90	QVQLVEFGGGLVQAGDSLRLSCEASGRSLGIYKMAWFRQVPGKEREV AAISWSGGTTRYIDSVKGRFTLSRDNTKNMVYLMNLSLKPDDTAVYYC AVDSSGRLYWTLSTSYDYWGQGTQVTVSS
MSAc15	91	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFV AGVTWSGSSTFYGDSVKGRFTASRDSAKNTVTLEMNLSLNPEDTAVYYC AAAYGGGLYRDRPSYDYWGRTQVTVSS



MScl11	92	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDAPPIAWFRQAPGKEREGV SCIRDGTTYADSVKGRFTISSDNANNTVYLQTNLSLKPEDTAVYYCAA PSGPATGSSHTFGIYWNLRDDYDNWGQGTQVTVSS
MSAc11 5	93	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDHYTIGWFRQVPGKEREGV SCISSSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLTLEPDDTAVYYC AAGLLLRVEELQASDYDYWGQGIQVTVSS
MSAc18	94	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGV ACISNSDGSTYYGDSVKGRFTISRDNAKTTVYLQMNLSLKPEDTAVYYC ATADRHYSASHHPFADFANSWGQGTQVTVSS
MSAc17	95	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAYGLTFWRRAAMAWFRAPGKERELV VARNWGDGSTRYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYC AAVRTYGSATYDIWGQGTQVTVSS
MSAc12 0	96	EVQLVESGGGLVQDGGSLRLSCIFSGRTFANYAMGWFRQAPGKEREFV AAINRNGGTTNYADALKGRFTISRDNKTNTAFLQMNLSLKPDPTAVYYC AAREWPFSTIPSGWRWYWGQGTQVTVSS
MSAc14	97	DVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASGPTASSHAIGWFRQAPGKEREFV VGINRGGVTRDYADSVKGRFAVSRDNVKNNTVYLQMNRLKPEDSAIYIC AARPEYSFTAMSKGDMDYWGKGTLLVTVSS
Albumina do soro anti TNT-alfa/anti-rato		
MSA21/ VHH#3E	30	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWV SGISSLDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYC TIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSLRL SCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRF AISRDIKNTVDLTMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVT VSS
MSA24/ VHH#3E	31	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWV SSISGSGSNTIYADSVKDRFTISRDNASTLYLQMNLSLKPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSLRL SCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRF AISRDIKNTVDLTMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVT VSS
MSA210 /VHH#3 E	32	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNACKMLFLQMNLSLRPEDTAVYYC VIGRGSPSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFA ISRDIKNTVDLTMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTV SS
MSA212 /VHH#3 E	33	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISADGSDKRYADSVKGRFTISRDNKGKMLTLDMNLSLKPEDTAVYYC VIGRGSPASQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFA ISRDIKNTVDLTMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTV SS
MSA21/ MSA21/ VHH#3E	34	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWV SGISSLDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYC TIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGS LRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWVSGISSLDSTLYADSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTV SSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSG YTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNT VDLTMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA210 /VHH#1 A	35	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNACKMLFLQMNLSLRPEDTAVYYC VIGRGSPSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSL

		RLSCATSGFDFSVSWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYVDSVKGRFTISRDNANTLYLQMDSLIPEDTALYYCARSPSGSFRGQGTQVTVSS
MSA210 /VHH#7 B	36	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNACKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRVNAMGWYRQVPGNQREFVAIITSGDNLNYADAVKGRFTISTDNVKKTVYLQMNVLKPEDTAVYYCNAILQTSRWSIPSNYWGQGQGTQVTVSS
MSA210 /VHH#2 B	37	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNACKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNLSLKSEDTAVYYCTKVLPYPYSDSRTNADWQGQGTQVTVSS
MSA210 /VHH#3 E	38	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNACKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGTYTIGWFRQAPGKEREVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSESYNYWGQGQGTQVTVSS
MSA210 /VHH#3 G	39	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNACKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFSAHSVYTMGWFRQAPGKEREVARIYWSSANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAARDGIPTSRVTGGSYNYWGQGQGTQVTVSS
MSA21 /VHH#12 B	40	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWVSGISSLGDESTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNLSLKSEDTAVYYCTKVLPYPYSDSRTNADWQGQGTQVTVSS
MSA24 /VHH#12 B	41	QVQLQESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSNTIYADSVKDRFTISRDNACKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNLSLKSEDTAVYYCTKVLPYPYSDSRTNADWQGQGTQVTVSS
MSA210 /VHH#1 2B	42	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNACKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNLSLKSEDTAVYYCTKVLPYPYSDSRTNADWQGQGTQVTVSS
MSA212 /VHH#1 2B	43	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISADGSDKRYADSVKGRFTISRDNCKMLTDMNSLKPEDTAVYYCVIGRGSPASQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNLSLKSEDTAVYYCTKVLPYPYSDSRTNADWQGQGTQVTVSS

Tabela 5, albumina de soro anti-rato e albumina de soro + TNT-alfa

Seq. Família	Nome	Seq. Id	Seqüência
1	MP3D2SRA	44	QVQLQDSGGGTQVQAGGSLRLSCAASGRTPSDYAVGWFRQA PGKEREFFVARILWTGASRSYANSVDGRFTVSTDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAIYYCAALPSNIITTDYLRVYYWGQGTQV TVSS
1	MP3A3SR	45	QVQLQDSGGGTQVQAGGSLRLSCAASGRTPSNYAVGWFRQA PGKEREFFVARIKWSGGRSYANSVDGRFTVSTDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAIYYCA?LPSNIITTDYLRVYYWGQGTQV TVSS
2	MP3C5SR	46	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAGISGSVFSRTPMGWY RQAPGKQRELVAIGILTSGATSYAESVKGRFTISRDNAKNT VYLMNSLSPEDTAEYYCNTYPTWVLSWGQGTQVTVSS
2	MP3C1SR	47	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSAAAGISGSVFSRTPMGWY RQAPGKQRELVAIGILSSGATVYAESVKGRFTISRDNAKNT VYLMNSLSPEDTAEYYCNTYPTWVLSWGQGTQVTVSS
2	MP3G8SR	48	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAGISGSVFSRTPMGWY RQAPGKQRELVAIGILSSGATAYAESVKGRFTISRDNAKNT VYLMNSLSPEDTAEYYCNTYPTWVLSWGQGTQVTVSS
3	MP3D2BR	49	QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCAASRGIFRPNAGGWYRQA PGKQRELVAFIGVDNTRYIDSVKGRFTISRDNAKTTVYL QMNSLQPEDTAVYYCNKVPYIDWGQGTQVTVSS
4	MP3H6SRA	50	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSTYNMGWFRQA PGKEREFFVAGISWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNANTVY LQMNSLKPEDTGVIYCAASKGRPYGVPSPRQGDYDYGQGT QVTVSS
4	MP3B4SRA	51	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSTYNMGWFRQA PGKEREFFVAGISWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNANTVY LQMNSLKPEDTGVIYCAASKGRPYGVPSPRQGDYDYGQGT QVTVSS
4	MP4E4BR	52	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSIYNMGWFRQA PGKEREFFVAAISWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNANTVY LQMNSLKPEDTGVIYCAASKGRPYGVPSPRQGEYDYGQGT QVTVSS
4	MP4H8SR	53	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFNIYNMGWFRQA PGKERDFVAAISWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNANTVY LQMNSLKPEDTGVIYCAASKGRPYGVPSPRQGDYDYGQGT QVTVSS
5	MP2F6SR	54	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNNYINMGWFRQA PGKEREFFVAAISWNGGSTYYDDSVKGRFTISRDNANLVY LQMNSLNFEDTAVYYCAACANPYGIPQYRENRYPDFWGQGT QVTVSS
5	MP3D1BR	55	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFDNYINMGWFRQA PGKEREFFVAAISWNGGSTYYDDSVKGRFTISRDNFQKLVI LQMNSLKLEDVAVYYCAACANPYGIPQYRENRYPDFWGQGT QVTVSS
6	MP2B5BR	56	QVQLVESGGRLVQAGGSLRLSCIASGRTISDYAAGWFRQA PGKEREFFLASVTWFGGSTSYADSVKGRFTISRDKAKDVTY LQMTLEPDDTSVYYCASSPRYCAGYRCYVTAASEFDSWGQ GTQVTVSS
6	MP2C1BR	57	QVKLEESGGRLVQAGGSLRLSCIASGRTISDYAAGWFRQA PGKEREFFLASVSWFGGSTYYADSVKGRFTISRDTAKDVTY LQMTLEPDDTSVYYCASSPRYCAGYRCYATASEFDSWGQ GTQVTVSS

6	MP4A12SR	58	QVQLQESGGRLVQAGGSLRLSCIASGRTISDYAAGWFRQA PGKEREFVAVFVRSNGTSTYYADSVKGRFTISRDKAKDTVY LQMNTLEPDDTSAYYCASSPRYCAGYRCYVTASEFDSWGP GTQVTVSS
7	MP3F4SRA	59	QVQLQDSGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSYGMGWFRQA PGKEHEFVAGIWRSGVSLYYTDSVKGRFTISRDDAKMTVS LQMNSLKPEDTAVYYCAAETFPWTSRGRFADYDYGQGT QVTVSS
7	MP3D3BR	60	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCTASGRSFSSYGMGWFRQA PGKDHEFVAGIWRSGVSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVS LQMNSLKPEDTAVYYCAAETFPWNRGTFADYDYGQGT QVTVSS
7	MP3E5BR	61	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSYGMGWFRQA PGKEHEFVAGIWRSGVSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVS LQMNSLKPEDTAVYYCAAETFPWNRGSFADYDYGQGT QVTVSS
7	MP3C7SRA	62	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSYGMGWFRQA PGKEHEFVAGIWRSGVSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVS LQMNSLKPEDTAVYYCAAETFPWNRGRFADYDYGQGT QVTVSS
8	MP2F1BR	63	AVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCVASGGTFPSRYAMGWFRQA PGKEREFVARIGYSGRSISYATSVEGRFAISRDNANTVY LQMNSLKPEDTAVYYCASLVSGTLYQADYWGQGTQVTVSS
8	MP2C5BR	64	QVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCVASGGTFPSRYAMGWFRQA PGKERDFVARIGYSGQSISYATSVEGRFAISRDNANTVY LQMNSLKPEDTAVYYCASLVSGTLYKPNYWGQGTQVTVSS
9	MP2C10BR	65	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTYTVGWFRQAPGK EREFVAAISWGGGSALYADSVKGRFTISRDNANTVYLQM GSLEPEDTAYYSCAAPGTRYHGRNQVNYNYWGQGTQVTVS S
9	MP2G5SR	66	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTYTVGWFRQAPGK EREFVAAIDWGGGSALYADSVKGRFTISRDNANTVYLQM GSLEPEDTAVYWCAAPGTRYHGRNQVNYNYWGQGTQVTVS S
10	MP3B1SRA	67	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSNYAMSWVRQA PGKGLEWVSSINSRTGSITYADSVKGRFTITLDNAKNTLY LQMNSLKPEDTAVYYCASRVDDRVSRGQGTQVTVSS
11	MP2F10SR	68	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISSFRMGWFERRA PGEEREFVAFVRSNGTSTYYADSVKGRFTITRDNAKNTVY LRMDSLKPEDTAVYYCAAATRDYGGSFYWGQGTQVTVSS
11	MP3A7SRA	69	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSFRMGWFERRA PGEEREFVAFVRSNGTSTYYADSVKGRFTITRDNAKNTVY LRMDSLKPEDTAVYYCAAATRDYGGSFYWGQGTQVIVSS
12	MP4C10SR	70	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYAMSWVRQP PGKGIEWVSSINNNDHITYADSVKGRFTIARDNANNILY LQMNSLKPEDTAVYYCASRVDDRVSRGQGTQVTVSS



13	MP4D5BR	71	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYGMWFRQA PGKERELVVAINRSGGATSYATSVRGRFTISRDNKNTMY LQMNSLNPEDTAVYYCAARDPRTYSSYFEYTYWGQGTQV TVSS
14	MP3F1SRA	72	QVQLQESGGGLVQAGGSLTLSCVASGRTISDYAVGWFRQA PGKEREFVASISWGGGFTAFADSMKGRFTISRDNKNTVY LQHTLTLEPDDTSVYYCASSRRYCTGYRCYATASEFDSWGQ GTQVTVSS

Tabela 6: Lista da sequência de aminoácido dos VHH's direcionados contra o IFN-gama humano.

Nome	SEQ ID	Seqüência
		<u>Seqüência de ligação (Sublinhada)</u>
BIV 3E	73	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSII MAWFRQAPGKEREFVGAWSWG GTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASAS YNVWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTF SSII MAWFRQAPGKEREFVGAWSWGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLMNSL SLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS
TRI 3E	74	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVAR IYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTS RSVESYNYWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSSSEPKTP KPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGK EREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
TETRA 3E	75	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVAR IYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTS RSVESYNYWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSSSEPKTP KPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGK EREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI AKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQPGGS LRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGR FAISRDI AKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTV SS
BIV#m 3F	76	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSII MAWFRQAPGKEREFVGAWSWG GTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASAS YNVWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTF SSII MAWFRQAPGKEREFVGAWSWGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLMNSL SLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS
		<u>Sem seqüência de ligação</u>
BIV#3 Edir	77	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSII MAWFRQAPGKEREFVGAWSWG GTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASAS YNVWGQGTQVTVSSQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSII MAWFRQAP GKEREFVGAWSWGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLMNSLKPEDTAVYYC AARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS

BIV#12 Bdir	78	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWRQAPGKGLEWVSTVNTNG LITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRN ADWGQGTQVTVSSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWRQAPG KGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCT KVLPPYSDDSRNADWGQGTQVTVSS
----------------	----	--

Tabela 7: Sequências bivalente do VHH (BIV 3E, BIV#m3F), trivalente (TRI3E) ou tetravalente (TETRA 3E) das sequências direcionadas contra TNF-alfa.

SEQ	MSA21	MSA24	MSA210	MSA212
MSA21	1.000	0.834	0.800	0.782
MSA24	---	1.000	0.782	0.791
MSA210	---	---	1.000	0.903
MSA212	---	---	---	1.000

5

Tabela 8 Homologias fracionárias entre as sequências de amino-ácido da albumina sérica VHHs anti-rato da invenção.

SEQ	VHH#1A	VHH#7B	VHH#2B	VHH#3E	VHH#3G	VHH#10A	VHH#2G	VHH#1F	VHH#9C	VHH#1E	VHH#10C	VHH#4B	VHH#10D	VHH#12B	VHH#9E	VHH#3F
VHH#1A	1.000	0.601	0.764	0.596	0.622	0.600	0.682	0.629	0.609	0.601	0.614	0.818	0.642	0.747	0.596	0.604
VHH#7B	---	1.000	0.604	0.635	0.645	0.943	0.653	0.616	0.933	0.933	0.719	0.593	0.614	0.620	0.616	0.624
VHH#2B	---	---	1.000	0.620	0.615	0.611	0.682	0.661	0.629	0.620	0.637	0.796	0.634	0.951	0.620	0.645
VHH#3E	---	---	---	1.000	0.875	0.641	0.713	0.689	0.620	0.643	0.612	0.604	0.648	0.596	0.674	0.682
VHH#3G	---	---	---	---	1.000	0.651	0.779	0.740	0.637	0.637	0.653	0.645	0.689	0.622	0.708	0.716
VHH#10A	---	---	---	---	---	1.000	0.658	0.614	0.935	0.935	0.725	0.592	0.612	0.626	0.622	0.637
VHH#2G	---	---	---	---	---	---	1.000	0.741	0.653	0.669	0.685	0.666	0.746	0.650	0.701	0.717
VHH#1F	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.616	0.616	0.664	0.661	0.714	0.645	0.709	0.717
VHH#9C	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.941	0.743	0.601	0.622	0.645	0.600	0.616
VHH#11E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.719	0.601	0.622	0.637	0.608	0.624
VHH#10C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.650	0.606	0.637	0.600	0.632
VHH#4B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.611	0.796	0.588	0.629
VHH#10D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.619	0.674	0.674
VHH#12B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.604	0.637
VHH#9E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.854
VHH#3F	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000

10 Tabela 9, homologias fracionárias entre o VHHs anti-TNF-alfa da invenção.

		% homologia																																				
	MP3D2SRA	X	96	88	66	66	62	71	71	71	68	69	65	63	64	68	66	67	68	71	70	68	67	63	67	68	60	72	65	68	67	66	67	76	70			
	MP3A3SR		X	66	66	66	62	72	72	72	71	70	71	65	63	64	68	66	67	68	72	72	69	67	64	66	67	60	73	65	67	65	66	67	71	71		
	MP3C5SR			X	97	98	73	65	65	64	63	63	63	60	58	59	64	64	65	66	65	65	63	63	64	64	61	67	60	74	63	60	63	70	64			
	MP3C1SR				X	98	72	64	64	64	62	62	58	57	58	64	64	65	64	64	63	64	62	63	64	65	60	67	59	73	63	60	62	70	65			
	MP3G8SR					X	73	65	65	64	63	63	59	58	59	64	64	65	66	65	64	65	64	65	63	65	65	61	66	60	73	63	61	63	71	64		
	MP3D2BR						X	63	63	62	63	64	59	58	58	62	61	62	63	64	63	63	63	64	63	63	63	65	58	73	64	60	63	68	67			
	MP3H6SRA							X	100	97	97	80	81	67	68	67	75	73	75	73	73	71	66	75	75	63	71	69	71	69	71	68	70	82	70			
	MP3B4SRA								X	97	97	80	81	67	68	67	75	73	75	73	71	73	71	66	75	75	63	71	69	71	68	70	80	71				
	MP4E4BR									X	97	81	82	68	69	68	73	70	71	73	71	73	71	66	75	75	63	72	70	71	68	70	80	71				
	MP4H8SR										X	81	81	66	66	66	72	69	71	72	71	71	64	73	73	62	70	67	69	70	67	69	70	80	71			
	MP2F6SR											X	94	65	68	64	70	67	69	71	67	65	73	71	63	71	70	62	69	66	67	69	68	67	78	69		
	MP3D1BR												X	95	66	65	71	69	71	72	67	65	70	69	63	71	71	62	68	66	67	71	69	69	70			
	MP2B3BR														X	95	63	64	64	64	65	63	64	63	60	66	63	57	63	63	62	70	65	65				
	MP2C1BR															X	95	63	64	64	64	63	61	66	65	59	66	63	56	61	85	65	64	63	62	70	65	
	MP4A12SR																X	94	64	64	64	62	60	63	62	59	65	63	56	61	84	64	63	62	70	65		
	MP3F4SRA																	X	94	96	97	69	67	68	68	62	67	69	60	72	63	67	68	65	65	76	71	
	MP3D3BR																		X	98	96	70	68	67	67	62	67	67	60	70	64	66	66	64	64	75	69	
	MP3E5BR																			X	96	70	68	68	69	63	68	68	60	72	64	67	68	65	66	71	71	
	MP3C7SRA																				X	71	69	69	70	63	69	69	61	72	64	68	66	66	66	78	71	
	MP2F1BR																					X	94	66	67	63	68	67	61	70	64	68	65	64	64	74	67	
	MP2C5BR																						X	94	66	67	63	67	65	62	69	63	67	64	62	63	67	
	MP2C10BR																							X	94	62	66	66	59	67	66	69	68	64	68	74	73	
	MP2G5SR																								X	94	62	67	65	59	67	65	67	66	64	66	73	73
	MP3B1SRA																									X	94	62	67	60	67	60	67	69	68	69	69	65
	MP2F10SR																										X	97	61	67	65	71	66	65	67	77	68	
	MP3A7SRA																											X	61	68	63	71	65	65	67	71	69	
	MP4C10SR																												X	64	58	65	64	63	66	66	63	
	MP4D3BR																													X	64	69	68	65	67	76	73	
	MP3F1SRA																														X	65	64	63	71	68		
	MP5D6BR																															X	70	65	70	77	73	
	MP5B1BR																																X	78	81	76	71	
	MP6A8BR																																	X	75	74	66	
	MP6B12BR																																		X	73	68	
	MP6C11BR																																			X	77	
	MP6E10BR																																				X	

Tabela 10: Porcentagem das homologias fracionárias entre o VHHs anti-IFN-gama da invenção.

Grupos	Animais	Descrição	Lista
1	8	Controle negativo 1 ip	Diariamente 100µl PBS i.p.+
2	8	Controle negativo 2 retal	Todos os outros dias 1000µl PBS retal por 2 semanas
3	8	Controle negativo 3 intragastrico	Diariamente 100µl PBS i.p.+
4	8	Controle positivo 1 dexametasona	5 µl i.p. por 7 dias consecutivos
5	8	Controle positivo 2 IL 10 expressando I lactis	Aplicado uma vez por dia por 14 dias consecutivos
6	8	VHH bivalente 3F intragastrico	Diariamente 100 µl bivalente VHH 3F ₂ intragastrico por 14 dias consecutivos
7	8	VHH bivalente 3F i.p.	Diariamente 100 µl bivalente VHH 3F i.p. por 14 dias consecutivos
8	8	VHH bivalente 3F retalmente	100 µl bivalente VHH 3F retalmente em 100 µl PBS todos os dias por duas semanas

Tabela 11: Lista de tratamento

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo anti-TNF-alfa, CARACTERIZADO por compreender um anticorpo de domínio único anti-TNF-alfa, consistindo de:

uma sequência representada por SEQ ID N°: 1.

2. Polipeptídeo anti-TNF-alfa, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADO pelo fato de que o anticorpo de domínio único anti-TNF-alfa é humanizado.

3. Polipeptídeo anti-TNF-alfa CARACTERIZADO por compreender um anticorpo de domínio único anti-TNF-alfa consistindo de uma sequência representada por SEQ ID N°: 1 e um anticorpo de domínio único anti-IFN-gamma escolhido a partir do grupo consistindo das sequências SEQ ID N°: 47-72.

4. Polipeptídeo anti-TNF-alfa CARACTERIZADO por compreender um anticorpo de domínio único anti-TNF-alfa consistindo de uma sequência representada por SEQ ID N°: 1 e um anticorpo de domínio único anti-serum albumina escolhido a partir do grupo consistindo das sequências SEQ ID N°: 26-29 e 85-97.

5. Polipeptídeo anti-TNF-alfa CARACTERIZADO por ser representado pela sequência SEQ ID N°: 35.

6. Polipeptídeo anti-TNF-alfa CARACTERIZADO por compreender dois anticorpos de domínios únicos anti-TNF-alfa em que cada anticorpo de domínio único anti-TNF-alfa consiste da sequência representada pela sequência SEQ ID N°: 1.

7. Composição compreendendo um polipeptídeo anti-TNF-

alfa, de acordo com as reivindicações 1 a 6, CARACTERIZADA por ter um veículo farmacologicamente aceitável, adequado para administração simultânea, separada ou sequencial a um paciente.

8. Método para identificar um agente que modula a ligação de um polipeptídeo anti-TNF-alfa da reivindicação 1 ou 2, para o fator de necrose tumoral alfa, CARACTERIZADO por compreender as etapas de:

(a) contatar um polipeptídeo anti-TNF-alfa da reivindicação 1 ou 2 com um alvo que seja o fator de necrose tumoral alfa, na presença de um candidato modulador sob condições que permitem a ligação entre o dito polipeptídeo e o alvo, e contatar um polipeptídeo anti-TNF-alfa da reivindicação 1 ou 2 com o alvo que seja o fator de necrose tumoral alfa, na ausência de um candidato modulador sob condições que permitem a ligação entre o dito polipeptídeo e o alvo.

(b) medir a ligação entre o polipeptídeo e o alvo da etapa (a), na qual uma diminuição na ligação na presença do dito candidato modulador, em relação à ligação na ausência do dito candidato modulador, o dito candidato modulador identificado como um agente que modula a ligação do polipeptídeo de anti-TNF-alfa da reivindicação de 1 ou 2 e o fator de necrose tumoral.

9. Kit para selecionar agentes que modulam doenças mediadas pelo fator de necrose tumoral alfa, CARACTERIZADO por compreender um polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo qualquer

uma das reivindicações 1 a 6, o fator de necrose tumoral alfa, materiais de embalagens dos mesmos e instruções para uso.

10. Polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou uma composição de acordo com a reivindicação 7 CARACTERIZADO por ser usado para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar as doenças que se relacionam aos processos inflamatórios.

11. Polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou uma composição de acordo com a reivindicação 7, CARACTERIZADO por ser usado para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar as doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante do TNF-alfa que seja capaz de passar por um ambiente gástrico sem inativar a substância.

12. Polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou uma composição de acordo com a reivindicação 7, CARACTERIZADO por ser usado para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa liberada para o trato vaginal e/ou retal.

13. Polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou uma composição de acordo com a reivindicação 7, CARACTERIZADO por ser usado para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa liberada para o nariz, trato respiratório superior e/ou o pulmão.

14. Polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou uma composição de acordo com

a reivindicação 7, CARACTERIZADO por ser usado para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa liberada para a mucosa intestinal, na qual a dita desordem aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal.

15. Polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou uma composição de acordo com a reivindicação 7, CARACTERIZADO por ser usado para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa, a qual é capaz de passar efetivamente por baixo do tecido da língua.

16. Polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou uma composição de acordo com a reivindicação 7, CARACTERIZADO por ser usado para tratar e/ou prevenir e/ou aliviar de doenças suscetíveis à modulação por uma substância modulante TNF-alfa, a qual é capaz de passar efetivamente através da pele.

17. Método in vitro de diagnóstico de uma desordem definido pela disfunção do fator de necrose tumoral alfa, CARACTERIZADO por compreender:

(a) contatar uma amostra com o polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo com as de reivindicações 1 a 2;

b) detectar a ligação do dito polipeptídeo para a dita amostra; e

(c) comparar a ligação detectada na etapa (b) com um padrão, na qual a diferença na ligação relativa à dita amostra é diagnosticada de uma desordem definida pela disfunção do

fator de necrose tumoral alfa.

18. Kit para selecionar uma desordem, CARACTERIZADO por as ditas doenças ser qualquer inflamação, artrite reumatoide, doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome do intestino inflamado, esclerose múltipla, doença de Addison, hepatite autoimune; parotidite autoimune, Diabetes Tipo 1, epididimite, glomerulonefrite, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barre, doença de Hashimoto, anemia hemolítica, lúpus eritematoso sistêmico, infertilidade masculina, esclerose múltipla, Miastenia Gravis, Pênfigo, psoríase, febre reumática, artrite reumatoide, sarcoidose, escleroderma, síndrome de Sjogren, espôndilo artropatias, tireoidite, e vasculites, compreendendo um polipeptídeo isolado de anti-TNF-alfa conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, materiais de embalagens dos mesmos e instruções para uso.

19. Método para produzir um polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADO por compreender as etapas de:

(a) obter o DNA dúplex que codifica um *Camelidae* VHH direcionado ao fator de necrose tumoral alfa, e

(b) clonar e expressar o DNA selecionado na etapa (a).

20. Método para produzir um polipeptídeo anti-TNF-alfa de acordo como qualquer uma das reivindicações 1 a 6, CARACTERIZADO por compreender as etapas de:

(a) cultivar as células hospedeiras que compreendem o ácido nucléico capaz de codificar um polipeptídeo anti-TNF-alfa de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, sob condições

que permitam a expressão do polipeptídeo, e

(b) recuperar o polipeptídeo produzido da cultura.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, CARACTERIZADO por as ditas células hospedeiras serem fermentáveis ou bacterianas.

1/10

	FR1	CDR1	FR2
VHH#3G	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGR	TFSAHS--VYTMG	WFRQAPGKEREFVA
VHH#3E	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR	TFSDHSGYTYTIG	WFRQAPGKEREFVA
VHH#1A	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGF	DFS--VSWMY---	WVRQAPGKGLEWVS
VHH#2B	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGF	TFS--DYWMY---	WVRQAPGKGLEWVS
VHH#12B	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF	EFE--NHWMY---	WVRQAPGKGLEWVS
VHH#7B	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGS	IFRVNA-----MG	WYRQVPGNQREFVA
	*****	*****	*****

	CDR2	FR2
VHH#3G	RIYWSSANTYYADSVKG	RFTISRDNAKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAA
VHH#3E	RIYWSSGNTYYADSVKG	RFAISRDIKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAA
VHH#1A	EINTNGLITKYVDSVKG	RFTISRDNAKNTLYLQMDSLIPEDTALYYCAR
VHH#2B	TVNTNGLITRYADSVKG	RFTISRDNAKYTLYLQMNLSKSEDTAVYYCTK
VHH#12B	TVNTNGLITRYADSVKG	RFTISRDNAKYTLYLQMNLSKSEDTAVYYCTK
VHH#7B	-IITSGDNLNYADAVKG	RFTISTDNVKKTVYLQMNVLKPEDTAVYYCNA
	*****	*****

	CDR3	FR4	Dobra
VHH#3G	RDGIPTSRIVGSYNY	WGQGTQVTVSS	EPKTPKPQP
VHH#3E	RDGIPTSRSVESYNY	WGQGTQVTVSS	EPKTPKPQP
VHH#1A	-----SPSGSF	RGQGTQVTVSS	EPKTPKPQP
VHH#2B	-VVPYSDDSRINAD	WGQGTQVTVSS	EPKTPKPQP
VHH#12B	-VLPPYSDDSRINAD	WGQGTQVTVSS	EPKTPKPQP
VHH#7B	--ILQTSRWSIPSNY	WGQGTQVTVSS	EPKTPKPQP
	*****	*****	*****

Figura 1

2/10

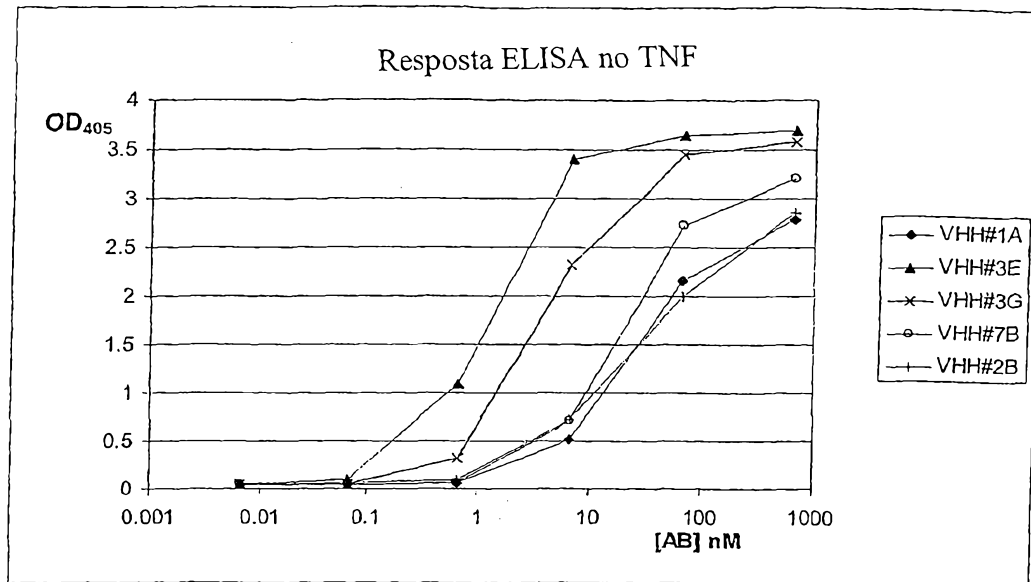


Figura 2

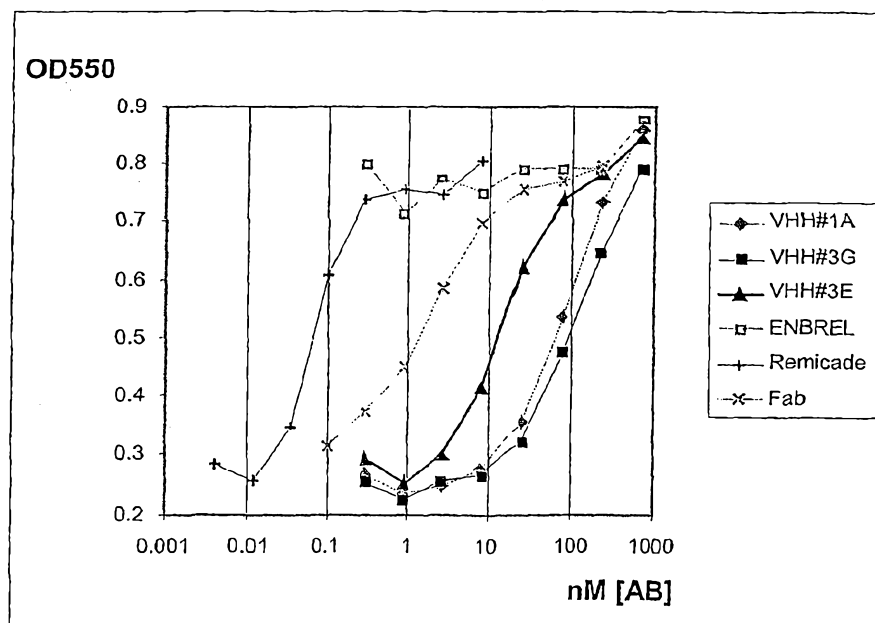


Figura 3

3/10

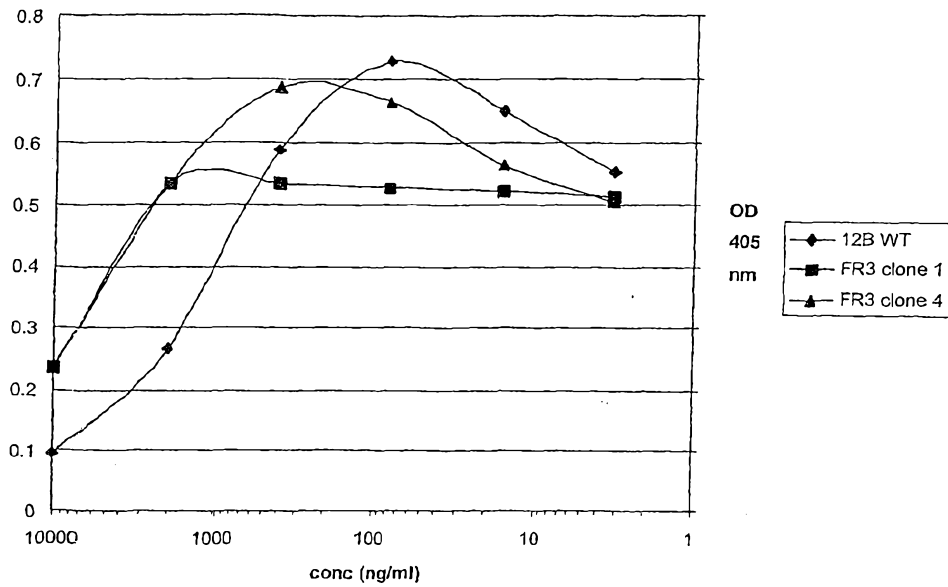


Figura 4

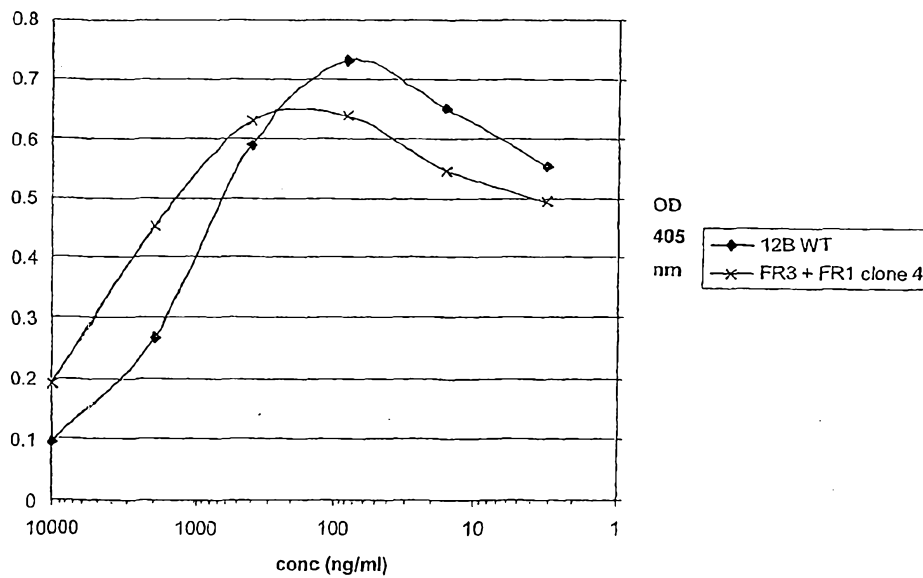


Figura 5

4/10

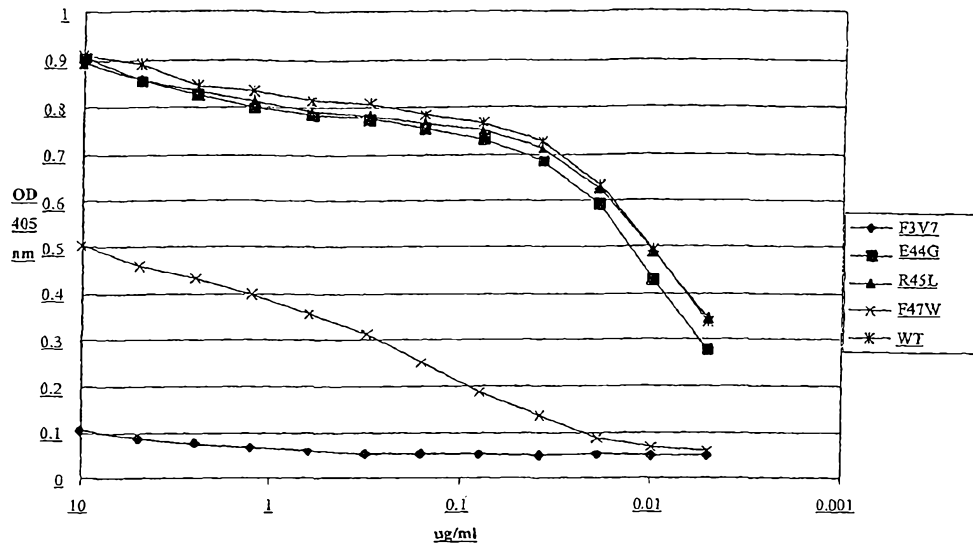


Figura 6

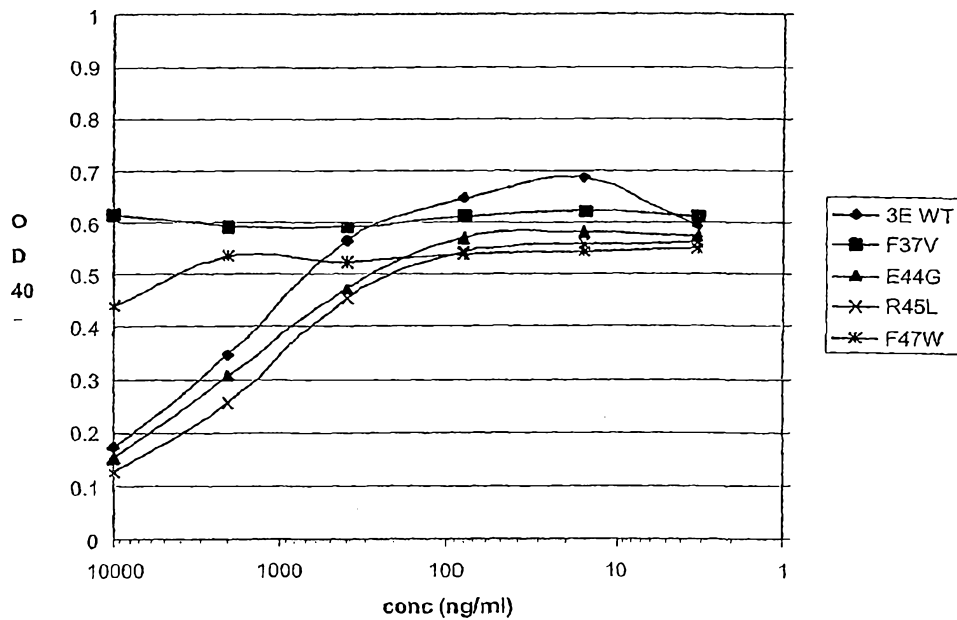


Figura 7

5/10

	FR1	CDR1	FR2
VHH#m3F	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGG	TFSSIIMA	WFRQAPGKEREFEVGA
VHH#m4B	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCGVSG	SFSGYTMG	WFRQAPGKEREFEAAA
VHH#m9A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGG	TLSSYITG	WFRQAPGKEREFEVGA
VHH#m9E	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASEG	TLSGYILG	WFRQAPGKEREFEVGA
	***	*****	*****

	CDR2	FR2
VHH#m3F	VSWSGGTTIVYADSVLG	RFEISRDSARKSVYLMNSLKPEDTAVYYCAA
VHH#m4B	IGWNSGTTIYRNSVKG	RFTISRDNNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA
VHH#m9A	VSWSSSTIVYADSVLG	RFTISRDNHQNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA
VHH#m9E	VSWSGGTTIVYADSVKG	RFEISRDNARNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA
	* * * * *	*****

	CDR3	FR4	Hinge
VHH#m3F	RPYQKYNWA-SASYNV	WGQGTQVTVSS	EPKTPKPQP
VHH#m4B	SP--KYMTAYERSYDF	WGQGTQVTVSS	EPKTPKPQP
VHH#m9A	RPYQKYNWA-SASYNV	WGQGTQVTVSS	-----
VHH#m9E	RPYQRFNWA-SASYNV	WGRGTQVTVSS	-----
	* * * * *	** *****	

Figura 8

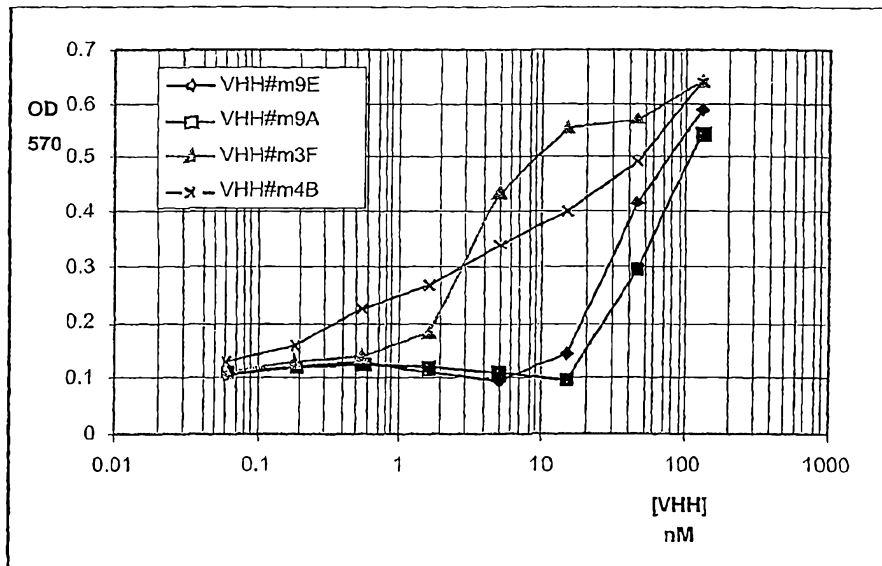


Figura 9

Figure 9

6/10

HindIII
1 aagcttgcac gcaaattcta tttcaaggag acagtcataa tgaataacct attgectacg gcagccgctg gattgttatt
M K Y L L P T A A A G L L L
< pelB-leader

SfiI *NcoI* *NotI* *PstI*
81 actcgcggcc cagccggcca tggggcctaa taggcggcgg cacaggtgca gctgcaggag tcataatgag ggaccacaggt
L A A Q P A M G P - - A A A Q V Q L Q E S - - G T Q V
Leader >< VHH#1 > < VHH#2

BstEII
161 caccgtctcc tcagaacaaa aatcatctc agaagaggat ctgaatgggg ccgcacatca tcatcatcat cattaatgag
T V S S E Q K L I S E E D L N G A A H H H H H - -
>< C-MYC > < His6 >

EcoRI
241 aattcactgg ccg

Figura 10

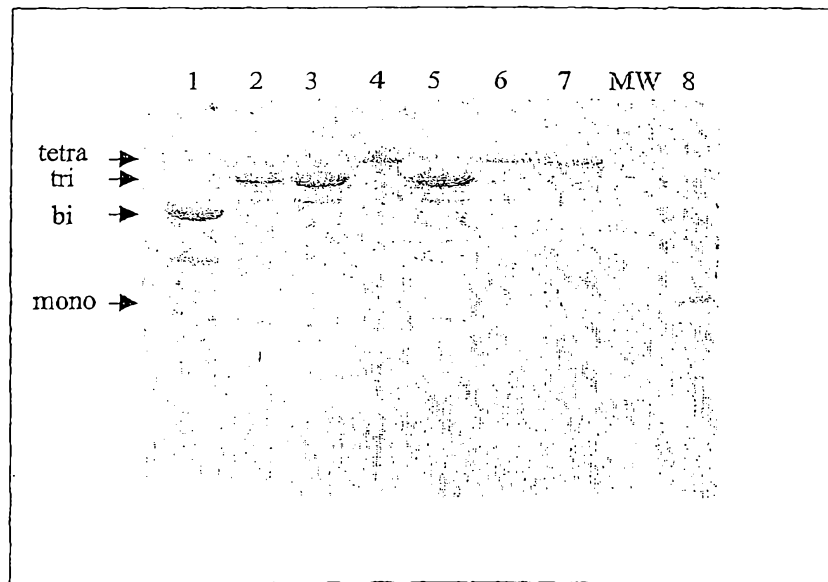


Figura 11

7/10

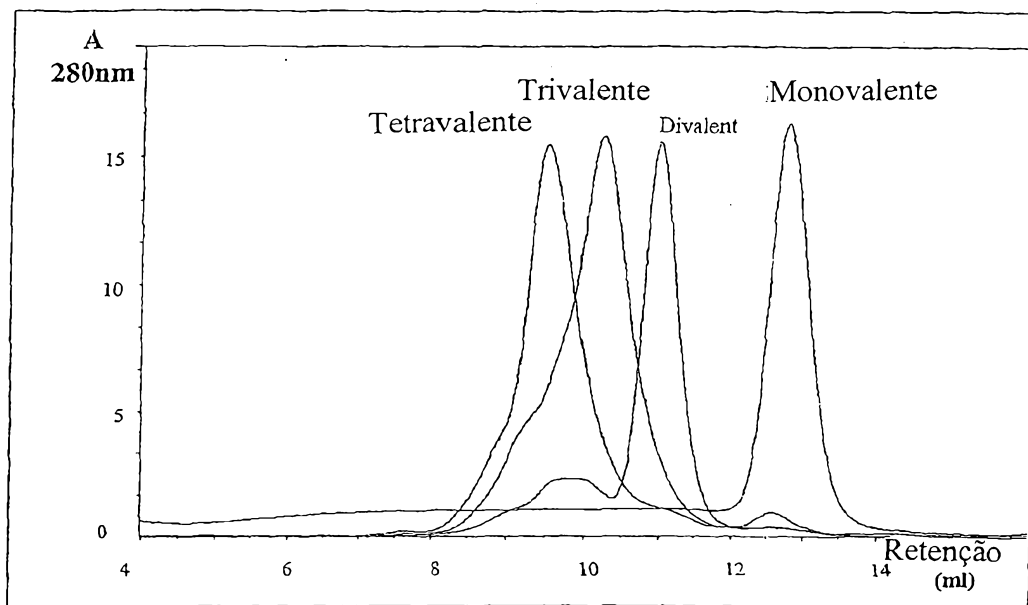


Figura 12

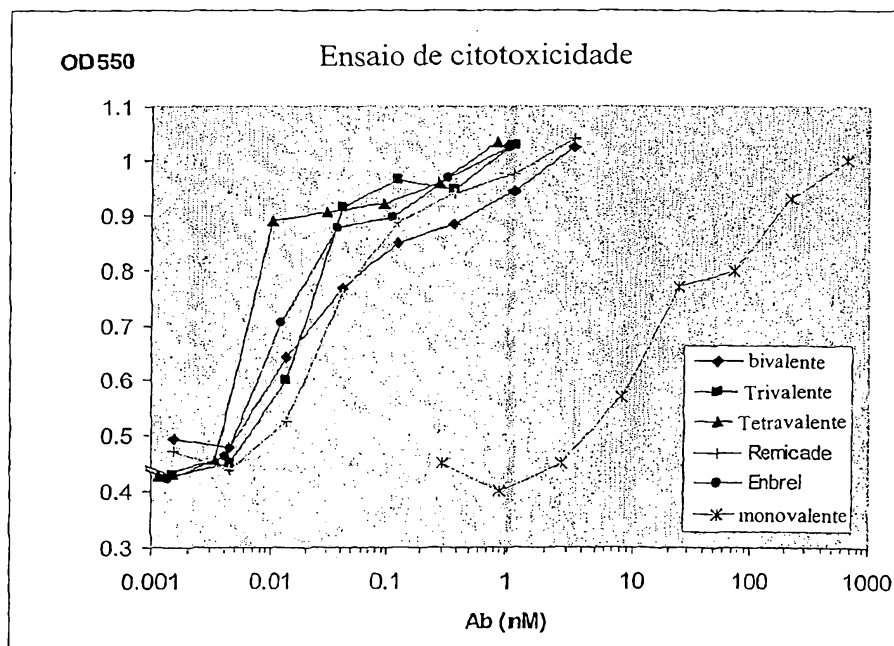


Figura 13

8/10

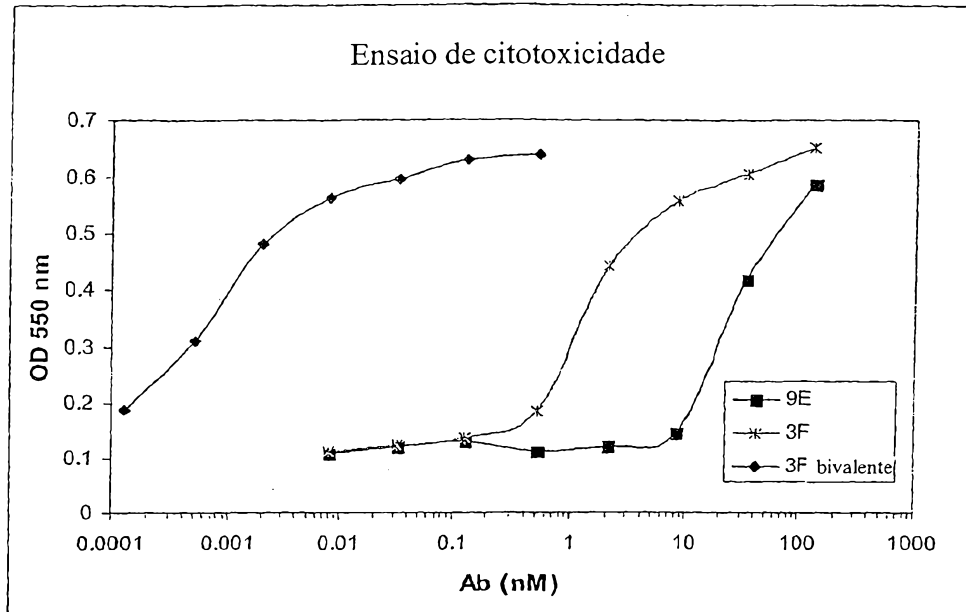


Figura 14

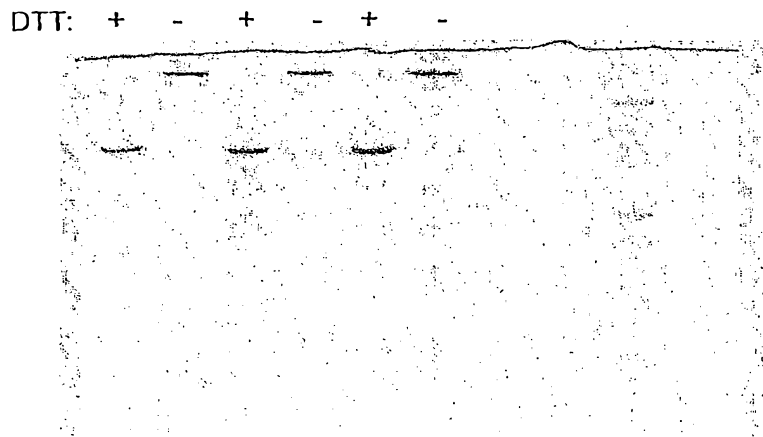


Figura 15

9/10

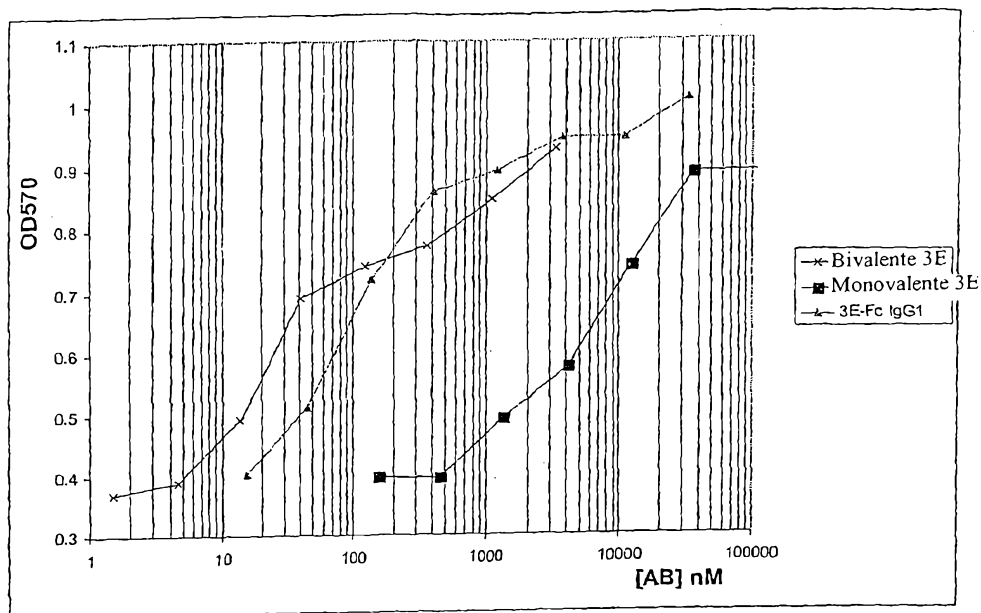


Figura 16

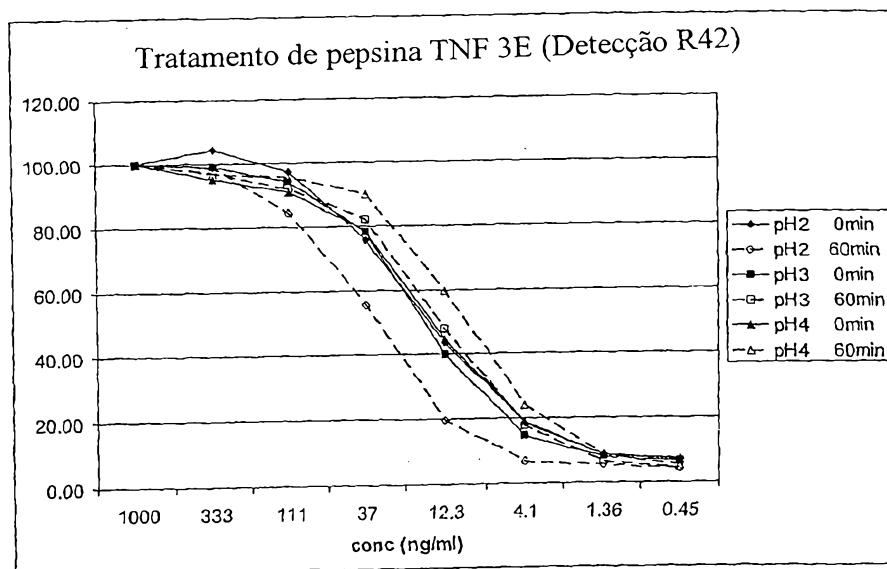


Figura 17

10/10

Modelo de indução DDS de colite crônica

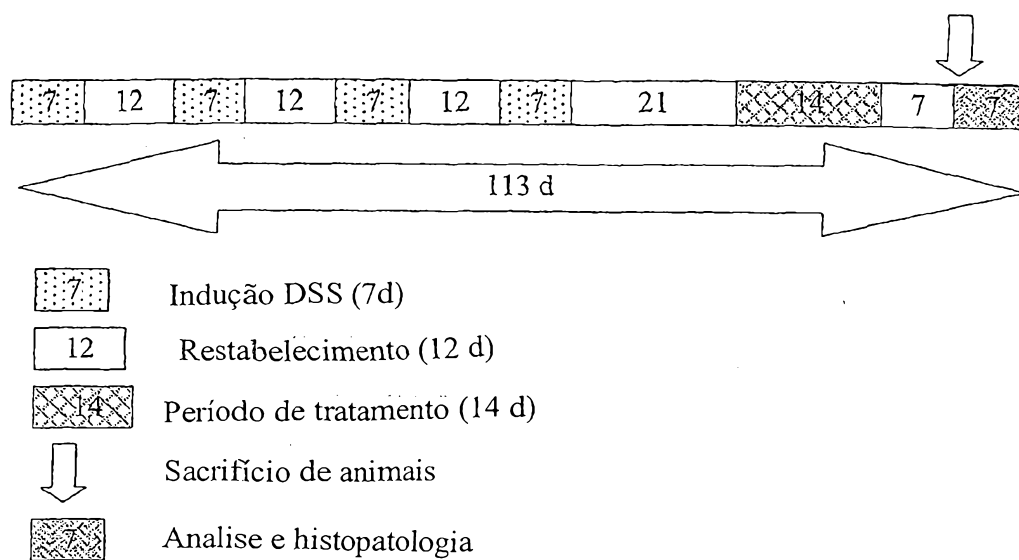


Figura 18