



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0106682-0 B1



(22) Data do Depósito: 05/06/2001

(45) Data de Concessão: 13/10/2020

(54) Título: MOLÉCULA DE ANTICORPO, COMPOSTO, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE CLONAGEM OU DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DA MOLÉCULA DE ANTICORPO, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA OU DIAGNÓSTICA, USO DA MOLÉCULA DE ANTICORPO E USO DO COMPOSTO

(51) Int.Cl.: C12N 15/13; C12N 15/62; C12N 15/70; C12N 1/21; C12N 15/09; (...).

(52) CPC: C07K 16/241; A61K 47/6845; A61K 47/6875; A61K 2039/505; C07K 2317/24; (...).

(30) Prioridade Unionista: 06/06/2000 GB 0013810.7.

(73) Titular(es): UCB PHARMA S.A..

(72) Inventor(es): DILJEET SINGH ATHWAL; DEREK THOMAS BROWN; ANDREW NEIL CHARLES WEIR; ANDREW GEORGE POPPLEWELL; ANDREW PAUL CHAPMAN; DAVID JOHN KING.

(86) Pedido PCT: PCT GB2001002477 de 05/06/2001

(87) Publicação PCT: WO 2001/094585 de 13/12/2001

(85) Data do Início da Fase Nacional: 31/01/2002

(57) Resumo: "MOLÉCULA DE ANTICORPO, VARIANTE DE MOLÉCULA DE ANTICORPO, ANTICORPO, COMPOSTO, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE CLONAGEM OU DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO DE E. COLI, CÉLULA HOSPEDEIRA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DA MOLÉCULA DE ANTICORPO, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA OU DIAGNÓSTICA, USO DA MOLECULA DE ANTICORPO, VETOR pDNAEng-G1, VETOR pTTO(CDP870), E, POLIPEPTÍDEO". Apresentam-se moléculas anticorpos contendo pelo menos um CDR derivado de um anticorpo monoclonal de camundongos com especificidade para o TNF244>. É também apresentado anticorpo enxertado de CDR em que pelo menos um dos CDRs é um CDR híbrido. São ainda apresentadas sequências de DNA que codificam as cadeias das moléculas anticorpos, vetores, células hospedeiras transformadas e usos das moléculas anticorpos no tratamento de doenças mediadas por TNF244>.

“MOLÉCULA DE ANTICORPO, COMPOSTO, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE CLONAGEM OU DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DA MOLÉCULA DE ANTICORPO, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA OU DIAGNÓSTICA, USO DA MOLÉCULA DE ANTICORPO E USO DO COMPOSTO”.

[0001] A presente invenção diz respeito a uma molécula de anticorpo com especificidade para determinantes antigênicos do fator alfa da necrose tumoral humana (TNF α). A presente invenção também diz respeito aos usos terapêuticos da molécula de anticorpo e processos para produzir a molécula de anticorpo.

[0002] Esta invenção diz respeito a moléculas anticorpos. Em uma molécula de anticorpo existem duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Cada cadeia pesada e cada cadeia leve tem em seu N-terminal um domínio variável. Cada domínio variável é composto de quatro regiões estruturais (FRs) alternando-se com três regiões complementarmente determinantes (CDRs). Os resíduos nos domínios variáveis são convencionalmente numerados de acordo com um sistema delineado por Kabat et al. Este sistema é apresentado em Kabat et al., 1987, em *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, USA [daqui por diante “Kabat et al. (supra)”]. Este sistema de numeração é usado no presente relatório descritivo, exceto onde de outra forma indicado.

[0003] As designações dos resíduos de Kabat nem sempre correspondem diretamente com a numeração linear dos resíduos de aminoácidos. A sequência de aminoácidos linear real pode conter menos aminoácidos ou aminoácidos adicionais, do que na numeração estrita de Kabat correspondendo a um encurtamento de, ou inserção em, um componente estrutural, quer estrutura ou CDR, da estrutura básica do domínio variável. A numeração correta de Kabat, dos resíduos, pode ser determinada para um dado anticorpo, mediante alinhamento dos resíduos de homologia na sequência do anticorpo com uma sequência numerada de Kabat “padrão”.

[0004] As CDRs do domínio variável de cadeia pesada são localizadas nos resíduos de 31 a 35 (CDRH1), nos resíduos de 50 a 65 (CDRH2) e nos resíduos de 95 a 102 (CDRH3) de acordo com a numeração de Kabat.

[0005] As CDRs do domínio variável de cadeia leve ficam localizadas nos resíduos de 24 a 34 (CDRL1), nos resíduos de 50 a 56 (CDRL2) e nos resíduos de 89 a 97 (CDRL3) de acordo com a numeração de Kabat.

[0006] A construção de anticorpos enxertados de CDR é descrita no Pedido de Patente Européia EP-A-0239400, que apresenta um processo em que as CDRs de um anticorpo monoclonal de camundongos são enxertadas nas regiões da estrutura dos domínios variáveis de uma imunoglobulina humana por mutagênese loco dirigida usando oligonucleotídeos longos. As CDRs determinam a especificidade de ligação a antígeno de anticorpos e são relativamente sequências de peptídeos curtos carregadas sobre as regiões da estrutura dos domínios variáveis.

[0007] O trabalho mais antigo sobre anticorpos monoclonais humanizantes mediante enxerto de CDR foi realizado sobre anticorpos monoclonais reconhecendo antígenos sintéticos, tais como NP. No entanto, exemplos em que um anticorpo monoclonal de camundongos reconhecendo a lisozima e um anticorpo monoclonal reconhecendo um antígeno em células T humanas foram humanizados por enxerto de CDR, foram descritos por Verhoeven et al. (Science, 239, 1534-1536, 1988) e Riechmann et al. (Nature, 332, 323-324, 1988), respectivamente.

[0008] Riechmann et al. observaram que a transferência das CDRs sozinhas [como definido por Kabat (Kabat et al. (supra) e Wu et al., J. Exp. Med. 132, 211-250, 1970)] não era suficiente para prover atividade de ligação a antígeno satisfatória no produto enxertado por CDR. Observou-se que vários resíduos da estrutura têm de ser alterados de modo que eles correspondam àqueles da região da estrutura doadora. Os critérios propostos para selecionar quais resíduos da estrutura necessitam ser alterados são descritos no Pedido de Patente Internacional WO 90/07861.

[0009] Várias reconsiderações examinando os anticorpos enxertados de CDR foram publicadas, incluindo Vaughan et al. (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

[0010] O TNF α é uma citocina pró-inflamatória que é liberada pelas células do sistema imune e com elas interage. Assim, o TNF α é liberado por macrófagos que

tenham sido ativados por lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas. Como tal, o TNF α parece ser um mediador endógeno de importância central envolvido no desenvolvimento e na patogênese do choque endotóxico associado com a sepsia bacteriana. O TNF α também tem sido apresentado como sendo supra-regulado em várias doenças humanas, incluindo doenças crônicas tais como a artrite reumatóide, a doença de Crohn, a colite ulcerativa e a esclerose múltipla. Camundongos transgênicos para TNF α humano produzem altos níveis de TNF α constitutivamente e desenvolvem uma poliartrite espontânea destrutiva parecida com a artrite reumatóide (Kaffer et al., EMBO J., 10, 4025-4031, 1991). O TNF α é, portanto, referido como uma citocina pró-inflamatória.

[0011] Anticorpos monoclonais contra TNF α foram descritos no estado da técnica. Meager et al., (Hybridoma, 6, 305-311, 1987) descrevem anticorpos monoclonais de murinos contra TNF α recombinante. Fendly et al., (Hybridoma, 6, 359-370, 1987) descrevem o uso de anticorpos monoclonais de murinos contra TNF α recombinante na definição de epítopos neutralizantes no TNF. Shimamoto et al., (Immunology Letters, 17, 311-318, 1988) descrevem o uso de anticorpos monoclonais de murinos contra TNF γ e seu uso na prevenção do choque endotóxico em camundongos. Além do mais, no Pedido de Patente Internacional WO 92/11383, são apresentados anticorpos recombinantes, incluindo anticorpos enxertados de CDR, específicos para TNF α . Rankin et al. (British J. Rheumatology, 34, 334-342, 1995) descrevem o uso de tais anticorpos enxertados de CDR no tratamento da artrite reumatóide. A US-A-5 919 452 apresenta anticorpos quiméricos anti-TNF e seu uso no tratamento de patologias associadas com a presença de TNF.

[0012] Anticorpos para TNF α têm sido propostos para a profilaxia e tratamento do choque endotóxico (Beutler et al., Science, 234, 470-474, 1985). Bodmer et al., (Critical Care Medicine, 21, S436-S440, 1993) examina o potencial terapêutico dos anticorpos anti-TNF α no tratamento de choque séptico. O uso de anticorpos anti-

TNF α no tratamento do choque séptico também é examinado por Kirschenbaum et al., (Critical Care Medicine, 26, 1625-1626, 1998). A artrite induzida por colágeno pode ser tratada eficazmente usando-se um anticorpo monoclonal anti-TNF α [Williams et al. (PNAS-USA, 89, 9784-9788, 1992)].

[0013] Níveis aumentados de TNF α são encontrados tanto no fluido sinovial quanto no sangue periférico de pacientes que sofrem de artrite reumatóide. Quando os agentes bloqueadores do TNF α são administrados a pacientes que sofrem de artrite reumatóide, eles reduzem a inflamação, melhoram os sintomas e retardam o dano das juntas [McKown et al. (Arthritis Rheum., 42, 1204-1208, 1999)].

[0014] O uso de anticorpos anti-TNF α no tratamento da artrite reumatóide e da doença de Crohn é examinado em Feldman et al., (Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998), Adorini et al., (Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997) e em Feldman et al., (Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997). Os anticorpos a TNF α usados em tais tratamentos são geralmente anticorpos quiméricos, tais como aqueles descritos na US-A-5 919 452.

[0015] Dois produtos bloqueadores do TNF α são presentemente licenciados para o tratamento da artrite reumatóide. O primeiro, chamado de etanercept, é comercializado pela Immunex Corporation como Enbrel[®]. Ele é uma proteína de fusão recombinante que compreende dois domínios receptores de TNF solúvel em p75 ligados à porção Fc de uma imunoglobulina humana. O segundo, denominado infliximab, é comercializado pela Centocor Corporation como Remicade[®]. Ele é um anticorpo quimérico que tem domínios variáveis anti-TNF α de murinos e domínios constantes de IgG1 humano.

[0016] As moléculas anticorpos anti-TNF α recombinantes do estado da técnica geralmente têm uma afinidade reduzida para com o TNF α , em comparação com os anticorpos dos quais as regiões variáveis ou as CDRs são derivadas, em geral têm de ser produzidas em células de mamíferos e são de fabricação dispendiosa. Os anticorpos anti-TNF α do estado técnica são descritos em Stephens et al.

(Immunology, 85, 668-674, 1995), na GB-A-2 246 570 e na GB-A-2 297 145.

[0017] Existe a necessidade de uma molécula de anticorpo para tratar de doenças inflamatórias crônicas, que possam ser usadas repetidamente e produzidas fácil e eficientemente. Existe também a necessidade de uma molécula de anticorpo que tenha alta afinidade com o TNF α e baixa imunogenicidade em seres humano.

[0018] Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula de anticorpo com especificidade para o TNF α , compreendendo uma cadeia pesada em que o domínio variável compreende uma CDR [como definido por Kabat et al., (supra)] tendo a sequência dada como H1 na Figura 3 (SEQ ID NO: 1) para CDRH1, como H2' na Figura 3 (SEQ ID NO: 2) ou como H2 na Figura 3 (SEQ ID NO: 7) para CDRH2 ou como H3 na Figura 3 (SEQ ID NO: 3) para CDRH3.

[0019] A molécula de anticorpo do primeiro aspecto da presente invenção compreende pelo menos uma CDR selecionada de H1, H2' ou H2 e H3 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 3) para o domínio variável de cadeia pesada. Preferivelmente, a molécula de anticorpo compreende pelo menos duas e, mais preferível, todas as três CDRs no domínio variável de cadeia pesada.

[0020] Em um segundo aspecto da presente invenção, é fornecida uma molécula de anticorpo com especificidade para TNF α humano, compreendendo uma cadeia leve em que o domínio variável compreende uma CDR [como definido por Kabat et al. (supra)] tendo a sequência dada como L1 na Figura 3 (SEQ ID NO: 4) para CDRL1, L2 na Figura 3 (SEQ ID NO: 5) para CDRL2 ou L3 na Figura 3 (SEQ ID NO: 6) para CDRL3.

[0021] A molécula de anticorpo do segundo aspecto da presente invenção compreende pelo menos uma CDR selecionada de L1, L2 e L3 (SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6) para o domínio variável de cadeia leve. De preferência, a molécula de anticorpo compreende pelo menos duas e mais, preferivelmente todas as três, CDRs no domínio variável de cadeia leve.

[0022] As moléculas anticorpos dos primeiro e segundo aspectos da presente invenção preferivelmente têm uma cadeia leve complementar ou uma cadeia

pesada complementar, respectivamente.

[0023] Preferivelmente, a molécula de anticorpo do primeiro ou segundo aspectos da presente invenção compreende uma cadeia pesada em que o domínio variável compreende uma CDR [como definido por Kabat et al., (supra)] tendo a sequência dada como H1 na Figura 3 (SEQ ID NO: 1) para CDRH1, como H2' ou H2 na Figura 3 (SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 7) para CDRH2 ou como H3 na Figura 3 (SEQ ID NO: 3) para CDRH3, e uma cadeia leve em que o domínio variável compreende uma CDR [como definido por Kabat et al. (supra)] tendo a sequência dada como L1 na Figura 3 (SEQ ID NO: 4) para CDRL1, como L2 na Figura 3 (SEQ ID NO: 5) para CDRL2 ou como L3 na Figura 3 (SEQ ID NO: 6) para CDRL3.

[0024] As CDRs dadas nas SEQ ID NOS: 1 e 3 a 7 e na Figura 3 referidas acima, são derivadas de um anticorpo hTNF40 monoclonal de camundongos. No entanto, a SEQ ID NO: 2 consiste de uma CDR híbrida. A CDR híbrida compreende parte da CDR2 de cadeia pesada do anticorpo hTNF40 monoclonal de camundongos (SEQ ID NO: 7) e parte da CDR2 de cadeia pesada de uma sequência de região da linha germinal V do grupo 3 humano.

[0025] As sequências completas dos domínios variáveis do anticorpo hTNF40 de camundongos são apresentadas nas Figuras 6 (cadeia leve) (SEQ ID NO: 99) e Figura 7 (cadeia pesada) (SEQ ID NO: 100). Este anticorpo de camundongos é referido abaixo como “o anticorpo doador”.

[0026] Uma primeira forma de realização alternativamente preferida dos primeiro ou segundo aspectos da presente invenção é o anticorpo hTNF40 monoclonal de camundongos tendo as sequências de domínio variável de cadeia leve e pesada mostradas na Figura 6 (SEQ ID NO: 99) e na Figura 7 (SEQ ID NO: 100), respectivamente, a região de hTNF40 constante de cadeia leve é kapa e a região constante de cadeia pesada é IgG2a.

[0027] Em uma segunda forma de realização alternativamente preferida, o anticorpo de acordo com qualquer um dos primeiro e segundo aspectos da presente invenção é uma molécula de anticorpo quimérica de camundongos/seres humanos, aqui referida como a molécula de anticorpo hTNF40 quimérica. A molécula de

anticorpo quimérica compreende os domínios variáveis do anticorpo monoclonal hTNF40 de camundongos (SEQ ID NOS: 99 e 100) e os domínios constantes humanos. De preferência, a molécula de anticorpo hTNF40 quimérica compreende o domínio kapa C humano (Hieter et al., Cell, 22, 197-207, 1980; número de acesso do Genebank J00241) na cadeia leve, e os domínios 4 gama humanos (Flanagan et al., Nature, 300, 709-713, 1982) na cadeia pesada.

[0028] Em uma terceira forma de realização alternativamente preferida, o anticorpo de acordo com qualquer um dos primeiro e segundo aspectos da presente invenção, é a molécula de anticorpo enxertada de CDR. A expressão “uma molécula de anticorpo enxertada de CDR”, como aqui usada, se refere a uma molécula de anticorpo em que a cadeia pesada e/ou leve contém uma ou mais CDRs (incluindo, se desejável, uma CDR híbrida) do anticorpo doador (por exemplo um anticorpo monoclonal de murinos) enxertado em uma estrutura de região variável de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo acceptor (por exemplo, um anticorpo humano).

[0029] Preferivelmente, um tal anticorpo enxertado de CDR possui um domínio variável compreendendo regiões de estrutura de acceptor humano, assim como um ou mais das CDRs doadoras referidas acima.

[0030] Quando as CDRs são enxertadas, qualquer sequência de estrutura da região variável do acceptor apropriado pode ser usada tendo relação com a classe/tipo do anticorpo doador do qual as CDR são derivadas, incluindo as regiões de estrutura de camundongos, primatas e seres humanos. Exemplos de estruturas humanas que podem ser usadas na presente invenção são KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY e POM [Kabat et al. (supra)]. Por exemplo, KOL e NEWM põem ser usados para a cadeia pesada, REI pode ser usado para a cadeia leve e EU, LAY e POM podem ser usados tanto para a cadeia pesada quanto para a cadeia leve. As regiões de estruturas preferidas para a cadeia leve são as regiões da estrutura do grupo 1 humano apresentadas na Figura 1 (SEQ ID NOS: 83, 85, 87 e 89). As regiões de estrutura preferidas para a cadeia pesada são as regiões de estrutura do grupo 1 e do grupo 3 humanos apresentadas na Figura 2 (SEQ ID NOS: 91, 93, 95 e 97 e SEQ ID NOS: 106, 107, 108 e 109, respectivamente).

[0031] Em um anticorpo enxertado de CDR da presente invenção, é preferível usar como o anticorpo acceptor um que tenha cadeias que sejam homólogas com as cadeias do anticorpo doador. As cadeias pesadas e leves do acceptor não necessitam necessariamente ser derivadas do mesmo anticorpo e podem, se desejável, compreender cadeias compósitas que tenham regiões de estrutura derivadas de diferentes cadeias.

[0032] Igualmente, em um anticorpo enxertado de CDR da presente invenção, as regiões de estrutura não necessitam ter exatamente a mesma sequência como aquelas do anticorpo acceptor. Por exemplo, resíduos incomuns podem ser mudados para resíduos de ocorrência mais freqüente para aquela classe ou tipo de cadeia do acceptor. Alternativamente, resíduos selecionados nas regiões de estrutura do acceptor podem ser mudados de modo que eles correspondam aos resíduos encontrados na mesma posição do anticorpo doador. Tais mudanças podem ser mantidas no mínimo necessário para recuperar a afinidade do anticorpo doador. Um protocolo para resíduos de seleção nas regiões de estrutura do acceptor, que pode necessitar ser mudado, é apresentado na WO 91/09967.

[0033] Preferivelmente, em uma molécula de anticorpo enxertada de CDR da presente invenção, se a cadeia pesada do acceptor tiver regiões de estrutura do grupo 1 humano (mostradas na Figura 2) (SEQ ID NOS: 91, 93, 95 e 97), então as regiões de estrutura do acceptor da cadeia pesada compreendem, além de uma ou mais CDRs doadoras, os resíduos doadores nas posições 28, 69 e 71 [de acordo com Kabat et al. (supra)].

[0034] Alternativamente, se a cadeia pesada do acceptor tiver regiões de estrutura do grupo 1, então as regiões de estrutura do acceptor da cadeia pesada compreendem, além de uma ou mais CDRs doadoras, resíduos doadores nas posições 28, 38, 46, 67, 69 e 71 [de acordo com Kabat et al. (supra)].

[0035] Preferivelmente, em uma molécula de anticorpo enxertada de CDR da presente invenção, se a cadeia pesada do acceptor tiver regiões de estrutura do grupo 3 humano (mostradas na Figura 2) (SEQ ID NOS: 106, 107, 108 e 109), então as regiões de estrutura do acceptor da cadeia pesada compreende, além de uma ou

mais CDRs doadoras, resíduos doadores nas posições 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 e 78 [de acordo com Kabat et al. (supra)].

[0036] Preferivelmente, em uma molécula de anticorpo enxertada de CDR da presente invenção, se a cadeia leve do acceptor tiver regiões de estrutura do grupo 1 humano (mostradas na Figura 1) (SEQ ID NOS: 83, 85, 87 e 89), então as regiões de estrutura do acceptor da cadeia leve compreende resíduos doadores nas posições 46 e 60 [de acordo com Kabat et al. (supra)].

[0037] Resíduos doadores são resíduos do anticorpo doador, isto é, o anticorpo do qual as CDRs foram originalmente derivadas.

[0038] A molécula de anticorpo da presente invenção pode compreender: uma molécula de anticorpo completa, tendo cadeias pesadas e leves de comprimento completo; um seu fragmento, tal como um fragmento Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂ ou Fv; um monômero ou dímero de cadeia leve ou cadeia pesada; um anticorpo de cadeia única, por exemplo um Fv de cadeia única em que os domínios variáveis de cadeia pesada e leve são unidos por um ligador de peptídeo. De forma semelhante, as regiões variáveis de cadeia pesada e leve podem ser combinadas com outros domínios do anticorpo, conforme apropriado.

[0039] Preferivelmente, a molécula de anticorpo da presente invenção é um fragmento Fab. De preferência o fragmento Fab tem uma cadeia pesada com a sequência dada como SEQ ID NO: 111 e uma cadeia leve com a sequência dada como SEQ ID NO: 113. As sequências de aminoácidos dadas na SEQ ID NO: 111 e na SEQ ID NO: 113 são preferivelmente codificadas pelas sequências de nucleotídeos dadas nas SEQ ID NO: 110 e SEQ ID NO: 112, respectivamente.

[0040] Alternativamente, é preferível que a molécula de anticorpo da presente invenção seja um fragmento Fab modificado em que a modificação seja a adição à extremidade C-terminal de seu um ou mais aminoácidos de cadeia pesada para permitir a ligação de uma molécula efetora ou repórter. Preferivelmente, os aminoácidos adicionais formam uma região da dobradiça modificada contendo um ou dois resíduos de cisteína aos quais a molécula efetora ou repórter pode ser ligada. Um tal fragmento Fab modificado preferivelmente tem uma cadeia pesada

tendo a sequência dada como SEQ ID NO: 115 e a cadeia leve tendo a sequência dada como SEQ ID NO: 113. A sequência de aminoácidos dada na SEQ ID NO: 115 é preferivelmente codificada pela sequência de nucleotídeos dada na SEQ ID NO: 114.

[0041] Um grupo efetor preferido é uma molécula polimérica, que pode ser ligada ao fragmento Fab modificado para aumentar sua meia-vida in vivo.

[0042] A molécula polimérica pode, em geral, ser um polímero sintético ou de ocorrência natural, por exemplo um polímero de polialquileno, polialquenileno ou polioxialquileno de cadeia reta ou ramificada opcionalmente substituído, ou um polissacarídeo ramificado ou não ramificado, por exemplo um homo ou heteropolissacarídeo.

[0043] Substituintes particulares opcionais que podem estar presentes nos polímeros sintéticos acima mencionados incluem um ou mais grupos hidróxi, metila ou metóxi. Exemplos particulares de polímeros sintéticos incluem os poli(etileno glicol), poli(propileno glicol), poli(álcool vinílico), de cadeia reta ou ramificada opcionalmente substituídos, ou derivados destes, especialmente o poli(etileno glicol) opcionalmente substituído, tal como metoxipoli(etileno glicol) ou derivados deste. Polímeros particulares de ocorrência natural incluem a lactose, a amilose, o dextrano, o glicogênio ou derivados destes. “Derivados”, como aqui usado, intenta incluir derivados reativos, por exemplo grupos reativos seletivos de tiol, tais como as maleimidas e outros. O grupo reativo pode ser ligado diretamente, ou através de um segmento ligador, ao polímero. Observar-se-á que o resíduo de um tal grupo fará parte, em alguns casos, do produto como o grupo de ligação entre o fragmento de anticorpo e o polímero.

[0044] O tamanho do polímero pode ser variado como desejável, mas em geral terá um peso molecular médio na faixa de 500 Da a 50000 Da, preferivelmente de 5000 a 40000 Da e, o mais preferível, de 25000 a 40000 Da. O tamanho do polímero pode, em particular, ser selecionado à base do uso pretendido do produto. Assim, por exemplo, quando o produto se destina a deixar a circulação e penetrar no tecido, por exemplo para uso no tratamento de um tumor, pode ser vantajoso

usar um polímero de peso molecular pequeno, por exemplo com um peso molecular ao redor de 5000 Da. Para aplicações em que o produto permaneça na circulação, pode ser vantajoso usar um polímero de peso molecular mais elevado, por exemplo tendo um peso molecular na faixa de 25000 Da a 40000 Da.

[0045] Polímeros particularmente preferidos incluem um polímero de polialquileno, tal como um poli(etileno glicol) ou, especialmente, um metoxipoli(etileno glicol) ou um seu derivado, e especialmente com um peso molecular na faixa de cerca de 25000 Da a cerca de 40000 Da.

[0046] Cada molécula polimérica ligada ao fragmento de anticorpo modificado pode ser covalentemente ligado ao átomo de enxofre de um resíduo de cisteína localizado no fragmento. A articulação covalente será, em geral, uma ligação dissulfeto ou, em particular, uma ligação enxofre-carbono.

[0047] Quando desejável, o fragmento de anticorpo pode ter uma ou mais moléculas efetoras ou repórteres a ele ligado. As moléculas efetoras ou repórteres podem ser ligadas ao fragmento de anticorpo através de qualquer grupo funcional de cadeia lateral de aminoácido ou de aminoácido terminal disponível localizado no fragmento, por exemplo qualquer grupo livre amino, imino, hidroxila ou carboxila.

[0048] Um polímero ativado pode ser usado como o material de partida na preparação de fragmentos de anticorpos modificados por polímeros, como descrito acima. O polímero ativado pode ser qualquer polímero contendo um grupo reativo de tiol, tal como um ácido ou éster α -halocarboxílico, por exemplo iodoacetamida, uma imida, por exemplo maleimida, uma sulfona vinílica ou um dissulfeto. Tais materiais de partida podem ser obtidos comercialmente (por exemplo da Sheareater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA), ou podem ser preparados de materiais de partida comercialmente disponíveis usando-se procedimentos químicos convencionais.

[0049] Quanto às porções de ligação de poli(etileno glicol) (PEG), faz-se referência a "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris e

S. Zalipsky (eds.), American Chemical Society, Washington DC, e “Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”, 1998, M. Aslam e A. Dent, Grove Publishers, New York.

[0050] Quando for desejável obter-se um fragmento de anticorpo ligado a uma molécula efetora ou repórter, este pode ser preparado por procedimentos químicos padrão ou de DNA recombinante em que o fragmento de anticorpo seja ligado ou diretamente ou através de um agente de acoplamento à molécula efetora ou repórter, ou antes ou após a reação com o polímero ativado, como seja apropriado. Procedimentos químicos específicos incluem, por exemplo, aqueles descritos nas WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195 e WO 89/01476. Alternativamente, quando a molécula efetora ou repórter for uma proteína ou polipeptídeo, a articulação pode ser obtida usando-se procedimentos de DNA recombinante, por exemplo como descrito na WO 86/01533 e na EP-A-0392745.

[0051] Preferivelmente, o fragmento Fab modificado da presente invenção é PEGilado {isto é, tem PEG [poli(etileno glicol)] covalentemente a ele ligado} de acordo com o processo apresentado na EP-A-0948544. Preferivelmente, a molécula de anticorpo da presente invenção é um fragmento Fab modificado PEGilado, como mostrado na Figura 13. Como mostrado na Figura 13, o fragmento Fab modificado tem um grupo maleimida covalentemente ligado a um grupo tiol único em uma região da dobradiça modificada. Um resíduo de lisina é covalentemente ligado ao grupo maleimida. Para cada um dos grupos amina no resíduo de lisina é ligado um polímero de metoxipoli(etileno glicol) tendo um peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. O peso molecular total da molécula efetora inteira é, portanto, de aproximadamente 40.000 Da.

[0052] Preferivelmente, no composto apresentado na Figura 13, a cadeia pesada da parte do anticorpo tem a sequência dada como SEQ ID NO: 115 e a cadeia leve tem a sequência dada na SEQ ID NO: 113. Este composto é aqui referido como CDP870.

[0053] Os domínios constantes da região da molécula de anticorpo da presente invenção, se presentes, podem ser selecionados tendo relação com a função

proposta da molécula de anticorpo e, em particular, as funções efetoras que podem ser requeridas. Por exemplo, os domínios da região constante podem ser os domínios humanos IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM. Em particular, os domínios da região constante IgG podem ser usados, especialmente dos isótipos IgG1 e IgG 3 quando a molécula de anticorpo é pretendida para usos terapêuticos e as funções efetoras do anticorpo são necessárias. Alternativamente, os isótipos IgG2 e IgG4 podem ser usados quando a molécula de anticorpo é pretendida para fins terapêuticos e as funções efetoras do anticorpo não são necessárias, por exemplo para simplesmente bloquear a atividade do $\text{TNF}\alpha$.

[0054] Igualmente, a molécula de anticorpo da presente invenção pode ter uma molécula efetora ou uma repórter a ela ligada. Por exemplo, ela pode ter um macrociclo, para quelação de um átomo de metal pesado, ou uma toxina, tal como ricina, a ela ligada mediante uma estrutura em ponte covalente. Alternativamente, os procedimentos da tecnologia de DNA recombinante podem ser usados para produzir uma molécula de anticorpo em que o fragmento Fc (domínios CH2, CH3 e da dobradiça), os domínios CH2 e CH3, ou o domínio CH3 de uma molécula completa de imunoglobulina tenha(m) sido substituídos por, ou tenha(m) ligado a eles por articulação peptídeo, uma proteína funcional não imunoglobulina, tal como uma enzima ou molécula de toxina.

[0055] A molécula de anticorpo da presente invenção preferivelmente possui uma afinidade de ligação de pelo menos $0,85 \times 10^{-10}$ M, mais preferivelmente pelo menos $0,75 \times 10^{-10}$ M, e o mais preferível pelo menos $0,5 \times 10^{-10}$ M. (É digno de nota que a molécula de anticorpo humanizada preferida da presente invenção, como descrito abaixo, tem uma afinidade de cerca de $0,5 \times 10^{-10}$ M, que é melhor do que a afinidade do anticorpo monoclonal de murinos, do qual é derivada. O anticorpo de murinos tem uma afinidade de cerca de $0,85 \times 10^{-10}$ M).

[0056] Preferivelmente, a molécula de anticorpo da presente invenção compreende o domínio variável de cadeia leve hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8) e o domínio variável de cadeia pesada gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11). As sequências dos domínios variáveis destas cadeias leve e pesada são apresentadas nas Figuras

8 e 11, respectivamente.

[0057] A presente invenção também diz respeito a variantes da molécula de anticorpo da presente invenção, que têm uma afinidade melhorada quanto a TNF α . Tais variantes podem ser obtidas por vários protocolos de maturação de afinidade, incluindo transformar as CDRs (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), misturar as cadeias (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), o uso de cepas de E. coli transformadoras (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), mistura de DNA (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), apresentação de fato (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) e PCR sexual (Crameri et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (acima) examina estes processos de maturação de afinidade.

[0058] A presente invenção também fornece uma sequência de DNA codificando a(s) cadeia(s) pesada e/ou leve da molécula de anticorpo da presente invenção.

[0059] Preferivelmente, a sequência de DNA codifica a cadeia pesada ou a leve da molécula de anticorpos da presente invenção.

[0060] Em uma forma de realização preferida, a sequência de DNA codifica uma cadeia leve e compreende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 8 (hTNF40-gL1) ou SEQ ID NO: 9 (hTNF40-gL2) ou um seu equivalente degenerado.

[0061] Em uma forma de realização alternativamente preferida, a sequência de DNA codifica uma cadeia pesada e compreende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 10 (gh1hTNF40.4) ou na SEQ ID NO: 11 (gh3hTNF40.4) ou um seu equivalente degenerado.

[0062] A sequência de DNA da presente invenção pode compreender DNA sintético, por exemplo produzido por processamento químico, cDNA, DNA genômico ou qualquer combinação destes.

[0063] A presente invenção também diz respeito a um vetor de clonagem ou de expressão compreendendo uma ou mais sequências de DNA da presente invenção. Preferivelmente, o vetor de clonagem ou de expressão compreende duas sequências de DNA, codificando a cadeia leve e a cadeia pesada da molécula de anticorpo da presente invenção, respectivamente.

[0064] Em uma forma de realização preferida, a presente invenção fornece um vetor de expressão de *E. coli* compreendendo uma sequência de DNA da presente invenção. Preferivelmente o vetor de expressão é pTTO(CDP870), conforme mostrado esquematicamente na Figura 22.

[0065] A presente invenção também compreende o vetor pDNAEng-G1, conforme mostrado na Figura 19.

[0066] Processos gerais pelos quais os vetores podem ser construídos, processos de transfecção e processos de cultura são bem conhecidos daqueles versados na técnica. A este respeito, referência é feita a “Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F. M. Ausubel (ed.), Wiley Interscience, New York, e ao Maniatis Manual produzido por Cold Spring Harbor Publishing.

[0067] As sequências de DNA que codificam a molécula de anticorpo da presente invenção podem ser obtidas por processos bem conhecidos daqueles versados na técnica. Por exemplo, as sequências de DNA que codificam para parte ou todas as cadeias pesadas e leves de anticorpos podem ser sintetizadas conforme desejável, a partir das sequências de DNA determinadas ou na base das sequências de aminoácidos correspondentes.

[0068] O DNA codificando para as sequências de estruturaceptoras é amplamente disponível daqueles versados na técnica e pode ser facilmente sintetizado à base de suas sequências de aminoácidos conhecidas.

[0069] Técnicas padrão da biologia molecular podem ser usadas para preparar sequências de DNA codificando para a molécula de anticorpo da presente invenção. Sequências de DNA desejadas podem ser sintetizadas completamente ou em parte usando-se técnicas de síntese de oligonucleotídeos. As técnicas de mutagênese loco dirigida e reação da polimerase em cadeia (PCR) podem ser usadas, conforme apropriado.

[0070] Qualquer sistema adequado de célula hospedeira/vetor pode ser usado para expressão das sequências de DNA que codificam a molécula de anticorpo da presente invenção. Sistemas bacterianos, por exemplo *E. coli*, e outros sistemas microbianos podem ser usados, em parte, para expressão de fragmentos de

anticorpos, tais como os fragmentos Fab e F(ab')₂, e especialmente os fragmentos Fv e os fragmentos de anticorpos de cadeia única, por exemplo, Fvs de cadeia única. Sistemas de expressão de células hospedeiras eucarióticas, por exemplo, de mamíferos, podem ser usados para produção de moléculas anticorpo maiores, incluindo as moléculas anticorpo completas. Células hospedeiras de mamíferos adequadas incluem as células CHO, de mieloma ou de hibridoma.

[0071] A presente invenção também provê um processo para a produção de uma molécula de anticorpo de acordo com a presente invenção, compreendendo cultivar uma célula hospedeira que compreende um vetor da presente invenção sob condições adequadas para levar à expressão da proteína do DNA codificando a molécula de anticorpo da presente invenção, e isolar a molécula de anticorpo.

[0072] Preferivelmente o processo para a produção da molécula de anticorpo da presente invenção compreende cultivar E. coli compreendendo um vetor de expressão de E. coli contendo a sequência de DNA da presente invenção sob condições adequadas para levar à expressão da proteína da sequência de DNA e isolar a molécula de anticorpo. A molécula de anticorpo pode ser secretada da célula ou alvejada ao periplasma por sequências sinal adequadas. Alternativamente, as moléculas anticorpo podem acumular-se dentro do citoplasma das células. Preferivelmente a molécula de anticorpo é alvejada ao periplasma. Dependendo da molécula de anticorpo que está sendo produzida e do processo usado, é desejável deixar as moléculas anticorpo reduplicarem-se e adotar uma conformação funcional. Procedimentos para deixar as moléculas anticorpo se reduplicarem são bem conhecidos daqueles habilitados na técnica.

[0073] A molécula de anticorpo pode compreender apenas um polipeptídeo de cadeia pesada ou leve, em cujo caso apenas uma sequência codificando o polipeptídeo de cadeia pesada ou cadeia leve necessita ser usada para transfectar as células hospedeiras. Para produção de produtos que compreendam tanto cadeias pesadas quanto leves, a linhagem celular pode ser transfectada com dois vetores, um primeiro vetor codificando um polipeptídeo de cadeia leve e um segundo vetor codificando um polipeptídeo de cadeia pesada. Alternativamente, um

vetor único pode ser usado, o vetor incluindo sequências que codificam polipeptídeos de cadeia leve e cadeia pesada.

[0074] A presente invenção também provê uma composição terapêutica ou diagnóstica compreendendo uma molécula de anticorpo da presente invenção em combinação com um excipiente, diluente ou portador farmaceuticamente aceitáveis.

[0075] A presente invenção também provê um processo para preparação de uma composição terapêutica ou diagnóstica compreendendo misturar a molécula de anticorpo da presente invenção junto com um excipiente, diluente ou portador farmaceuticamente aceitáveis.

[0076] A molécula de anticorpo pode ser o único ingrediente ativo na composição terapêutica ou diagnóstica ou pode ser acompanhada por outros ingredientes ativos, incluindo outros ingredientes de anticorpos, por exemplo anticorpos anti-célula T, anti-IFN γ ou anti-LPS, ou ingredientes não anticorpos, tais como xantinas.

[0077] As composições farmacêuticas devem preferivelmente compreender uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo da invenção. A expressão “quantidade terapeuticamente eficaz”, como aqui usada, se refere a uma quantidade de um agente terapêutico necessário para tratar, melhorar ou prevenir uma doença ou condição alvo, ou para apresentar um efeito terapêutico ou preventivo detectável. Para qualquer anticorpo, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente ou em ensaios de cultura celular ou em modelos de animais, comumente em roedores, coelhos, cães, porcos ou primatas. O modelo animal também pode ser usado para determinar a faixa de concentração e a via de administração apropriadas. Tal informação pode, então, ser usada para determinar as doses e as vias de administração úteis em seres humanos.

[0078] A quantidade eficaz precisa para um paciente humano dependerá da gravidade do estado da doença, da saúde geral do paciente, da idade, do peso e do sexo do paciente, da dieta, do tempo e da frequência de administração, da(s) combinação(ões) de medicamentos, das sensibilidades de reação e da tolerância/resposta à terapia. Esta quantidade pode ser determinada por

experimentação de rotina e está dentro do julgamento do clínico. Geralmente, uma dose eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferivelmente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg, mais preferivelmente de cerca de 15 mg/kg. Como mostrado nos exemplos abaixo, as doses de 1, 5 e 20 mg/kg têm sido usadas para tratar pacientes que estejam sofrendo de artrite reumatóide.

[0079] As composições podem ser administradas individualmente a um paciente ou podem ser administradas em combinação com outros agentes, medicamentos ou hormônios.

[0080] A dose em que a molécula de anticorpo da presente invenção é administrada depende da natureza da condição a ser tratada, do grau a que o nível de TNF α a ser neutralizado é, ou espera-se que seja, elevado acima de um nível desejável, e se a molécula de anticorpo está sendo usada profilaticamente ou para tratar uma condição existente.

[0081] Assim, por exemplo, quando o produto é para tratamento ou profilaxia de uma doença inflamatória crônica, tal como artrite reumatóide, doses adequadas da molécula de anticorpo da presente invenção situam-se na faixa entre 0,5 e 50 mg/kg, mais preferivelmente entre 1 e 20 mg/kg, e o mais preferível de cerca de 15 mg/kg. A frequência de dose dependerá da meia-vida da molécula de anticorpo e da duração de seu efeito.

[0082] Se a molécula de anticorpo tiver uma meia-vida curta (por exemplo de 2 a 10 horas), pode ser necessário dar uma ou mais doses por dia. Alternativamente, se a molécula de anticorpo tiver uma meia-vida longa (por exemplo de 2 a 15 dias), pode apenas ser necessário dar uma dosagem uma vez por dia, por semana ou, mesmo, uma vez a cada 1 ou 2 meses.

[0083] Uma composição farmacêutica pode também conter um portador farmacêuticamente aceitável para administração do anticorpo. O portador não deve, por si próprio, induzir a produção de anticorpos prejudiciais ao paciente que esteja recebendo a composição, e não deve ser tóxico. Portadores adequados podem ser macromoléculas grandes lentamente metabolizáveis, tais como proteínas, polipeptídeos, lipossomas, polissacarídeos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos,

aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos e partículas virais inativas.

[0084] Sais farmacêuticamente aceitáveis podem ser usados, por exemplo sais de ácidos minerais, tais como cloridretos, bromidretos, fosfatos e sulfatos, ou sais de ácidos orgânicos, tais como acetatos, propionatos, malonatos e benzoatos.

[0085] Veículos farmacêuticamente aceitáveis em composições terapêuticas podem adicionalmente conter líquidos tais como água, solução salina, glicerol e etanol. Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como agentes umectantes ou emulsificantes ou substâncias de tamponamento de pH, podem estar presentes em tais composições. Tais portadores permitem que as composições farmacêuticas sejam formuladas como tabletes, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas e suspensões, para ingestão pelo paciente.

[0086] Formas preferidas para administração incluem formas adequadas para administração parenteral, por exemplo por injeção ou infusão, por exemplo por injeção de bolo ou infusão contínua. Quando o produto é para injeção ou infusão, ele pode tomar a forma de uma suspensão, solução ou emulsão em um veículo oleoso ou aquoso, e pode conter agentes formuladores, tais como agentes de suspensão, preservativos, estabilizadores e/ou dispersantes. Alternativamente, a molécula de anticorpo pode estar na forma seca, para reconstituição antes do uso com um líquido estéril apropriado.

[0087] Uma vez formuladas, as composições da invenção podem ser administradas diretamente ao paciente. Os pacientes a serem tratados podem ser animais. No entanto, é preferível que as composições sejam adaptadas para administração a pacientes humanos.

[0088] As composições farmacêuticas desta invenção podem ser administradas por qualquer número de vias, inclusive, sem que a estas fiquem limitadas, as vias oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutânea (para exemplo, ver a WO 98/20734), subcutânea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal ou retal. Hipopulverizadores também podem ser usados para administrar as composições farmacêuticas da invenção. Tipicamente, as composições terapêuticas podem ser

preparadas como injetáveis, ou como soluções ou suspensões líquidas. Formas sólidas adequadas para solução, ou suspensão, em veículos líquidos antes da injeção podem também ser preparadas.

[0089] A liberação direta das composições geralmente será realizada por injeção, por via subcutânea, intraperitoneal, intravenosa ou intramuscular, ou liberadas ao espaço intersticial de um tecido. As composições também podem ser administradas a uma lesão. O tratamento de dosagem pode ser um programa de dose única ou um programa de dose múltipla.

[0090] Observar-se-á que o ingrediente ativo na composição será uma molécula de anticorpo. Como tal, ele será suscetível de degradação no trato gastrointestinal. Assim, se a composição tiver de ser administrada por uma via que utilize o trato gastrointestinal, a composição necessitará conter agentes que protejam o anticorpo contra a degradação, mas que libera o anticorpo uma vez ele tenha sido absorvido do trato gastrointestinal.

[0091] Um exame completo de veículos farmacêuticamente aceitáveis acha-se disponível em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mark Publishing Company, N.J. 1991).

[0092] É também considerado que o anticorpo da presente invenção venha a ser administrado mediante o uso de terapia de genes. De modo a obter isto, as sequências de DNA codificando as cadeias pesada e leve da molécula de anticorpo sob o controle de componentes apropriados de DNA, são introduzidas em um paciente de tal modo que as cadeias do anticorpo sejam expressas das sequências de DNA e montadas in situ.

[0093] A presente invenção também fornece a molécula de anticorpo da presente invenção para uso no tratamento de uma doença mediada por $\text{TNF}\alpha$.

[0094] A presente invenção ainda fornece o uso da molécula de anticorpo de acordo com a presente invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença mediada por $\text{TNF}\alpha$.

[0095] A molécula de anticorpo da presente invenção pode ser utilizada em

qualquer terapia em que seja desejável reduzir o nível de TNF α biologicamente ativo presente no corpo humano ou animal. O TNF α pode estar circulando no corpo ou estar presente em um nível indesejavelmente elevado localizado em um sítio particular no corpo.

[0096] Por exemplo, níveis elevados de TNF α são envolvidos em distúrbios imunes e imunorreguladores agudos e crônicos, infecções incluindo o choque séptico, endotóxico e cardiovascular, distúrbios inflamatórios, doenças neurodegenerativas, doenças malignas e hepatite induzida pelo álcool. Detalhes dos numerosos distúrbios associados com níveis elevados de TNF α são apresentados na US-A-5 919 452. A molécula de anticorpo da presente invenção pode ser utilizada na terapia de doenças mediadas por TNF α . Doenças particularmente relevantes que podem ser tratadas pela molécula de anticorpo da presente invenção incluem a sepsia, a insuficiência cardíaca congestiva, o choque séptico ou endotóxico, a caquexia, a síndrome da angústia respiratória de adultos, a AIDS, as alergias, a psoríase, TB, distúrbios ósseos inflamatórios, distúrbios da coagulação sanguínea, queimaduras, episódios de rejeição em seguida a transplante de órgão ou de tecido, a doença de Crohn e doenças autoimunes tais como a tireodite e a artrite reumatóide e a osteoartrite.

[0097] Adicionalmente, a molécula de anticorpo ou a composição podem ser usadas: para reduzir efeitos colaterais associados com a geração de TNF α durante terapia neoplástica; para eliminar ou reduzir sintomas relacionados com choques associados com o tratamento ou prevenção de rejeição de enxertos mediante o uso de um anticorpo anti-linfócito; ou para tratar da insuficiência de múltiplos órgãos.

[0098] A molécula de anticorpo da presente invenção é preferivelmente usada para tratamento da artrite reumatóide e da osteoartrite.

[0099] A presente invenção também fornece um processo para tratar de pacientes humanos ou animais que estejam sofrendo ou em risco de um distúrbio mediado por TNF α , o processo compreendendo administrar ao paciente uma

quantidade eficaz da molécula de anticorpo da presente invenção.

[00100] A molécula de anticorpo da presente invenção pode também ser usada em diagnóstico, por exemplo no diagnóstico e formação de imagem in vivo de estados de doença envolvendo níveis elevados de $\text{TNF}\alpha$.

[00101] A presente invenção também provê uma molécula de anticorpo que compreende uma CDR híbrida contendo uma sequência de CDR doadora truncada em que a parte que falta da CDR doadora truncada é substituída por uma sequência diferente e forma uma CDR funcional. A expressão “CDR híbrida” como aqui usada significa uma CDR que compreende uma CDR doadora que tenha sido truncada em uma ou mais posições, por exemplo em uma ou ambas de suas extremidades. A parte que falta da CDR doadora truncada é substituída por uma sequência diferente para formar uma CDR completa e funcional. A CDR híbrida tem pelo menos uma mudança de aminoácidos em comparação com a CDR doadora completa. A sequência substituindo a parte truncada da CDR pode ser qualquer sequência. Preferivelmente, a parte não doadora da sequência de CDR é do anticorpo do qual as regiões de estrutura da molécula de anticorpo são derivadas, tal como a sequência anticorpo da linha germinal.

[00102] Foi observado que as moléculas anticorpo compreendendo uma CDR híbrida retêm substancialmente a mesma afinidade de ligação da molécula de anticorpo que compreende CDRs doadoras completas. A expressão “substancialmente a mesma afinidade de ligação”, como aqui usada, significa pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 85% e, o mais preferível, pelo menos 95% da afinidade de ligação da molécula de anticorpo correspondente compreendendo as CDRs doadoras completas. Como observado acima, em certos casos, a afinidade do anticorpo da invenção pode ser maior do que aquela do anticorpo doador. O uso de uma CDR híbrida provê as vantagens de reduzir a quantidade de sequência estranha (isto é, doadora) presente na molécula de anticorpo e pode aumentar a afinidade de ligação da molécula de anticorpo em comparação com a molécula de anticorpo correspondente que compreende as CDRs doadoras completas.

[00103] Qualquer uma das CDRs da molécula de anticorpo pode ser híbrida. Preferivelmente a CDR2 da cadeia pesada é híbrida na molécula de anticorpo.

[00104] Preferivelmente o truncamento da CDR doadora é de 1 a 8 aminoácidos, mais preferivelmente de 4 a 6 aminoácidos. É ainda preferível que o truncamento seja feito no C terminal da CDR.

[00105] Dependendo da sequência da parte truncada da CDR e da sequência da sequência diferente que substitui a parte que falta, várias mudanças de aminoácidos podem ser feitas. Preferivelmente pelo menos 2 mudanças de aminoácidos são feitas, mais preferivelmente pelo menos 3 mudanças de aminoácidos são feitas e, o mais preferível, pelo menos 4 mudanças de aminoácidos são feitas.

[00106] Uma forma de realização particular deste aspecto da invenção é um anticorpo de acordo com o primeiro aspecto da invenção, em que a segunda CDR na cadeia pesada tem a sequência dada como SEQ ID NO: 2. Esta tem melhor afinidade quanto a seu antígeno do que o anticorpo doador do qual parte da CDR é derivada.

[00107] A presente invenção também fornece uma sequência de ácido nucleico que codifica a molécula de anticorpo contendo uma CDR híbrida da presente invenção.

[00108] A presente invenção também fornece um vetor de expressão contendo a sequência de ácido nucleico codificando a molécula de anticorpo contendo uma CDR híbrida da presente invenção.

[00109] A presente invenção também fornece uma célula hospedeira transformada com o vetor da presente invenção.

[00110] A presente invenção também fornece um processo para a produção de uma molécula de anticorpo compreendendo uma CDR híbrida, compreendendo cultivar a célula hospedeira da presente invenção e isolar a molécula de anticorpo.

[00111] A presente invenção é ainda descrita por meio de ilustração apenas nos seguintes exemplos, que se referem às Figuras anexas, em que:

[00112] A Figura 1 apresenta regiões da estrutura do subgrupo 1 de cadeia leve humana, em comparação com as regiões da estrutura da cadeia leve hTNF40 (SEQ

ID NO: 83 a 90);

[00113] A Figura 2 apresenta regiões da estrutura do subgrupo 1 da cadeia pesada humana e do subgrupo 3 em comparação com as regiões da estrutura da cadeia pesada hTNF40 (SEQ ID NO: 91 a 98 e 106 a 109);

[00114] A Figura 3 apresenta a sequência de aminoácidos das CDRs de hTNF40 (SEQ ID NOS: 1 a 7), em que a CDR H2' é uma CDR híbrida em que os seis aminoácidos C-terminais são da sequência da CDR H2 de um anticorpo de linha germinal do subgrupo 3 humano e as mudanças do aminoácido para a sequência resultante desta hibridização acham-se sublinhadas;

[00115] A Figura 4 apresenta o vetor pMR15.1;

[00116] A Figura 5 apresenta o vetor pMR14;

[00117] A Figura 6 apresenta o nucleotídeo e a sequência predita de aminoácidos do hTNF40VI de murinos (SEQ ID NO: 99);

[00118] A Figura 7 apresenta o nucleotídeo e a sequência predita de aminoácidos do hTNF40Vh de murinos (SEQ ID NO: 100);

[00119] A Figura 8 apresenta o nucleotídeo e a sequência predita de aminoácidos do hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8);

[00120] A Figura 9 apresenta o nucleotídeo e a sequência predita de aminoácidos do hTNF40-gL2 (SEQ ID NO: 9);

[00121] A Figura 10 apresenta o nucleotídeo e a sequência predita de aminoácidos do gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO: 10);

[00122] A Figura 11 apresente o nucleotídeo e a sequência de aminoácidos prevista de gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11);

[00123] A Figura 12 apresenta o vetor CTIL5-gL6;

[00124] A Figura 13 apresenta a estrutura de um composto denominado CDP870 compreendendo um fragmento Fab modificado derivado do anticorpo hTNF40 covalentemente ligado através de um resíduo de cisteína a um ligador de lisil-maleimida em que cada grupo amino no resíduo de lisil tem covalentemente ligado a ele um resíduo de PEG metóxi em que n é de cerca de 420;

[00125] A Figura 14 apresenta o vetor pTTQ9;

[00126] A Figura 15 apresenta a sequência do adaptador de oligonucleotídeo OmpA (SEQ ID NO: 101);

[00127] A Figura 16 apresenta o vetor pACYC184;

[00128] A Figura 17 apresenta o vetor pTTO-1;

[00129] A Figura 18 apresenta o vetor pTTO-2;

[00130] A Figura 19 apresenta o vetor pDNAEng-G1;

[00131] A Figura 20 apresenta os cassetes de oligonucleotídeos codificando diferentes sequências intergênicas para a expressão de Fab modificada por *E. coli* (SEQ ID NOS: 102 a 105);

[00132] A Figura 21 apresenta o acúmulo de Fab periplásmico modificado das variantes IGS;

[00133] A Figura 22 apresenta o vetor pTTO(CDP870);

[00134] A Figura 23 apresenta a classificação da atividade da doença (DAS) em pacientes tratados com diferentes doses de CDP870 e placebo. As faixas medianas e IQ são apresentadas para a população per-protocolo com última observação conduzida para diante. Os quadrados pequenos indicam o placebo, losangos indicam 1 mg/kg, triângulos indicam 5 mg/kg e os quadrados grandes indicam 20 mg/kg;

[00135] A Figura 24 apresenta a contagem de juntas sensíveis, contagem de juntas inchadas, escore da dor, avaliação global do avaliador sobre a atividade da doença, questionário modificado de avaliação da saúde (HAQ), proteína C-reativa (CRP) e velocidade de sedimentação dos eritrócitos (ESR), em pacientes tratados com diferentes doses de CDP870 e placebo. A faixa mediana e de quociente de inteligência são apresentados quanto à população do per-protocolo com a última observação conduzida para diante. Os quadrados pequenos indicam o placebo, os losangos indicam 1 mg/kg, os triângulos indicam 5 mg/kg e os quadrados grandes indicam 20 mg/kg.

[00136] EXEMPLOS

[00137] Clonagem do gene e expressão de uma molécula de anticorpo hTNF40 quimérica

[00138] Preparação do RNA a partir das células do hibridoma hTNF40

[00139] O RNA total foi preparado de 3×10^7 células do hibridoma hTNF40 conforme descrito abaixo. As células foram lavadas em solução salina fisiológica e dissolvidas em RNazol (0,2 ml por 10^6 células). Foi adicionado clorofórmio (0,3 ml por 2 ml de homogeneizado), a mistura foi vigorosamente sacudida por 15 minutos e, então, deixada sobre gelo por 15 minutos. As fases aquosas e orgânicas resultantes foram separadas por centrifugação por 15 minutos em uma centrífuga de Eppendorf e o RNA foi precipitado da fase aquosa pela adição de um volume igual de isopropanol. Após 15 minutos sobre gelo, o RNA foi pelotizado por centrifugação, lavado com etanol a 70%, secado e dissolvido em água estéril isenta de RNase. O rendimento do RNA foi de 400 µg.

[00140] Clonagem de hTNF40 Vh E VI POR PCR

[00141] As sequências de cDNA codificando para os domínios variáveis de cadeias pesadas e leves de hTNF40 foram sintetizadas usando-se a transcriptase reversa para produzir cópias de cDNA de filamento único do mRNA presente no RNA total, seguido pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) nos cDNAs com iniciadores de oligonucleotídeos específicos.

[00142] a) SÍNTESE DE cDNA

[00143] O cDNA foi sintetizado em um volume de reação de 20 µl contendo os seguintes reagentes: Tris 50 mM-HCl, pH 8,3, KCl 75 mM, ditiotretitol 10 mM, $MgCl_2$ 3 mM, 0,5 mM de cada trifosfato de deoxirribonucleosídeo, 20 unidades de RNAsin, 75 ng de iniciador de hexanucleotídeo aleatório, 2 µg de RNA hTNF40 e 200 unidades da transcriptase reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney. Após a incubação a 42°C por 60 minutos, a reação foi encerrada mediante aquecimento a 95°C durante 5 minutos.

[00144] b) PCR

[00145] Alíquotas do cDNA foram submetidas a PCR usando-se combinações de iniciadores específicos para cadeias pesadas e leves. As sequências de nucleotídeos dos iniciadores 5' para as cadeias pesadas e leves são apresentadas

nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Estas sequências contêm, todas, em ordem, um sítio de restrição iniciando a 7 nucleotídeos de suas extremidades 5', a sequência GCCGCCACC (SEQ ID NO: 12), para permitir translação ótima dos mRNAs resultantes, um códon de iniciação e 20 a 30 nucleotídeos com base nas sequências condutoras de peptídeos de anticorpos de camundongos conhecidos (Kabat et al., 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edição, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

[00146] Os iniciadores 3' são apresentados na Tabela 3. O iniciador de cadeia leve abarca a junção J-C do anticorpo e contém um sítio de restrição para a enzima SphI para facilitar a clonagem do fragmento de PCR V1. Os iniciadores 3' de cadeia pesada são uma mistura projetada para abarcar a junção H-C do anticorpo. O iniciador 3' inclui um sítio de restrição ApaI para facilitar a clonagem. A região 3' dos iniciadores contém uma sequência mista com base naqueles encontrados em anticorpos de camundongos conhecidos (Kabat et al., 1991, supra).

[00147] As combinações de iniciadores descritas acima possibilitam que os produtos da PCR quanto a Vh e V1 sejam clonados diretamente em um vetor de expressão apropriado (ver abaixo) para produzir cadeias pesadas e leves quiméricas (de camundongo-humanas) e quanto a estes genes sejam expressos em células de mamíferos para produzir anticorpos quiméricos do isótipo desejado.

[00148] As incubações (100 µl) para a PCR foram estabelecidas como segue. Cada reação continha Tris 10 mM-HCl pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, 0,01% de gelatina p/v, 0,25 mM de cada trifosfato de deoxirribonucleosídeo, mistura de iniciador 5' 10 pmoles (Tabela 4), iniciador 3' 10 pmoles [CL12 (cadeia leve) ou R2155 (cadeia pesada) (Tabela 3)], 1 µl de cDNA e 1 unidade de Taq polimerase. As reações foram incubadas a 95°C por 5 minutos e, então, ciclizadas sem interrupção a 94°C por 1 minuto, a 55°C por 1 minuto e a 72°C por 1 minuto. Depois de 30 ciclos, as alíquotas de cada reação foram analisadas por eletroforese em um gel de agarose. As reações de cadeia leve contendo misturas de iniciadores 5' das combinações de cadeia leve 1, 2 e 7 produziram bandas com tamanhos

consistentes com fragmentos VI de comprimento completo, enquanto a combinação 3 da reação de cadeia pesada produziu um fragmento com o tamanho esperado de um gene Vh. A banda produzida pelos iniciadores da combinação 1 de cadeia leve não foi seguida já que os resultados anteriores haviam mostrado que esta banda corresponde a um pseudogene de cadeia leve produzido pela célula do hibridoma. A banda produzida pelos iniciadores da combinação 7 de cadeia leve foi mais fraca do que a banda dos iniciadores da combinação 2 e, portanto, não foi seguida. Apenas a banda da combinação 2 da reação de cadeia leve, que era a banda mais forte, foi seguida.

[00149] c) CLONAGEM MOLECULAR DOS FRAGMENTOS DA PCR

[00150] Os fragmentos de DNA produzidos na combinação 2 da reação de cadeia leve foram digeridos com as enzimas BstBI e SphI, concentrados por precipitação de etanol, submetidos a eletroforese sobre 1,4% de gel de agarose e bandas de DNA na faixa de 400 pares de base recuperados. Estes foram clonados por ligação no vetor pMR15.1 (Figura 4) que havia sido restringido com BstBI e SphI. Após a ligação, as misturas foram transformadas em LM 1035 de E. coli e os plasmídeos das colônias bacterianas resultantes foram examinados quanto aos insertos por digestão com BstBI e SphI. Os representantes com insertos de cada ligação foram analisados ainda por seqüenciação de nucleotídeos.

[00151] De uma maneira semelhante, os fragmentos de DNA produzidos na combinação 3 da reação de cadeia pesada foram digeridos com HindIII e ApaI e clonados no vetor pMR14 (Figura 5), que havia sido restringido com HindIII e ApaI. Novamente, os plasmídeos representativos contendo os insertos foram analisados por seqüenciação de nucleotídeos.

[00152] d) ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS

[00153] O DNA plasmídeo de vários isolados contendo os insertos Vh foi seqüenciado usando-se os iniciadores R1053 (ver Tabela 5) (que inicia na região 3' do promotor HCMV em pMR14) e R720 (ver Tabela 5) (que inicia na região 5' de C-gama 4 humano e permite a seqüenciação através do inserto de DNA em pMR14). Foi observado que as seqüências de nucleotídeos do inserto Vh em vários clones

eram idênticas, exceto quanto às diferenças no peptídeo de sinal e nas regiões J. Isto indicou que os clones examinados são isolados independentes originários do uso de diferentes iniciadores da mistura de oligonucleotídeos durante o estágio da PCR. A sequência de nucleotídeos determinada e a sequência de aminoácidos prevista do domínio variável da cadeia pesada do anticorpo hTNF40 (hTNF40Vh) são dadas na Figura 7 (SEQ ID NO: 100).

[00154] A análise dos clones de cadeia leve, a sequência derivada do preparo com R1053 (ver Tabela 5) e R684 (SEQ ID NO: 62) (que inicia na região 5' de C-capá humano e permite a seqüenciação através do inserto de DNA em pMR15.1), foi examinada. A sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos prevista dos genes V1 que surgiram das reações na combinação 2, foram analisadas de forma semelhante. Foi novamente observado que as sequências de nucleotídeos do inserto V1 em diversos clones eram idênticas, exceto quanto às diferenças no peptídeo de sinal e nas regiões J, indicando que os clones examinados eram isolados independentes originários do uso de diferentes iniciadores da mistura de oligonucleotídeos usada durante o estágio da PCR. A sequência de nucleotídeos determinada e a sequência de aminoácidos prevista do domínio variável da cadeia leve do anticorpo hTNF40 (hTNF40VI) são dadas na Figura 6 (SEQ ID NO: 99).

[00155] TABELA 1

[00156] Iniciadores de oligonucleotídeos para a região 5' de cadeias pesadas de camundongos.

CH1 : 5'ATGAAATGCAGCTGGGTCAT(G,C)TTCTT3' (SEQ ID NO:13)
 CH2 : 5'ATGGGATGGAGCT(A,G)TATCAT(C,G)(C,T)TCTT3' (SEQ ID NO:14)
 CH3 : 5'ATGAAG(A,T)TGTGGTTAAACTGGGTTTT3' (SEQ ID NO:15)
 CH4 : 5'ATG(G,A)ACTTTGGG(T,C)TCAGCTTG(G,A)T3' (SEQ ID NO:16)
 CH5 : 5'ATGGACTCCAGGCTCAATTAGTTTT3' (SEQ ID NO:17)
 CH6 : 5'ATGGCTGTC(C,T)T(G,A)G(G,C)GCT(G,A)CTCTTCTG3' (SEQ ID NO:18)
 CH7 : 5'ATGG(G,A)ATGGAGC(G,T)GG(G,A)TCTTT(A,C)TCTT3' (SEQ ID NO:19)
 CH8 : 5'ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG3' (SEQ ID NO:20)
 CH9 : 5'ATGG(C,A)TTGGGTGTGGA(A,C)CTTGCTATT3' (SEQ ID NO:21)
 CH10 : 5'ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCT3' (SEQ ID NO:22)
 CH11 : 5'ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG3' (SEQ ID NO:23)
 CH12 : 5'ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT3' (SEQ ID NO:24)

[00157] Cada um dos iniciadores acima tem a sequência 5' GCGCGCAAGCTTGCCGCCACC 3' (SEQ ID NO: 25) adicionada à sua extremidade 5'.

[00158] TABELA 2

[00159] Iniciadores de oligonucleotídeos para a região 5' de cadeias pesadas de camundongos.

- CL1 : 5'ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT3' (SEQ ID NO:26)
- CL2 : 5'ATGGAG(T,A)CAGACACACTCCTG(T,C)TATGGGT3' (SEQ ID NO:27)
- CL3 : 5'ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT3' (SEQ ID NO:28)
- CL4 : 5'ATGAGG(G,A)CCCCTGCTCAG(A,T)TT(C,T)TTGG3' (SEQ ID NO:29)
- CL5 : 5'ATGGATTT(T,A)CAGGTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEQ ID NO:30)
- CL5A : 5'ATGGATTT(T,A)CA(A,G)GTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (SEQ ID NO:31)
- CL6 : 5'ATGAGGT(T,G)C(T,C)(T,C)TG(T,C)T(G,C)AG(T,C)T(T,C)CTG(A,G)G3' (SEQ ID NO:32)
- CL7 : 5'ATGGGC(T,A)TCAAGATGGAGTCACA3' (SEQ ID NO:33)
- CL8 : 5'ATGTGGGGA(T,C)CT(G,T)TTT(T,C)C(A,C)(A,C)TTTTTCAAT3' (SEQ ID NO:34)
- CL9 : 5'ATGGT(G,A)TCC(T,A)CA(G,C)CTCAGTTCCTT3' (SEQ ID NO:35)
- CL10 : 5'ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTC3' (SEQ ID NO:36)
- CL11 : 5'ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT3' (SEQ ID NO:37)
- CL12A : 5'ATG(A,G)AGT(T,C)(A,T)CAGACCCAGGTCTT(T,C)(A,G)T3' (SEQ ID NO:38)
- CL12B : 5'ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT3' (SEQ ID NO:39)
- CL13 : 5'ATGGATTACAGGCCAGGTTCTTAT3' (SEQ ID NO:40)
- CL14 : 5'ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTT3' (SEQ ID NO:41)
- CL15 : 5'ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT3' (SEQ ID NO:42)
- CL16 : 5'ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT3' (SEQ ID NO:43)
- CL17A : 5'ATGAGGTGCCTA(A,G)CT(C,G)AGTTCCTG(A,G)G3' (SEQ ID NO:44)
- CL17B : 5'ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG3' (SEQ ID NO:45)
- CL17C : 5'ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG3' (SEQ ID NO:46)

[00160] Cada um dos iniciadores acima tem a sequência 5' GGACTGTTCGAAGCCGCCACC 3' (SEQ ID NO: 47) adicionada à sua extremidade 5'.

[00161] TABELA 3

[00162] Iniciadores de oligonucleotídeos para as extremidades 3' dos genes Vh E VI de camundongos.

[00163] Cadeia leve (CL12):

5' GGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTT 3' (SEQ ID NO: 48)

[00164] Cadeia pesada (R2155):

5'GCAGATGGGCCCCTTCGTTGAGGCTG(A,C)(A,G)GAGAC(G,T,A)GTGA 3' (SEQ ID NO: 49)

[00165] TABELA 4

a) misturas de iniciadores 5' para as reações de pcr de cadeia leve

combinação 1 : CL2.

combinação 2 : CL7.

combinação 3 : CL13.

combinação 4 : CL 6.

combinação 5 : CL5A, CL9, CL17A.

combinação 6 : CL8.

combinação 7 : CL12A.

combinação 8 : CL1, CL3, CL4, CL5, CL10, CL11, CL2B, CL14,

CL15, CL16, CL17B, CL17C

b) misturas de iniciadores 5' para as reações de pcr de cadeia pesada

combinação 1 : CH1, CH2, CH3, CH4.

combinação 2 : CH5, CH6, CH7, CH8.

combinação 3 : CH9, CH10, CH11, CH12.

[00166] TABELA 5

[00167] Iniciadores usados na análise da sequência de nucleotídeos

R1053 : 5' GCTGACAGACTAACAGACTGTTCC 3' (SEQ ID NO: 50)

R720 : 5' GCTCTCGGAGGTGCTCCT 3' (SEQ ID NO: 51)

[00168] Avaliação das atividades dos genes quiméricos

[00169] As atividades dos genes quiméricos foram avaliadas pela sua expressão em células de mamíferos e pela purificação e quantificação dos anticorpos recém-sintetizados. A metodologia para isto é descrita abaixo, seguida por uma descrição dos ensaios com base bioquímica e celular usados para a caracterização biológica dos anticorpos.

a) PRODUÇÃO DE MOLÉCULA DE ANTICORPO hTNF40 QUIMÉRICO

[00170] O anticorpo quimérico para avaliação biológica foi produzido por expressão transiente dos pares de cadeias pesada e leve apropriados após co-transfecção nas células do Ovário de Hamster Chinês (CHO), usando-se a precipitação de fosfato de cálcio.

[00171] No dia antes da transfecção, frascos semi-confluentes de células CHO-L761 foram tripsinadas, as células foram contadas e frascos T75 foram preparados cada um com 10^7 células.

[00172] No dia seguinte, o meio de cultura foi mudado 3 horas antes da transfecção. Para a transfecção, o precipitado de fosfato de cálcio foi preparado pela mistura de 1,25 ml de CaCl_2 0,25 M contendo 50 μg de cada um dos vetores de expressão da cadeia pesada e leve com 1,25 ml de 2 x HBS (16,36 g de NaCl, 11,0 g de HEPES e 0,4 g de Na_2HPO_4 em 1 litro de água com o pH ajustado em 7,1 com NaOH) e adição imediata no meio das células. Após 3 horas a 37°C em uma incubadora de CO_2 , o meio e o precipitado foram removidos e as células foram impactadas pela adição de 15 ml de glicerol a 15% em solução salina tamponada de fosfato (PBS) por 1 minuto. O glicerol foi removido, as células lavadas uma vez com PBS e incubadas por 48 a 96 horas em 25 ml de meio contendo butirato de sódio a 10 mM. O anticorpo pôde ser purificado do meio de cultura por ligação à, e eluição da, proteína A-Sepharose.

[00173] b) ELISA

[00174] Para o ELISA, placas de ELISA Nunc foram revestidas durante a noite em 4°C com um fragmento F(ab)_2 de um anticorpo policlonal específico do fragmento Fc

anti-humano de cabra (Jackson ImmunoResearch, código 109-006-098) em 5 µg/ml em tampão de revestimento (carbonato de sódio 15 mM, carbonato hidrogenado de sódio 35 mM, pH 6,9). O anticorpo não revestido foi removido mediante lavagem por 5 vezes com água destilada. As amostras e os padrões purificados a serem quantificados foram diluídos em aproximadamente 1 µg/ml em tampão conjugado (Tris 0,1 M-HCl, pH 7,0, NaCl 0,1 M, Tween 20 0,2% v/v, caseína de Hammarsten). As amostras foram tituladas nos reservatórios de microtitulação em diluições duplas para dar um volume final de 0,1 ml em cada reservatório e as placas incubadas em temperatura ambiente por 1 horas, com vibração. Após a primeira etapa de incubação, as placas foram lavadas por 10 vezes com água destilada e, depois, incubadas por 1 horas como antes com 0,1 ml de um anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase capa anti-humano de camundongos (clone GD12) (The Binding Site, código MP135) em uma diluição de 1 em 700 em tampão conjugado. A placa foi lavada novamente e a solução do substrato (0,1 ml) adicionada a cada reservatório. A solução do substrato continha 150 µl de N,N,N,N-tetrametilbenzidina (10 mg/ml em DMSO), 150 µl de peróxido de hidrogênio (solução a 30%) em 10 ml de acetato de sódio 0,1 M/citrato de sódio, pH 6,0. A placa foi desenvolvida por 5 a 10 minutos até que a absorbância em 630 nm fosse de aproximadamente 1,0 para o padrão superior. A absorbância em 630 nm foi medida usando-se uma leitora de placa e a concentração da amostra foi determinada por comparação das curvas de titulação com aquelas do padrão.

[00175] c) determinação das constantes de afinidade pela análise biacore

[00176] A interação de ligação entre hTNF40 e TNF humano foi examinada usando-se a tecnologia BIA. Um anticorpo policlonal de cabra purificado por afinidade, dirigido contra a região constante de hTNF40, foi imobilizado na superfície de lasca sensora polimérica de dextrano usando-se a química padrão NHS/EDC. Níveis relativamente baixos (200 a 500 RU) de hTNF40 foram capturados para assegurar que os efeitos de transporte de massa fossem minimizados. TNF humano em diferentes concentrações foi passado através do hTNF40 capturado para

permitir a avaliação das cinéticas de associação. Em seguida à injeção do ligando, o tampão foi passado sobre a superfície de modo que a dissociação pudesse ser medida. As constantes do índice de associação e de dissociação para a interação entre o hTNF40 de fase sólida e o TNF humano, foram calculadas, e um valor K_D foi deduzido.

[00177] EXEMPLO 1

[00178] Enxerto de CDR de hTNF40

[00179] A clonagem molecular de genes para as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves do anticorpo hTNF40 e seu uso para produzir anticorpos hTNF40 quiméricos (camundongo-humano) foram descritos acima. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do hTNF40 V1 e Vh de murinos são apresentadas nas Figuras 6 e 7 (SEQ ID NOS: 99 e 100), respectivamente. Este exemplo descreve a enxerto de CDR do anticorpo hTNF40.

[00180] Enxerto de CDR de cadeia leve de hTNF40

[00181] O alinhamento das regiões de estrutura de cadeia leve de hTNF40 com aquelas dos quatro subgrupos de cadeia leve humana [Kabat et al. (supra)]. revelou que hTNF40 foi mais homólogo aos anticorpos no subgrupo 1 de cadeia leve humana. Conseqüentemente, para construir a cadeia leve enxertada de CDR, as regiões de estrutura escolhidas corresponderam àquelas da sequência de consenso do grupo 1 humano.

[00182] Uma comparação das sequências de aminoácidos das regiões de estrutura de hTNF40 de murinos com as cadeias leves do grupo 1 humano de consenso, é dada na Figura 1 e mostra que existem 22 diferenças (sublinhadas) entre as duas sequências. A análise da contribuição que qualquer uma destas diferenças de estrutura podem ter sobre a ligação de antígenos identificou 2 resíduos para exame; estes estão nas posições 46 e 60. Com base nesta análise, duas versões da cadeia leve enxertada de CDR foram construídas. Na primeira destas, hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8), os resíduos 46 e 60 derivam da cadeia leve de hTNF40, enquanto, na segunda, hTNF40-gL2 (SEQ ID NO: 9), todos os resíduos são de consenso humano, exceto o resíduo número 60, que é da cadeia leve de

hTNF40.

[00183] Construção de hTNF40-gL1 de cadeia leve enxertada de CDR

[00184] A construção de hTNF40-gL1 é dada abaixo em detalhes. Os seguintes oligonucleotídeos de sobreposição (P7982 a P7986) foram usados nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para montar uma cadeia leve enxertada truncada. O fragmento montado carece da sequências condutora de anticorpos e dos primeiros 17 aminoácidos da estrutura 1.

[00185] oligo 1 P7982:

[00186] 5' GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCCAGTCAGAACGTA
GGTACTAACGTAGCCTGGTATCAGCAA 3' (SEQ ID NO: 52)

[00187] oligo 2 P7983:

[00188] 5' ATAGAGGAAAGAGGCACTGTAGATGAGGGCTTTTGGGGCTTT
ACCTGGTTTTTGCTGATACCAGGCTACGT 3' (SEQ ID NO: 53)

[00189] oligo 3 P7984:

[00190] 5' TACAGTGCCTCTTTCCTCTATAAGTGGTGTACCATACAGGTTC
[00191] AGCGGATCCGGTAGTGGTACTGATTTTAC 3' (SEQ ID NO: 54)

[00192] oligo 4 P7985:

[00193] 5' GACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGGCTACTGAT
[00194] CGTGAGGGTGAAATCAGTACCACTACCG 3' (SEQ ID NO: 55)

[00195] oligo 5 P7986:

[00196] 5' ATTTGCCCACTTATTACTGTCAACAGTATAACATCTACCCACTC
[00197] ACATTCGGTCAGGGTACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGAATTC 3'
(SEQ ID NO: 56)

[00198] Fwd P7981:

[00199] 5' GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCC 3' (SEQ ID NO: 57)

[00200] Bwd P7980:

[00201] 5' GAATTCCGTACGTTTGATTTCTACTTTAGT 3' (SEQ ID NO: 58),

[00202] Uma reação de PCR, 100 µl, foi disposta contendo Tris 100 mM-HCl, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina 0,01% p/v, 0,25 mM de cada trifosfato de desoxirribonucleosídeo, 2 pmoles de P7982, P7983, P7984, P7985, P7986, 10

pmoles de P7980, 7981 e 1 unidade de Taq polimerase. As reações foram ciclizadas sem interrupção a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após 30 ciclos, cada reação foi analisada por eletroforese em um gel de agarose e o fragmento de PCR foi excisado do gel e recuperado usando-se um Kit Mermaid. O fragmento recuperado foi restringido com as enzimas BstEII e SphI no tampão apropriado. O produto resultante foi finalmente submetido a eletroforese em um gel de agarose o fragmento de DNA de 270 pares de base foi recuperado de uma fatia de gel e ligado no vetor CTIL5-gL6 (Figura 12), que havia sido previamente digerido com as mesmas enzimas. O vetor acima fornece a sequência condutora de anticorpo que falta e os primeiros 17 aminoácidos da estrutura 1.

[00203] A mistura de ligação foi usada para transformar a cepa LM1035 de *E. coli* e as colônias resultantes foram analisadas por PCR, os digestos da enzima de restrição e a seqüenciação de nucleotídeos. A sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da região V1 de hTNF40-gL1 é mostrada na Figura 8 (SEQ ID NO: 8).

[00204] Construção de hTNF40-gL2 da cadeia leve enxertada de CDR.

[00205] hTNF40-gL2 (SEQ ID NO: 9) foi construído usando-se PCR. Os seguintes oligonucleotídeos foram usados para introduzir as mudanças de aminoácidos:

[00206] R1053 : 5' GCTGACAGACTAACAGACTGTTCC 3' (SEQ ID NO: 59)

[00207] R5350 : 5' TCTAGATGGCACACCAATCTGCTAAGTTTGATGCAGCA

[00208] TAGATCAGGAGCTTAGGAGC 3' (SEQ ID NO: 60)

[00209] R5349 : 5' GCAGATGGTGTGCCATCTAGATTGAGTGGCAGTGGATC

[00210] AGGCACAGACTTTACCCTAAC 3' (SEQ ID NO: 61)

[00211] R684 : 5' TTCAACTGCTCATCAGAT 3' (SEQ ID NO: 62)

[00212] Duas reações, 20 µl cada, foram ajustadas, cada uma contendo

Tris 10 mM-HCl pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina 0,01% p/v, 0,25 mM cada de trifosfato de desoxirribonucleosídeo, 0,1 µg de hTNF40-gL1, 6 pmoles de R1053/R5350 ou R5349/R684 e 0,25 unidades de Taq polimerase. As reações foram ciclizadas sem interrupção a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após 30 ciclos, cada reação foi analisada por eletroforese em um gel de agarose e o fragmento de PCR foi excisado do gel e recuperado usando-se um Kit

Mermaid.

[00213] Alíquotas destes foram então submetidas a uma segunda rodada de PCR. A reação, 100 µl, continha Tris 10 mM-HCl pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, 0,01% de gelatina p/v, 1/5 de cada um dos fragmentos de PCR do primeiro conjunto de reações, 30 pmoles de R1053 e R684 e 2,5 unidades de Taq polimerase. As temperaturas de reação foram como acima. Após a PCR, a mistura foi extraída com fenol/clorofórmio e, depois, com clorofórmio, e precipitada com etanol. O precipitado de etanol foi recuperado por centrifugação, dissolvido no tampão apropriado e restringido com as enzimas BstEII e SplI. O produto resultante finalmente foi submetido a eletroforese sobre um gel de agarose e o fragmento de DNA de 270 pares de base foi recuperado de uma fatia de gel e ligado no vetor pMR15.1 (Figura 4), que havia sido previamente digerido com as mesmas enzimas.

[00214] A mistura de ligação foi usada para transformar LM1035 de E. coli e as colônias resultantes foram analisadas por PCR, as digestões da enzima de restrição e a sequenciação de nucleotídeos. A sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da região V1 de hTNF40-g1L2 é mostrada na Figura 9 (SEQ ID NO: 9).

[00215] Enxerto de CDR de cadeia pesada de hTNF40

[00216] A enxerto de cadeia pesada de hTNF40 foi realizada usando-se a mesma estratégia descrita para a cadeia leve. A cadeia pesada de hTNF40 foi observada ser a mais homóloga para as cadeias pesadas humanas pertencentes ao subgrupo 1 e, portanto, a sequência de consenso das estruturas do subgrupo 1 humano foi escolhida para aceitar os CDRs de cadeia pesada de hTNF40.

[00217] Para examinar a exigência da estrutura humana homóloga para atuar como uma estrutura aceptora para enxerto de CDR, uma segunda estrutura, o grupo 3 humano, foi selecionada para humanizar a cadeia pesada de hTNF40.

[00218] Uma comparação de hTNF com a região das duas estruturas diferentes é apresentada na Figura 2, onde pode ser observado que hTNF40 difere do consenso do subgrupo 1 humano nas 32 posições (sublinhadas) e difere do consenso do subgrupo 3 humano nas 40 posições (sublinhadas). Após a análise da contribuição que qualquer um destes pode fazer à ligação do antígeno, os resíduos 28, 38, 46,

67, 69 e 71 foram retidos como doadores na cadeia pesada enxertada de CDR, gh3hTNF40.4, usando a estrutura do grupo 3. Os resíduos 28, 69 e 71 foram retidos como doadores na cadeia pesada enxertada de CDR, gh1hTNF40.4, usando a estrutura do grupo 1.

[00219] Construção de gh1hTNF40.4 de cadeia pesada enxertada de CDR

[00220] gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO: 10) foi montada submetendo-se os oligonucleotídeos de sobreposição a PCR na presença dos iniciadores apropriados. Os seguintes oligonucleotídeos foram usados na PCR:

[00221] Enxerto do Grupo 1

[00222] oligo 1 P7989:

[00223] 5' GAAGCACCAGGCTTCTTAACCTCTGCTCCTGACTGGACCAGCT

[00224] GCACCTGAGAGTGCACGAATTC 3' (SEQ ID NO: 63)

[00225] oligo 2 P7990:

[00226] 5' GGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCAAAGTTTCGTGTAAGGCC

[00227] TCAGGCTACGTGTTTACAGACTATGGTA 3' (SEQ ID NO: 64)

[00228] oligo 3 P7991:

[00229] 5' CCAACCCATCCATTTTCAAGGCCTTGTCCCGGGGCCTGCTTGACC

[00230] CAATTCATACCATAGTCTGTGAACACGT 3' (SEQ ID NO: 65)

[00231] oligo 4 P7995:

[00232] 5' GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGC

[00233] CTATTTATGTTGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC 3' (SEQ ID NO: 66)

[00234] oligo 5 P7992:

[00235] 5' CCATGTATGCAGTGCGTTGTGGAGGTGTCTAGAGTGAACGTGA

[00236] ATCTGCCCTTGAA 3' (SEQ ID NO: 67)

[00237] oligo 6 P7993:

[00238] 5' CCACAAGCACTGCATACATGGAGCTGTCATCTCTGAGATCCGA

[00239] GGACACCGCAGTGTACTAT 3' (SEQ ID NO: 68)

[00240] oligo 7 P7994:

[00241] 5' GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTG

[00242] TATCCTCTAGCACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC 3' (SEQ ID NO: 69)

[00243] Fwd: P7988:

[00244] 5' GAATTCGTGCACTCTCAGGTGCAGCTGGTC 3' (SEQ ID NO: 70)

[00245] Bwd P7987:

[00246] 5' GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT 3' (SEQ ID NO: 71)

[00247] A reação da montagem, 100 µl, continha Tris 10 mM-HCl pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, 0,01% p/v de gelatina, 0,25 mM cada de trifosfato de desoxirribonucleosídeo, 2 pmoles de cada de p7989, p7990, p7991, p7995, p7992, p7993 e p7994, 10 pmoles de cada de p7988 e p7987 e 1 unidade de Taq polimerase. As reações foram ciclizadas sem interrupção a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após 30 ciclos, a reação foi extraída com fenol/clorofórmio (1/1), depois com clorofórmio e precipitada com etanol. Após a centrifugação, o DNA foi dissolvido no tampão de restrição apropriado e digerido com ApaI e KpnI. O fragmento resultante foi isolado de um gel de agarose e ligado em pMR14 (Figura 5) que havia sido previamente digerido com as mesmas enzimas. pMR14 contém a região constante de cadeia pesada gama 4 humana quando pMR14 é clivado com ApaI e KpnI, o vetor clivado é capaz de receber o DNA digerido de tal modo que a extremidade 3' do DNA digerido se una na matriz de leitura à extremidade 5' da sequência que codifica a região constante gama 4. Portanto, a cadeia pesada expressa deste vetor será um isótopo de gama 4. A mistura de ligação foi usada para transformar LM1035 de E. coli e as colônias bacterianas resultantes foram examinadas por digestão de restrição e análise da sequência de nucleotídeos. Desta maneira, um plasmídeo foi identificado contendo a sequência correta para gh1hTNF40.4 (Figura 10) (SEQ ID NO: 10).

[00248] Construção de gh3hTNF40.4 de cadeia pesada enxertada por CDR

[00249] gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11) foi montado submetendo-se os oligonucleotídeos de sobreposição a PCR na presença dos iniciadores apropriados. Os seguintes oligonucleotídeos foram usados na PCR:

[00250] Enxerto do grupo 3

[00251] oligo 1 P7999:

- [00252] 5' GATCCGCCAGGCTGCACGAGACCGCCTCCTGACTCGACCAGCT
 [00253] GAACCTCAGAGTGCACGAATTC 3' (SEQ ID NO: 72)
 [00254] oligo 2 P8000:
 [00255] 5' TCTCGTGCAGCCTGGCGGATCGCTGAGATTGTCCTGTGCTGCA
 [00256] TCTGGTTACGTCTTCACAGACTATGGAA 3' (SEQ ID NO: 73)
 [00257] oligo 3 P8001:
 [00258] 5' CCAACCCATCCATTTTCAGGCCCTTTCCCGGGGCCTGCTTAACC
 [00259] CAATTCATTCCATAGTCTGTGAAGACGT 3' (SEQ ID NO: 74)
 [00260] oligo 4 P7995:
 [00261] 5' GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGC
 [00262] CTATTTATGTTGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC 3' (SEQ ID NO: 66)
 [00263] oligo 5 P7997:
 [00264] 5' GGAGGTATGCTGTTGACTTGGATGTGTCTAGAGAGAACGTGA
 [00265] ATCTGCCCTTGAA 3' (SEQ ID NO: 75)
 [00266] oligo 6 P7998:
 [00267] 5' CCAAGTCAACAGCATACCTCCAAATGAATAGCCTGAGAGCAG
 [00268] AGGACACCGCAGTGTACTAT 3' (SEQ ID NO: 76)
 [00269] oligo 7 P7993:
 [00270] 5' GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTG
 [00271] TATCCTCTAGCACAATAGTACACTGCGGTGTCCTC 3' (SEQ ID NO: 77)
 [00272] Fwd P7996:
 [00273] 5' GAATTCGTGCACTCTGAGGTTTCAGCTGGTC 3' (SEQ ID NO: 78)
 [00274] Bwd P7987:
 [00275] 5' GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT 3' (SEQ ID NO: 71)
 [00276] A reação da montagem, 100 µl, continha Tris 10 mM-HCl pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, 0,01% p/v de gelatina, 0,25 mM cada de trifosfato de desoxirribonucleosídeo, 2 pmoles de cada de p7999, p8000, p8001, p7995, p7997, p7998 e p7993, 10 pmoles de cada de p7996 e p7987 e 1 unidade de Taq

polimerase. As reações foram ciclizadas sem interrupção a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. Após 30 ciclos, a reação foi extraída com fenol/clorofórmio (1/1), depois com clorofórmio e precipitada com etanol. Após a centrifugação, o DNA foi dissolvido no tampão de restrição apropriado e digerido com ApaI e KpnI. O fragmento resultante foi isolado de um gel de agarose e ligado em pMR14 (Figura 5) que havia sido previamente digerido com as mesmas enzimas. pMR14 continha a região constante de cadeia pesada gama 4 humana. Quando pMR14 é clivado com ApaI e KpnI, o vetor clivado é capaz de receber o DNA digerido de tal modo que a extremidade 3' do DNA digerido se une na matriz de leitura à extremidade 5' da sequência que codifica a região constante gama 4. Portanto, a cadeia pesada expressa deste vetor será um isótopo de gama 4. A mistura de ligação foi usada para transformar LM1035 de E. coli e as colônias bacterianas resultantes foram examinadas por digestão de restrição e análise da sequência de nucleotídeos. Desta maneira, um plasmídeo foi identificado contendo a sequência correta para gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11) (Figura 11).

[00277] Produção de fragmento Fab modificado enxertado por CDR

[00278] Um fragmento Fab modificado enxertado por CDR, com base no anticorpo hTNF40, foi construído usando-se o vetor pTTO-1 de E. coli. As regiões variáveis do anticorpo hTNF40 são subclonadas neste vetor e a sequência intergênica foi otimizada para criar pTTO(CDP870). O vetor de expressão pTTO tem em mira dar origem ao acúmulo periplásmico solúvel de proteínas recombinantes em E. coli. Os principais aspectos deste plasmídeo são:

(i) marcador de resistência à tetraciclina – antibiótico não inativado pelo produto do gene de resistência, daí a seleção quanto às células contendo plasmídeos ser mantida;

(ii) número de cópias baixo – origem de replicação derivada do plasmídeo p15A, que é compatível com os plasmídeos que contêm os replicons derivados de colE1;

(iii) promotor de tac indutível forte para transcrição do(s) gene(s) clonado(s);

- (iv) gene $lacI^q$ – dá expressão constitutiva da proteína repressora lac mantendo o promotor tac no estado reprimido até a indução com IPTG/alolactose;
- (v) sequência de sinal OmpA – dá secreção periplásmica do(s) gene(s) clonado(s); e
- (vi) acoplamento translacional da sequência de sinal OmpA a um peptídeo lacZ curto, dando iniciação eficiente da tradução.

[00279] O vetor foi desenvolvido para expressão dos fragmentos Fab modificados de uma mensagem dicistrônica pela delineação de um processo para selecionar empiricamente a sequência intergênica ótima de uma série de quatro cassetes especialmente construídos. A aplicação disto na construção de pTTO(CDP870) é descrita.

[00280] MATERIAIS E MÉTODOS

[00281] TÉCNICAS DE DNA

[00282] Procedimentos padrão foram usados quanto aos protocolos que incluíam a restrição de DNA, a eletroforese em gel de agarose, a ligação e a transformação. As enzimas de restrição e as enzimas modificadoras do DNA foram obtidas da New England Biolabs ou Boehringer Mannheim, e foram usadas de acordo com as recomendações do fornecedor. Os fragmentos de DNA foram purificados da agarose usando-se o protocolo GeneClean (BIO 101). Os oligonucleotídeos foram fornecidos por Oswel Oligonucleotide Service e foram sintetizados na escala de 40 nm. O DNA plasmídeo foi isolado usando-se os kits Plasmid DNA Mini/Midi da Qiagen. A PCR foi realizada usando-se 'Amplitaq' da Perkin Elmer, como recomendado. A seqüenciação de DNA foi realizada usando-se o kit de seqüenciação de ciclo Taq da Applied Biosystems.

[00283] INDUÇÃO DO FRASCO DE VIBRAÇÃO

[00284] As culturas W3110 de *E. coli* foram realizadas em caldo L suplementado com tetraciclina (7,5 μ g/ml). Para as induções, culturas noturnas recentes (cultivadas a 30 °C) foram diluídas a OD₆₀₀ de 0,1 em 200 ml de caldo L em um frasco abafado de 2 litros e foram cultivadas a 30 °C em uma incubadora orbital. Em OD₆₀₀ de 0,5, IPTG foi adicionado a 200 μ M. Tomaram-se amostras (normalizadas

para OD) em intervalos.

[00285] EXTRAÇÃO PERIPLÁSMICA

[00286] Amostras de cultura foram esfriadas sobre gelo (5 minutos), depois as células foram colhidas por centrifugação. Em seguida à recolocação em suspensão em tampão de extração (Tris 100 mM-HCl, EDTA 10 mM, pH 7,4), as amostras foram incubadas durante a noite a 30 °C, depois purificadas por centrifugação.

[00287] ENSAIO DE MONTAGEM

[00288] As concentrações de Fab modificadas foram determinadas por ELISA. As placas foram revestidas em 4 °C durante a noite com Fd 6045 anti-humano (2 µg/ml em tampão de revestimento, solução salina fisiológica, 100 µl por reservatório). Após a lavagem, 100 µl de amostra foram carregadas por reservatório; Fab' gama-1 A5B7 purificado, inicialmente em 2 µg/ml, foi usado como um padrão. As amostras foram diluídas em série 2 vezes através da placa em tampão conjugado de amostra. [por litro: 6,05 g de trisaminometano; 2,92 g de NaCl; 0,1 ml de Tween-20; 1 ml de caseína (0,2%)]; as placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente, com agitação. As placas foram lavadas e secadas, depois 100 µl de (GD12)-peroxidase C-capa anti-humana foram adicionados (diluídos em tampão conjugado de amostra). A incubação foi realizada em temperatura ambiente por 1 hora com agitação. As placas foram usadas e secadas, depois 100 µl de solução de substrato foram adicionados [10 ml de acetato de sódio/solução de citrato (0,1 M, pH 6); 100 µl de solução de H₂O₂; 100 µl de solução de tetrametilbenzidina (10 mg/ml em dimetilsulfóxido)]. A absorbância em 630 nm foi lida 4 a 6 minutos após a adição do substrato.

[00289] CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pTTO-1

[00290] a) Substituição do poliligador pTTO9

[00291] O plasmídeo pTTQ9 foi obtido da Amersham e é mostrado na Figura 14. Uma alíquota (2 µg) foi digerida com as enzimas de restrição Sall e EcoRI, a digestão foi desenvolvida em 1% de gel de agarose e o fragmento de DNA grande

(4520 pares de base) foi purificado. Dois oligonucleotídeos foram sintetizados, os quais, quando recozidos juntos, codificam a região poliligadora OmpA mostrada na Figura 15. Esta sequência tem extremidades coesivas que são compatíveis com as extremidades Sall e EcoRI geradas por restrição de pTTQ9. Pela clonagem deste 'cassete' de oligonucleotídeo no vetor pTTQ9, o sítio Sall não é regenerado, porém o sítio EcoRI é mantido. O cassete codifica os primeiros 13 aminoácidos da sequência de sinal da proteína Omp-A da proteína da membrana externa de *E. coli*, precedida pelo sítio de ligação ribossômica de Shine Dalgarno do gene OmpA. Além disso, os sítios de restrição para as enzimas XbaI, MunI, StyI e SphI estão presentes. Os sítios MunI e StyI estão dentro da região codificadora da sequência de sinal de OmpA e são planejados como os sítios de clonagem 5' para inserção de genes. Os dois oligonucleotídeos que compõem este cassete foram recozidos juntos pela mistura em uma concentração de 5 pmoles/ μ l e aquecimento em um banho de água a 95°C por 3 minutos, depois esfriamento lento até temperatura ambiente. A sequência recozida foi então ligada no corte pTTQ9 de Sall/EcoRI. O intermediário de plasmídeo resultante, denominado pTQOmp, foi verificado por seqüenciação de DNA.

[00292] (b) Preparação e ligação de fragmentos

[00293] O plasmídeo pTTO-1 foi construído pela ligação de um fragmento de DNA do plasmídeo pACYC184, a dois fragmentos gerados de pTQOmp. O plasmídeo pACYC184 foi obtido da New England Biolabs, e um mapa de restrição é apresentado na Figura 16. Uma alíquota (2 μ g) foi digerida até a conclusão com a enzima de restrição StyI, depois tratada com Mung Bean Nuclease; este tratamento cria extremidades embotadas pelo corte das saliências de base traseira 5'. Em seguida à extração de fenol e a precipitação de etanol, o DNA foi restringido com a enzima PvuII, gerando fragmentos de 2348, 1081, 412 e 403 pares de base. O fragmento de 2348 pares de base foi purificado após a eletroforese em gel de agarose. Este fragmento codifica o marcador de resistência de tetraciclina e a origem de replicação p15A. O fragmento foi então tratado com fosfatase alcalina intestinal de bezerro para remover as fosfatases de terminal 5', dessa forma

impedindo a auto-ligação desta molécula.

[00294] Uma alíquota (2 µg) do plasmídeo pTQOmp foi digerida com as enzimas Sspl e EcoRI, e o fragmento de 2350 pares de base foi purificado dos fragmentos indesejáveis de 2040 pares de base e de 170 pares de base, em seguida à eletroforese em gel de agarose; este fragmento codifica a região terminadora transcricional e o gene *lacI^q*. Outra alíquota (2 µg) de pTQOmp foi digerida com EcoRI e XmnI, gerando os fragmentos de 2289, 1670, 350 e 250 pares de base. O fragmento de 350 pares de base, codificando o promotor *tac*, a sequência de sinal *OmpA* e o sítio de multiclonagem, foi purificado em gel.

[00295] Os três fragmentos foram então ligados, usando-se quantidades aproximadamente equimolares de cada fragmento, para gerar o plasmídeo pTTO-1. Todas as junções de clonagem foram verificadas por seqüenciação de DNA. O mapa de restrição deste plasmídeo é mostrado na Figura 17. O plasmídeo pTTO-2 foi então criado por inserção de DNA codificando o domínio constante capa de cadeia leve Ig humano. Isto foi obtido como um fragmento de restrição de SphI – EcoRI do plasmídeo pHc132, e inserido nos sítios correspondentes em pTTO-1. O plasmídeo pTTO-2 é mostrado na Figura 18.

[00296] Inserção Das Regiões Variáveis De Htnf40 Humanizado Em Ptto-2

[00297] A região hTNF40gL1 de cadeia leve variável (SEQ ID NO: 8) foi obtida por “resgate” de PCR do vetor correspondente para expressão celular de mamífero pMR10.1. A sequência condutora *OmpA* substitui a condutora Ig nativa. A sequência dos iniciadores da PCR é apresentada abaixo:

[00298] Iniciador 5':

[00299] CGCGCGGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGC

[00300] AAGCTGACATTCAAATGACCCAGAGCCC (SEQ ID NO: 79)

[00301] Iniciador 3': TTCAACTGCTCATCAGATGG (SEQ ID NO: 80)

[00302] Em seguida à PCR sob condições padrão, o produto foi purificado, digerido com as enzimas MunI e SphI, depois purificado em gel. O fragmento purificado foi então inserido nos sítios MunI / SphI de pTTO-2 para criar o intermediário de cadeia leve pTTO(hTNF40L).

[00303] A região de cadeia pesada variável de gh3hTNF40.4 foi obtida da mesma maneira do vetor pGamma-4. A sequência dos iniciadores de PCR é apresentada abaixo:

[00304] Iniciador 5':

[00305] GCTATCGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGC

[00306] AAGCTGAGGTTCAGCTGGTTCGAGTCAGGAGGC (SEQ ID NO: 81)

[00307] Iniciador 3': GCCTGAGTTCCACGACAC (SEQ ID NO: 82)

[00308] Em seguida à PCR, o produto foi purificado, digerido com as enzimas NheI e ApaI, depois subclonado no vetor pDNAEng-G1 (Figura 19). Após a verificação por seqüenciação de DNA, a cadeia pesada foi restringida com a enzima EcoRI e subclonada no sítio EcoRI de pTTO(hTNF40L) para criar o plasmídeo de expressão de pTTO(hTNF40) de E. coli.

[00309] OTIMIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA INTERGÊNICA PARA EXPRESSÃO DE Fab MODIFICADA

[00310] No vetor pTTO, a expressão de Fab modificada ocorre de uma mensagem dicistrônica codificando primeiro a cadeia leve, depois a cadeia pesada. A sequência de DNA entre os dois genes (sequência intergênica, IGS) pode influenciar o nível de expressão da cadeia pesada, afetando o índice de iniciação traducional. Por exemplo, uma sequência intergênica curta pode resultar em acoplagem traducional entre as cadeias leve e pesada, no fato de que o ribossoma de tradução pode não dissociar-se completamente do mRNA após completar a síntese da cadeia leve antes de iniciar a síntese da cadeia pesada. A 'intensidade' de qualquer sítio de ligação ribossômica de Shine Dalgarno (SD) (homologia a rRNA 16S) pode também ter um efeito, como o pode a distância e a composição da sequência entre o SD e o códon de início de ATG. A estrutura potencial secundária de mRNA ao redor da ATG é outro fator importante; a ATG deve estar em uma 'alça' e não constrangida dentro de um 'tronco', enquanto o inverso se aplica ao SD. Assim, pela modificação da composição e do comprimento do IGS, é possível modificar a intensidade da iniciação traducional e, portanto, o nível de produção da cadeia pesada. É provável que um índice ótimo de iniciação traducional necessita

ser obtido para maximizar a expressão da cadeia pesada de um dado Fab modificado. Por exemplo, com um Fab modificado, um nível elevado de expressão pode ser tolerado, mas por um Fab modificado diferente com diferente sequência de aminoácidos, um nível elevado de expressão pode evidenciar-se tóxico, talvez por causa de diferentes eficiências de secreção ou reduplicação. Por esta razão, uma série de quatro sequências intergênicas foi designada (Figura 20), permitindo a determinação empírica do IGS ótimo para o Fab modificado com base em hTNF40. IGS1 e IGS2 têm sequências intergênicas muito curtas (-1 e +1, respectivamente) e pode-se esperar darem tradução intimamente acopladas. As sequências de SD (sublinhadas) são sutilmente diferentes. Estas duas sequências mais provavelmente conferirão um alto nível de iniciação traducional. IGS3 e IGS4 têm uma distância mais longa entre os códons de partida e de parada (+13) e diferem na composição da sua sequência; IGS3 tem uma sequência de SD 'mais forte'. Todas as sequências foram estudadas quanto à estrutura secundária (usando o programa m/fold) e 'otimizadas' tanto quanto possível; no entanto, com acoplagem de tradução firme das duas cadeias, a falta de dissociação ribossômica significa que o mRNA não pode ser 'desnudado', impedindo a formação de estrutura secundária.

[00311] CLONAGEM DE VARIANTES DE IGS

[00312] Os cassetes de IGS mostrado na Figura 20 possuem sítios de clonagem de flanco SacI e MunI. Eles são construídos por anelamento dos pares de oligonucleotídeos complementares. Um fragmento de vetor foi preparado por digestão de pTTO(hTNF40) com SacI e NotI, e um fragmento de cadeia pesada foi preparado por digestão de pDNA_{hEngG1}(hTNF40H) com MunI e NotI. Ligações tripolares foram então realizadas, usando-se quantidades equimolares dos dois fragmentos de restrição e aproximadamente 0,05 pmol de cada cassete oligo recozido. Isto criou os quatro plasmídeos de expressão pTTO(hTNF40 IGS-1), pTTO(hTNF40 IGS-2), pTTO(hTNF40 IGS-3), pTTO(hTNF40 IGS-4).

[00313] ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM FRASCOS DE AGITAÇÃO

[00314] Os quatro plasmídeos foram transformados na cepa W3110 de *E. coli*, junto com a construção de expressão original, e então analisados quanto à

expressão em frascos de agitação conforme descrito. Os resultados de uma experiência típica são apresentados na Figura 21. As diferentes sequências intergênicas conferem perfis de expressão diferentes. IGS1 e IGS2 acumulam rapidamente Fab periplásmico modificado com um pico em 1 hora após a indução, depois do que o nível recuperado cai. O pico é maior e a queda mais pronunciada para IGS1. Estes resultados são consistentes com um nível de síntese elevado, como esperado para a acoplagem traducional íntima para estas construções. IGS1 aparentemente confere um nível mais elevado de expressão de cadeia pesada do que o IGS2. Neste caso, parece que este nível elevado de expressão é fracamente tolerado, uma vez que os níveis de expressão periplásmicos caem após o pico de 1 hora. Isto é observado no perfil de crescimento da cultura de IGS1 (não mostrada), que atinge o pico em 1 hora após a indução antes de cair, sugerindo a morte e a lise celular. IGS3 acumula Fab modificado mais lentamente, mas atinge o pico em 2 horas após a indução com um valor de pico mais elevado (325 ng/ml/OD), antes que os níveis caíam. O desenvolvimento desta cultura continuou até 3 horas após a indução e alcançou uma biomassa de pico mais elevada (não mostrada). Isto é consistente com um nível mais baixo de síntese de cadeia pesada. IGS4 acumula material em uma velocidade mais lenta tranqüila e falha em alcançar um pico elevado de produtividade das outras 3 construções. Todas as variantes de IGS produzem melhor o vetor original significativamente. A hipótese de que as diferentes sequências de IGS conferem diferentes índices de iniciação traducional é apoiada por estes resultados experimentais. Quanto ao Fab modificado com base em hTNF-40, parece que um alto índice de iniciação traducional de cadeia pesada é fracamente tolerado e não é, portanto, ótimo. Um índice menor, como conferido por IGS3, resulta em melhores características de crescimento e, conseqüentemente, uma melhor produção se acumula com o passar do tempo.

[00315] Em seguida à comparação da produtividade no fermentador, a construção de IGS3 foi selecionada como a produção mais elevada e foi denominada de pTTO(CDP870) – ver Figura 22.

[00316] A cadeia pesada codificada pelo plasmídeo pTTO(CDP870) tem a

sequência dada na SEQ ID NO: 115 e a cadeia leve tem a sequência dada na SEQ ID NO: 113.

[00317] Pegilação de Fab enxertado com CDR, modificado com base em hTNF40

[00318] O Fab modificado purificado é conjugado especificamente no sítio com uma molécula ramificada de PEG. Isto é obtido por ativação de um resíduo único de cisteína em uma região da dobradiça truncada do Fab modificado, seguido por reação com (PEG)-lisil-maleimida como descrito anteriormente (A. P. Chapman et al., Nature Biotechnology 17, 780-783, 1999). A molécula PEGilada é apresentada na Figura 13 e é denominada de composto CDP870.

[00319] Eficácia do Fab (CDP870) modificado com base em hTNF40, enxertado com CDR pegilado, no tratamento da artrite reumatóide

[00320] CDP870 tem uma meia-vida longa de aproximadamente 11 dias.

[00321] Avaliamos a segurança e eficácia do CDP870 intravenoso em uma experiência incremental dupla-cega randomizada de dose controlada por placebo em pacientes com artrite reumatóide.

[00322] MÉTODOS

[00323] Pacientes

[00324] Pacientes de idade entre 18 e 75 anos de idade e que satisfaziam aos critérios de diagnóstico revisado em 1987 do American College of Rheumatology (ACR) quanto à artrite reumatóide (RA) (Arnett et al., Arthritis Rheum., 31, 315-324, 1988), foram recrutados das clínicas de Reumatologia de pacientes externos, em Londres, Cambridge, Norfolk e Norwich (Reino Unido). Foram requeridos pacientes que tivessem a doença clinicamente ativa, definida pelo fato de atenderem pelo menos a 3 dos seguintes critérios: ≥ 6 juntas dolorosas ou sensíveis; ≥ 45 minutos de rigidez de manhã cedo; e velocidade de sedimentação dos eritrócitos (ESR) ≥ 28 mm/hora. Eles devem ter falhado em responder a pelo menos um Medicamento Anti-Reumático Modificador da Doença (DRARD) e terem estado fora de tratamento por pelo menos 4 semanas. Os corticosteróides eram permitidos caso a dose fosse $\geq 7,5$ mg/dia de prednisolona. Mulheres grávidas, mulheres no período de

amamentação e mulheres no período final de gestação em potencial, que não estivessem usando um processo eficaz de contracepção, foram excluídas. Os pacientes eram também excluídos se eles tivessem uma história anterior de condições médicas concomitantes de malignidade não controladas e graves, falha anterior de terapia neutralizadora de TNF α ou alergia a polietileno glicol. A concordância por escrito foi obtida de cada paciente antes do recrutamento. O estudo foi aprovado pelos comitês locais de ética de pesquisas.

[00325] Protocolo do tratamento

[00326] 36 pacientes de Artrite Reumatóide foram divididos em 3 grupos, cada um para receber uma dose crescente do medicamento da experiência (1, 5 ou 20 mg/kg). Cada grupo de 12 foi aleatoriamente dividido em 8 para receber CDP870 e 4 para receber placebo. CDP870 foi dado como uma infusão intravenosa única (100 ml no total) durante 60 minutos. Placebo (tampão de acetato de sódio) foi dado de forma semelhante como uma infusão intravenosa única de 100 ml durante 60 minutos. O tratamento foi feito em uma base de paciente externo (ambulatorial). Após 8 semanas, todos os pacientes tiveram a oportunidade de receber uma infusão ou de 5 ou de 20 mg/kg de CDP870 em forma aberta.

[00327] Avaliação clínica

[00328] A atividade da doença de Artrite Reumatóide foi avaliada com base nos conjuntos de dados núcleo da World Health Organization and International League of Associations for Rheumatology (Boers et al., J. Rheumatol. (Boers et al., J. Rheumatol. – Supplement, 41, 86-89, 1994) e da European League Against Rheumatism (EULAR) (Scott et al., Clin. Exp. Rheumatol., 10, 521-525, 1992) com os resultados de 28 juntas. As mudanças na atividade da doença foram avaliadas por Contagem da Atividade da Doença (Prevoo et al., Arthritis Rheum., 38, 44-48, 1995) e pelos critérios de respostas da ACR (Felson et al., Arthritis Rheum., 38, 727-735, 1995). As avaliações foram realizadas antes do tratamento e em 1, 2, 4, 6 e 8 semanas após a terapia. Os pacientes também foram avaliados quanto à segurança e tolerância do medicamento de estudo. A hematologia, a bioquímica, os anticorpos anti-CDP870 e eventos adversos foram avaliados em cada visita.

[00329] Concentração plasmática de CDP870 e anticorpos anti-CDP870

[00330] CDP870 foi medido pelo ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). As diluições seriadas dos plasmas dos pacientes foram incubadas em placas de microtitulação (Nunc) revestidas com TNF α humano recombinante (Strathmann Biotech GmbH, Hannover). O CDP870 capturado foi revelado com cadeia leve capa anti-humana de cabra conjugada com peroxidase de raiz forte (Cappel, ICN), seguida por substrato de tetrametilbenzidina (TMB).

[00331] Os anticorpos a CDP870 foi examinado (em diluição plasmática a 1/10) usando-se um ELISA de sanduíche de antígeno duplo com CDP870 biotinilado como a segunda camada. Os anticorpos ligados foram revelados usando-se HRP-estreptavidina e substrato de TMB. O ensaio foi calibrado usando-se um padrão de IgG de coelho hiper-imune. Uma unidade de atividade é equivalente a 1 μ g do padrão de coelho.

[00332] Análise Estatística

[00333] O estudo foi exploratório por natureza e o tamanho da amostra baseou-se na experiência anterior com agentes semelhantes. A eficácia do CDP870 foi analisada pelo cálculo da contagem da atividade da doença (DAS) e das respostas de ACR20/50 quanto à intenção de tratar e o per-protocolo usando-se um procedimento de testes fechado. A contagem da atividade da doença foi calculada como segue: $DAS = 0,555 \times \text{raiz quadrada de (28 juntas sensíveis)} + 0,284 \times \text{raiz quadrada de (28 juntas inchadas)} + 0,7 \times \ln(\text{ESR}) + 0,0142 \times (\text{avaliação global do paciente})$. Em primeiro lugar, os grupos ativos reunidos foram comparados com o placebo. Se esta comparação fosse significativa no nível de 5%, cada grupo de dosagem era comparado com o placebo. Todas as comparações foram de duas caudas com um nível de significância de 5%. Todos os valores P foram derivados da análise exploratória e não devem ser usados para interpretação conclusiva.

[00334] RESULTADOS

[00335] Demografia:

[00336] 36 pacientes com RA foram recrutados. Seus detalhes demográficos são dados na Tabela 6. A idade média foi de 56 anos, e 30 pacientes eram do sexo

feminino. A duração média da RA foi de 13 anos, e 21 pacientes tinham fator reumatóide positivo. Os pacientes nos diferentes grupos tinham características demográficas semelhantes. No período de dosagem cega, 6/12 pacientes tratados com placebo retiraram-se do estudo por RA deformante ≥ 4 semanas após a dosagem. 2/24 pacientes tratados com CDP870 retiraram-se, tanto no grupo de 1 mg/kg quanto por RA deformante/privado de seguir > 4 semanas após a dosagem. A diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,009$, teste exato de Fisher).

[00337] TABELA 6: Detalhes demográficos (desvio médio $\pm$ padrão)

	Número	Sexo (M:F)	Idade	Duração da doença	Fator reumatóid e	Número de DMARDs prévios
Placebo	12	1,11	51 $\pm$ 8	12 $\pm$ 8	8 (67%)	5 $\pm$ 1
1 mg/kg	8	1:7	59 $\pm$ 7	12 $\pm$ 7	4 (50%)	4 $\pm$ 2
5 mg	8	2:6	54 $\pm$	13 $\pm$ 5	5 (63%)	5 $\pm$ 2
g/kg	8	2,6	13	14 $\pm$ 13	4 (50%)	4 $\pm$ 2
20			61 $\pm$			
mg/kg			11			

[00338] Eficácia Clínica

[00339] A proporção de pacientes com melhoramento de ACR20 para a população do per-protocolo com a última observação transportada foi de 16,7, 50, 87,5 e 62,5% após o placebo, 1, 5 e 20 mg/kg de CDP870 (efeito de tratamento combinado $p = 0,012$) em 4 semanas e 16,7, 25, 75 e 75% ($p = 0,032$) em 8 semanas. A redução em contagens de DAS (mediana) para a população do per-protocolo com a última observação transportada foi de 0,15, 1,14, 1,91 e 1,95 após o placebo, 1, 5 e 20 mg/kg de CDP870 (efeito de tratamento combinado $p = 0,001$) em 4 semanas e 0,31, 0,09, 2,09 e 1,76 ($p = 0,008$) em 8 semanas (Figura 23). As mudanças nos componentes individuais do conjunto de dados núcleo da

Organização Mundial de Saúde e da Liga Internacional de Associações para a Reumatologia é mostrado na Figura 24.

[00340] Em seguida à dose aberta do rótulo de CDP870, efeitos benéficos semelhantes foram obtidos. Dos 36 pacientes recrutados para o estudo, 32 receberam uma segunda infusão de CDP870. A proporção de pacientes com melhora do ACR20 a partir da pré-primeira infusão foi de 72,2 e 55,6% após 5 e 20 mg/kg de CDP870 em 4 semanas e de 55,6 e 66,7% em 8 semanas.

[00341] Eventos Adversos

[00342] O tratamento foi bem tolerado sem qualquer reação relacionada à infusão. Nenhuma reação alérgica ou erupção cutânea foi relatada. Na fase dupla cega, houve 19, 38, 8 e 14 eventos adversos no placebo, grupos de 1, 5 e 20 mg/kg, respectivamente. O mais comum foi a dor de cabeça com 9 episódios em 5 pacientes (1 placebo, 3 em 1 mg/kg, 1 em 20 mg/kg). Um paciente que recebera placebo e 3 pacientes que receberam CDP870 (1 em 5 mg/kg e 2 em 20 mg/kg) desenvolveram infecções do trato respiratório inferior. Estas foram relatadas como brandas ou moderadas. Eles foram tratados com antibióticos orais e resolveram durante um período de 1 a 2 semanas. Três pacientes em cada dos grupos de 1 e 5 mg/kg e um no grupo de 20 mg/kg, desenvolveram uma infecção do trato urinário 1 a 2 meses após o tratamento com CDP870. Um evento adverso foi descrito como grave, o qual era um episódio de dor de pescoço que ocorrera 3 dias após a infusão com 1 mg/kg. O aumento no anticorpo anti-nuclear foi observado em 4 pacientes: 1 no grupo do placebo (negativo a 1/40), 2 no grupo de 1 mg/kg (negativo a 1/40, negativo a 1/80) e 1 no grupo de 20 mg/kg (negativo a 1/40). Nenhuma mudança foi observada nos anticorpos anti-DNA ou anti-cardiolipina.

[00343] Concentração Plasmática de CDP870 e níveis de Anti-CDP870

[00344] Como esperado, para todos os níveis de dose de CDP870, a concentração plasmática de pico ocorreu no final da infusão e foi proporcional à dose com a concentração plasmática declinando lentamente depois disso. O perfil da concentração plasmática de CDP870 pareceu muito semelhante àquele anteriormente observado em voluntários em que a meia-vida havia sido calculada

como sendo de aproximadamente 14 dias. Na re-dosagem, um perfil semelhante à infusão de dose única foi observado.

[00345] Em seguida a uma infusão intravenosa única, os níveis de anti-CDP870 foram baixos ou não detectáveis.

[00346] DISCUSSÃO

[00347] O TNF α neutralizador é uma estratégia de tratamento na RA eficaz. Presentemente, esta requer o uso de agentes biológico, tais como um mAb quimérico ou uma proteína de fusão Fc receptora/humana solúvel, que são de fabricação cara. Um agente neutralizador terapêutico de TNF α necessita ligar o TNF α com alta afinidade e ter uma longa meia-vida plasmática, baixa antigenicidade e alta tolerabilidade e segurança. Também necessita ser acessível a todos os pacientes com RA que devem beneficiar-se do bloqueio de TNF α . Uma tecnologia que pode alcançar estes objetivos é a combinação com polietileno glicol de um fragmento de anticorpo de ligação de TNF α produzido em *E. coli*. Neste estudo preliminar, observamos que CDP870, um Fab modificado, PEGilado, anti-TNF α , é eficaz e bem tolerado por pacientes com RA.

[00348] Estudos *in vitro* têm mostrado que CDP870 tem atividade neutralizadora de TNF α para o anticorpo precursor anti-TNF α de murinos. Este estudo confirma que CDP870 reduziu a inflamação e melhorou os sintomas na RA. A melhora clínica medida pelos critérios de resposta de ACR20 nos grupos de 5 e 20 mg/kg (75%, 75%) foi comparável com etanercept (60%) (Moreland et al., *Annals Int. Méd.*, 130, 478-486, 1999) e infliximab (50%) (Maini et al., *Lancet*, 344, 1105-1110, 1994, e Rankin et al., *Br. J. Rheumatol.*, 34, 334-342, 1995). Estudos anteriores mostraram que o efeito terapêutico do anticorpo anti-TNF α está relacionado à sua meia-vida plasmática e à geração de anticorpos circulantes [Maini et al., *Arthritis Rheum.* 38. (Suplemento): S186 1995 (Resumo)]. Nosso estudo mostrou que CDP870 tem uma meia-vida plasmática de 14 dias, a qual é equivalente àquela de um anticorpo completo [Rankin et al. (supra)] e muito mais longa do que a meia-vida de

fragmentos Fab' não conjugados. Além disso, CDP870 gerou apenas muitos poucos níveis de resposta de anticorpos.

[00349] Um dos importantes objetivos deste estudo é examinar a tolerabilidade e segurança de administrar este Fab' PEGilado. Em nosso estudo, CDP870 parece bem tolerado. Não obstante outro estudo seja necessário para avaliar a toxicidade de longo prazo, especialmente o risco de doença demielinizante, a infecção e erupções cutâneas que tenham sido relatadas com etanercept e infliximab.

[00350] Em resumo, CDP870 é terapeuticamente eficaz na RA e foi bem tolerado neste estudo de curto prazo.

[00351] Deve ficar entendido que os exemplos acima descritos são meramente exemplos e não limitam o escopo da presente invenção, como definido nas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de anticorpo, caracterizada pelo fato de ter especificidade para TNF α humano, compreendendo a região variável de cadeia leve dada na SEQ ID NO: 8 (hTNF40-gL1) e a região variável de cadeia pesada dada na SEQ ID NO: 11 (gh3hTNF40.4).

2. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende uma cadeia leve consistindo na sequência dada na SEQ ID NO: 113 e consistindo na cadeia pesada tendo a sequência dada na SEQ ID NO: 115.

3. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um domínio constante humano.

4. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o domínio constante humano é IgG.

5. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o domínio constante humano é IgG₂ ou IgG₄.

6. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que é um fragmento Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂ ou Fv, um anticorpo de cadeia única ou um fragmento Fv de cadeia única.

7. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que é um fragmento Fab modificado tendo na extremidade C-terminal de sua cadeia pesada um ou mais aminoácidos para permitir a ligação de uma molécula efetora ou repórter.

8. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que os aminoácidos adicionais formam uma região da dobradiça modificada contendo um ou dois resíduos de cisteína a que a molécula efetora ou repórter pode ser ligada.

9. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que tem covalentemente ligado a um grupo tiol único, um grupo maleimida, em uma região da dobradiça modificada.

10. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que tem covalentemente ligado uma lisina a um grupo maleimida.

11. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que tem um polímero tendo um peso molecular médio de 500 a 50000 Da ligado a cada um dos grupos amina da lisina.

12. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que tem um polímero metoxipoli(etilenoglicol) tendo um peso molecular médio de 20,000 Da ligado a cada um dos grupos amina da lisina.

13. Composto, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de anticorpo como definida na reivindicação 7, tendo covalentemente ligado a um aminoácido na ou em direção à extremidade C-terminal de sua cadeia pesada, uma molécula efetora ou repórter.

14. Composto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula efetora.

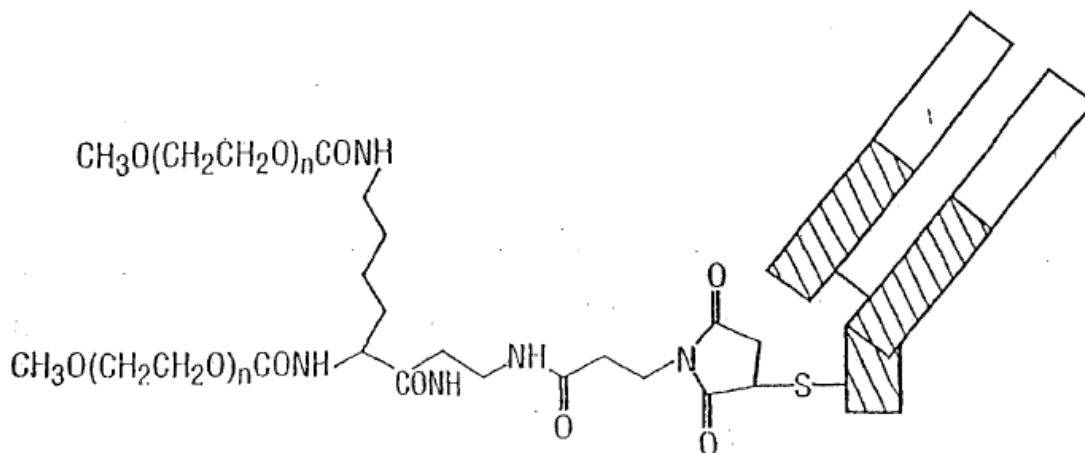
15. Composto de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a molécula efetora compreende um ou mais polímeros.

16. Composto de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que um ou mais polímeros são um polímero de polialquileno, polialquenileno ou polioxialquileno de cadeia reta ou ramificada opcionalmente substituídos, ou um polissacarídeo ramificado ou não ramificado.

17. Composto de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o um ou mais polímeros é/são um metoxipoli(etilenoglicol).

18. Composto de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que tem ligado a um dos resíduos de cisteína na extremidade C-terminal da cadeia pesada, um grupo de lisil-maleimida, em que cada grupo amino do resíduo de lisil tem covalentemente a ele ligado um resíduo de metoxipoli(etilenoglicol) tendo um peso molecular de 20000 Da.

19. Composto de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula:



em que n é 420.

20. DNA, caracterizado pela sequência dada na SEQ ID NO: 8, 11, 112 ou 114.

21. Vetor de clonagem ou de expressão, caracterizado pelo fato de conter a sequência de DNA como definida na reivindicação 20.

22. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que é vetor de expressão de *E. coli*.

23. Célula hospedeira de *E. coli*, caracterizada pelo fato de ser transformada com o vetor como definido em qualquer uma das reivindicações 21 ou 22.

24. Processo para a produção da molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de compreender cultivar a célula hospedeira de acordo como definida na reivindicação 23, e isolar a molécula de anticorpo.

25. Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a molécula de anticorpo é alvejada ao periplasma.

26. Composição terapêutica ou diagnóstica, caracterizada pelo fato de compreender a molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

27. Composição terapêutica ou diagnóstica, caracterizada pelo fato de compreender o composto como definido em qualquer uma das reivindicações 13 a 19.

28. Uso da molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença inflamatória ou autoimune.

29. Uso do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 13 a 19, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença inflamatória ou autoimune.

30. Uso de acordo com a reivindicação 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que a patologia é artrite reumatoide ou doença de Crohn.

My

FIG. 1

Comparações das regiões de estrutura de cadeia leve do anticorpo
hTNF40 e as seqüências de consenso do grupo 1 humano

Consenso grupo 1 humano : DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 83)
hTNF40 : DIVMTQSOKFMSTSVGDRVSVTC (SEQ ID NO: 84)

Consenso grupo 1 humano : WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 85)
hTNF40 : WYQQKPGOSPKALIY (SEQ ID NO: 86)

Consenso grupo 1 humano : GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 87)
hTNF40 : GVPYRFTGSGSGTDFTLTISTVQSEDLAEYFC (SEQ ID NO: 88)

Consenso grupo 1 humano : FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 89)
hTNF40 : FGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 90)

FIG. 3 Seqüência de CDRs de hTNF40

H1 DYGMN (SEQ ID NO:1)

H2 WINTYIGEPIYVDDFKG (SEQ ID NO:7)

H2' WINTYIGEPIYADSVKG (SEQ ID NO:2)

H3 GYRSYAMDY (SEQ ID NO:3)

L1 KASQNVGTNVA (SEQ ID NO:4)

L2 SASFLYS (SEQ ID NO:5)

L3 QQYNIYPLT (SEQ ID NO:6)

FIG. 2

Comparações das regiões de estrutura de cadeia pesada do anticorpo hTNF40 e as seqüências de consenso do grupo 1 e do grupo 3 humanos

consenso grupo 1 humano	: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	(SEQ ID NO: 91)
hTNF40	: <u>Q</u> IQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT	(SEQ ID NO: 92)
consenso grupo 1 humano	: WVRQAPGQGLEWMG	(SEQ ID NO: 93)
hTNF40	: WVKQAPGKAFAKWMG	(SEQ ID NO: 94)
consenso grupo 1 humano	: RVTITRDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR	(SEQ ID NO: 95)
hTNF40	: <u>RFAFSLETSASTAFLOINN</u> LKNE DTATYFCAR	(SEQ ID NO: 96)
consenso grupo 1 humano	: WGQGTLLTVSS	(SEQ ID NO: 97)
hTNF40	: <u>WGQGTLL</u> TVSS	(SEQ ID NO: 98)
consenso grupo 3 humano	: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO: 106)
hTNF40	: <u>Q</u> IQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT	(SEQ ID NO: 92)
consenso grupo 3 humano	: WVRQAPGKGLEWVS	(SEQ ID NO: 107)
hTNF40	: WVKQAPGKAFAKWMG	(SEQ ID NO: 94)
consenso grupo 3 humano	: RFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 108)
hTNF40	: <u>RFAFSLETSASTAFLOINN</u> LKNE DTATYFCAR	(SEQ ID NO: 96)
consenso grupo 3 humano	: WGQGTLLTVSS	(SEQ ID NO: 109)
hTNF40	: <u>WGQGTLL</u> TVSS	(SEQ ID NO: 98)


124

FIG. 4

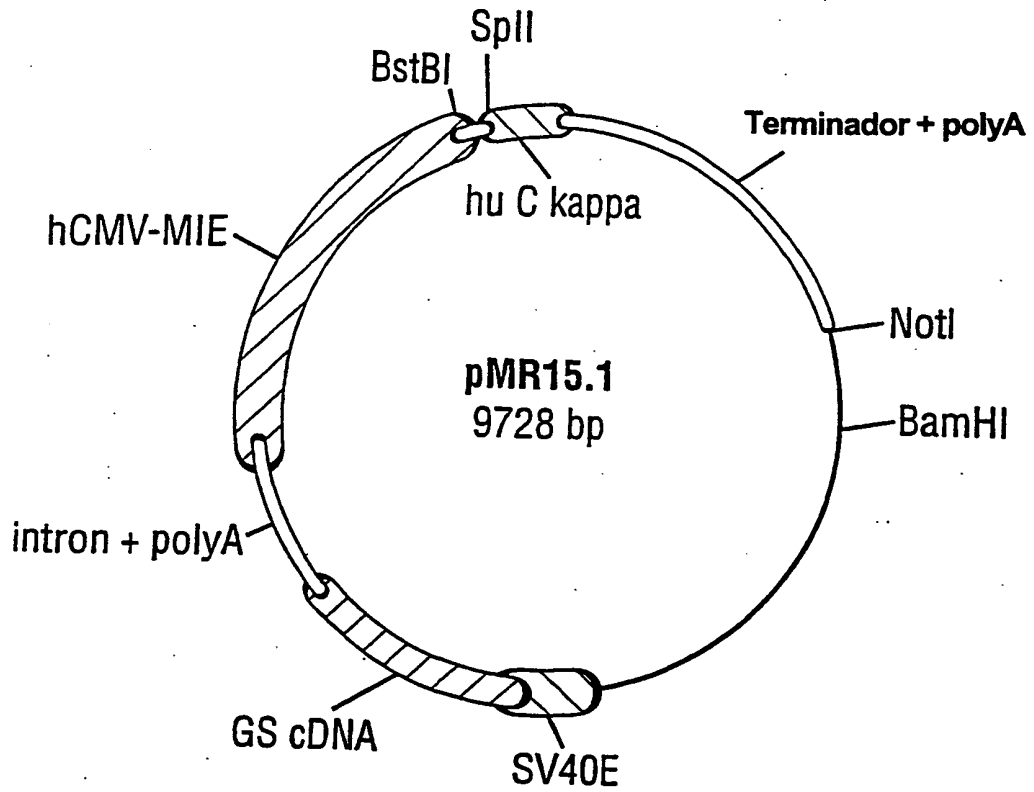
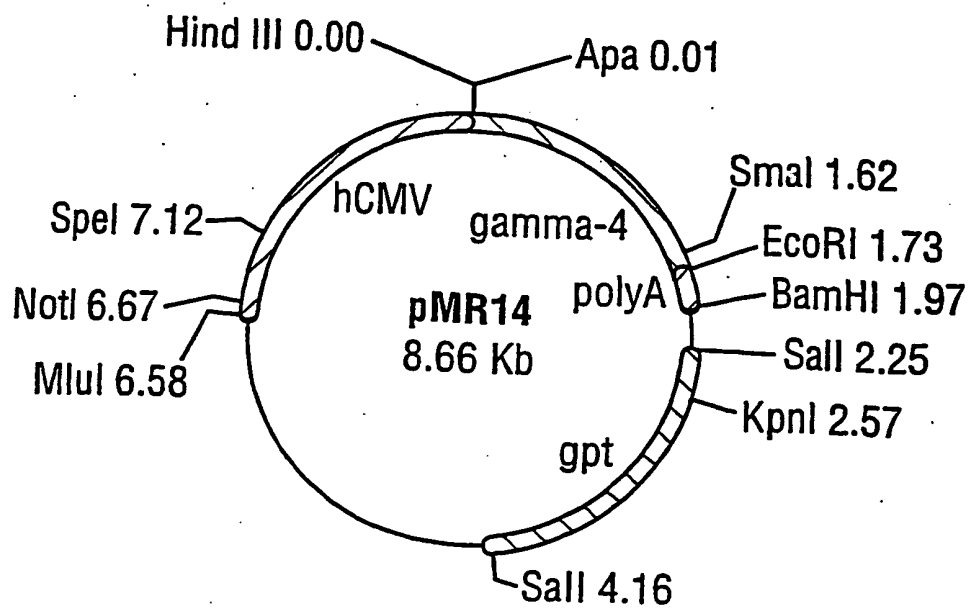


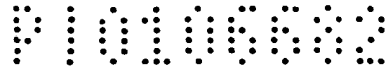
FIG. 5



125

FIG. 6 Sequência VI de murinos de hTNF40 (SEQ ID NO: 99)

10	20	30	40	50
GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AGG	CTG TAA CAC TAC TGG GTC AGA GTT TTT AAG TAC AGG TGT AGT CAT CCT CTG TCC	D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R>		
60	70	80	90	100
GTC AGC GTC ACC TGC AGG GCC AGT CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAT	CAG TCG CAG TGG ACG TTC CGG TCA GTC TTA CAC CCA TGA TTA CAT CGG ACC ATA	V S V T C K A S Q N V G T N V A W Y>		
110	120	130	140	150
CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT CAA GCA CTG ATT TAC TCG GCA TCC TTC CTA	GTT GTC TTT GGT CCT GTT AGA GGA TTT CGT GAC TAA ATG AGC CGT AGG AAG GAT	Q Q K K P G Q Q S P K A L I Y S A S F L>		
170	180	190	200	210
TAT AGT GGA GTC CCT TAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT	ATA TCA CCT CAG GGA ATA GCG AAG TGT CCG TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA	Y S G V P Y R F T G S G S G T D F T>		
220	230	240	250	260
CTC ACC ATC AGC ACT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAG TAT TTC TGT CAG CAA	GAG TGG TAG TCG TGA CAC GTC AGA CTT CTG AAC CGT CTC ATA AAG ACA GTC GTT	L T I S T T V Q S E D L A E Y F C Q Q>		
280	290	300	310	320
TAT AAC ATC TAT CCT CTC ACG TTC GGT GCT GGT ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGT	ATA TTG TAG ATA GGA GAG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC GAC CTC GAC TTT GCA	Y N I Y P L T F G A G T K L E L K R>		



126

FIG. 7 Sequência Vh de murinos de hTNF40 (SEQ ID NO: 100)

```

10      20      30      40      50
CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC
GTC TAG GTC AAC CAC GTC AGA CCT GGA CTC GAC TTC TTC GGA CCT CTC TGT CAG
Q   I   Q   L   V   Q   S   G   P   E   L   K   K   P   G   E   T   V>

60      70      80      90      100
AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAT GTT TTC ACA GAC TAT GGA ATG AAT TGG
TTC TAG AAG ACG TTC CGA AGA CCT ATA CAA AAG TGT CTG ATA CCT TAC TTA ACC
K   I   S   C   K   A   S   G   Y   V   F   T   D   Y   G   M   N   W>

110     120     130     140     150     160
GTG AAG CAG GCT CCA GGA AAG GCT TTC AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TAC
CAC TTC GTC CGA GGT CCT TTC CGA AAG TTC ACC TAC CCG ACC TAT TTG TGG ATG
V   K   Q   A   P   G   K   A   F   K   K   W   M   G   W   I   N   T   Y>

170     180     190     200     210
ATT GGA GAG CCA ATA TAT GTT GAT GAC TTC AAG GGA CGA TTT GCC TTC TCT TTG
TAA CCT CTC GGT TAT ATA CAA CTA CTG AAG TTC CCT GCT AAA CGG AAG AGA AAC
I   G   E   P   I   Y   V   D   D   F   K   G   R   F   A   F   S   L>

220     230     240     250     260     270
GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCC TTT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC
CTT TGG AGA CGG TCG TGA CGG AAA AAC GTC TAG TTG TGG GAG TTT TTA CTC CTG
E   T   S   A   S   T   A   F   L   Q   I   N   N   L   K   N   E   D>

280     290     300     310     320
ACG GCT ACA TAT TTC TGT GCA AGA GGT TAC CGG TCC TAT GCT ATG GAC TAC TGG
TGC CGA TGT ATA AAG ACA CGT TCT TCT CCA ATG GCC AGG ATA CGA TAC CTG ATG ACC
T   A   T   Y   F   C   A   R   G   Y   R   S   Y   A   M   D   Y   W>

330     340     350
GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCT TCA
CCA GTT CCT TGG AGT CAG TGG CAG AGA AGT
G   Q   G   T   S   V   T   V   S   S>

```

127

FIG. 8
Sequência VI enxertada de hTNF40 (SEQ ID NO: 8)

10	20	30	40	50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG CAG CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG				
CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC				
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R>				
60	70	80	90	100
GTC ACC ATC ACT TGT AAA GCC AGT CAG AAC GTA GGT ACT AAC GTA GCC TGG TAT				
CAG TGG TAG TGA ACA TTT CGG TCA GTC TTG CAT CCA TGA TTG CAT CGG ACC ATA				
V T I T C K A S Q N V G T N V A W Y>				
110	120	130	140	150
CAG CAA AAA CCA GGT AAA GCC CCA AAA GCC CTC ATC TAC AGT GCC TCT TTC CTC				
GTC GTT TTT GGT CCA TTT CGG GGT TTT CGG GAG TAG ATG TCA CGG AGA AAG GAG				
Q Q K P G K A P K A L I Y S A S F L>				
170	180	190	200	210
TAT AGT GGT GTA CCA TAC AGG TTC AGC GGA TCC GGT AGT GGT ACT GAT TTC ACC				
ATA TCA CCA CAT GGT ATG TCC AAG TCG CCT AGG CCA TCA CCA TGA CTA AAG TGG				
Y S G V P Y R F S G S G S G T D F T>				
220	230	240	250	260
CTC AGC ATC AGT AGC CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT TAT TAC TGT CAA CAG				
GAG TGC TAG TCA TCG GAG GTC GGT CTT CTA AAG CGG TGA ATA ATG ACA GTT GTC				
L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q>				
280	290	300	310	320
TAT AAC ATC TAC CCA CTC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA GAA ATC AAA				
ATA TTG TAG ATG GGT GAG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT CTT TAG TTT				
Y N I Y P L T F G Q G T K V E I K>				

FIG. 9 Sequência V enxertada de hTNF40 (SEQ ID NO: 9)

```

10      20      30      40      50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG
CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC
D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R>

60      70      80      90      100
GTC ACC ATC ACT TGT AAA GCC AGT CAG AAC GTA GGT ACT AAC GTA GCC TGG TAT
CAG TGG TAG TGA ACA TTT CGG TCA GTC TTG CAT CCA TGA TTG CAT CGG ACC ATA
V   T   I   T   C   K   A   S   Q   N   V   G   T   N   V   A   W   Y>

110     120     130     140     150     160
CAG CAA AAA CCA GGT AAA GCC CCA AAA CTC ATC CTC AGT GCC TCT TTC CTC
GTC GTT TTT GGT CCA TTT CGG GGT TTT GAG GAG TAG ATG TCA CGG AGA AAG GAG
Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   S   A   S   F   L>

170     180     190     200     210
TAT AGT GGT GTA CCA TAC TAC AGG TTC AGC GGA TCC GGT AGT GGT ACT GAT TTC ACC
ATA TCA CCA CAT GGT ATG TCC AAG TCG CCT AGG CCA TCA CCA TGA CTA AAG TGG
Y   S   G   V   P   Y   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T>

220     230     240     250     260     270
CTC ACG ATC AGT AGC CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT TAT TAC TGT CAA CAG
GAG TGC TAG TCA TCG GAG GTC GGT CTT CTA AAG CGG TGA ATA ATG ACA GTT GTC
L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q>

280     290     300     310     320
TAT AAC ATC TAC CCA CTC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA GAA ATC AAA
ATA TTG TAG ATG GGT GAG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT CTT TAG TTT
Y   N   I   Y   P   L   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K>

```

~~129~~

10	CAG GTG CAG CTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT GGT TCC GTC	20	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V>	30	GTC CAC GTC GAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA CGA AGG CAG	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3000	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110	3120	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3230	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380	3390	3400	3410	3420	3430	3440	3450	3460	3470	3480	3490	3500	3510	3520	3530	3540	3550	3560	3570	3580	3590	3600	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740	3750	3760	3770	3780	3790	3800	3810	3820	3830	3840	3850	3860	3870	3880	3890	3900	3910	3920	3930	3940	3950	3960	3970	3980	3990	4000	4010	4020	4030	4040	4050	4060	4070	4080	4090	4100	4110	4120	4130	4140	4150	4160	4170	4180	4190	4200	4210	4220	4230	4240	4250	4260	4270	4280	4290	4300	4310	4320	4330	4340	4350	4360	4370	4380	4390	4400	4410	4420	4430	4440	4450	4460	4470	4480	4490	4500	4510	4520	4530	4540	4550
----	---	----	--------------------------------------	----	---	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------



130

FIG. 11

10	GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCA GGA GGC GGT CTC GTG CAG CCT GGC GGA TCA CTG	20	CTC CAA GTC GAC CAG CTC AGT CCT CCG CCA GAG CAC GTC GGA CCG CCT AGT GAC	30	E V Q L V E S G G L V Q P G G S L>	40	50
60	AGA TTG TCC TGT GCT GCA TCT GGT TAC TCT TTC ACA GAC TAT GGA ATG AAT TGG	70	TCT AAC AGG ACA CGA CGT AGA CCA ATG CAG AAG TGT CTG ATA CCT TAC TTA ACC	80	R L S C A A S G Y V F T D Y G M N W>	90	100
110	GTT AGA CAG GCC CCG GGA AAG GGC CTG GAA TGG ATG GGT TGG ATT AAT ACT TAC	120	CAA TCT GTC CGG GGC CCT TTC CCG GAC CTT ACC TAC CCA ACC TAA TTA TGA ATG	130	V R Q A P G K G L E W M G W I N T Y>	140	150
170	ATT GGA GAG CCT ATT TAT GCT GAC AGC GTC AAG GGC AGA TTC ACG TTT TCT CTA	180	TAA CCT CTC GGA TAA ATA CGA CTG TCG CAG TTC CCG TCT AAG TGC AAG AGA GAT	190	I G E P I Y A D S V K G R F T F S L>	200	210
220	GAC ACA TCC AAG TCA ACA GCA TAC CTC CAA ATG AAT AGC CTG AGA GCA GAG GAC	230	CTG TGT AGG TTC AGT TGT TGT CGT ATG GAG GTT TAC TTA TCG GAC TCT CGT CTC CTG	240	D T S S K S T A Y L Q M N S L R A E D>	250	260
280	ACC GCA GTG TAC TAT TGT GCT AGA GGA TAC AGA TCT TAT GCC ATG GAC TAC TGG	290	TGG CGT CAC ATG ATA ACA CGA TCT CCT ATG TCT AGA ATA CGG TAC CTG ATG ACC	300	T A V Y Y C A R G Y R S Y A M D Y W>	310	320
330	GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA	340	CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT	350	G Q G T L V T V S S>		

131
P

FIG. 12

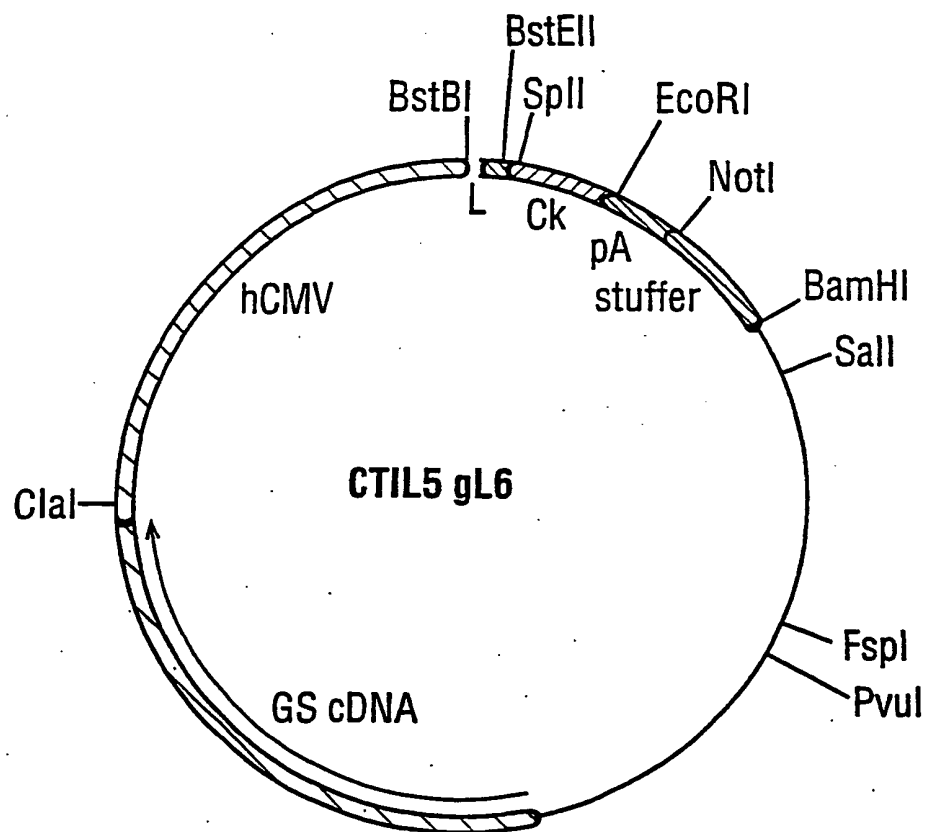
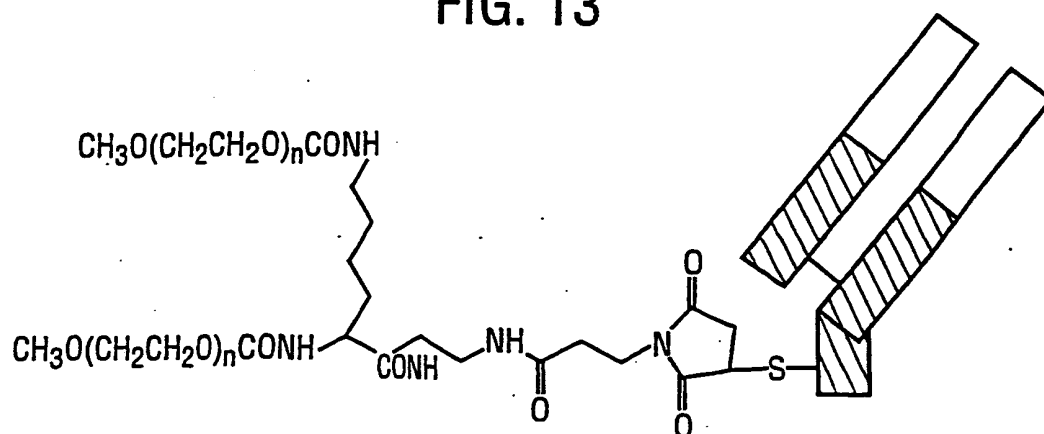
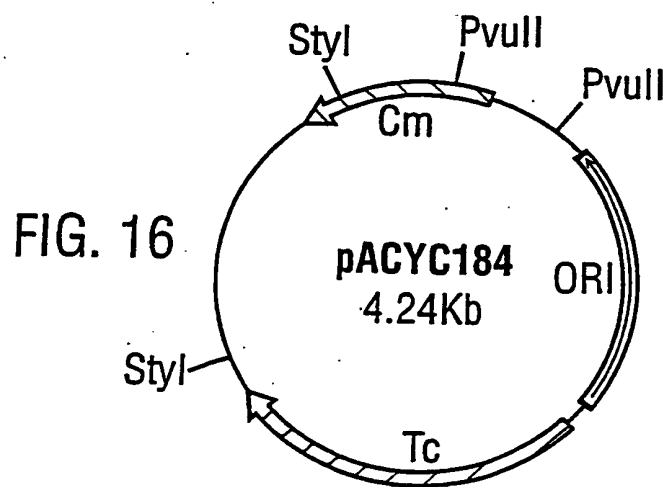
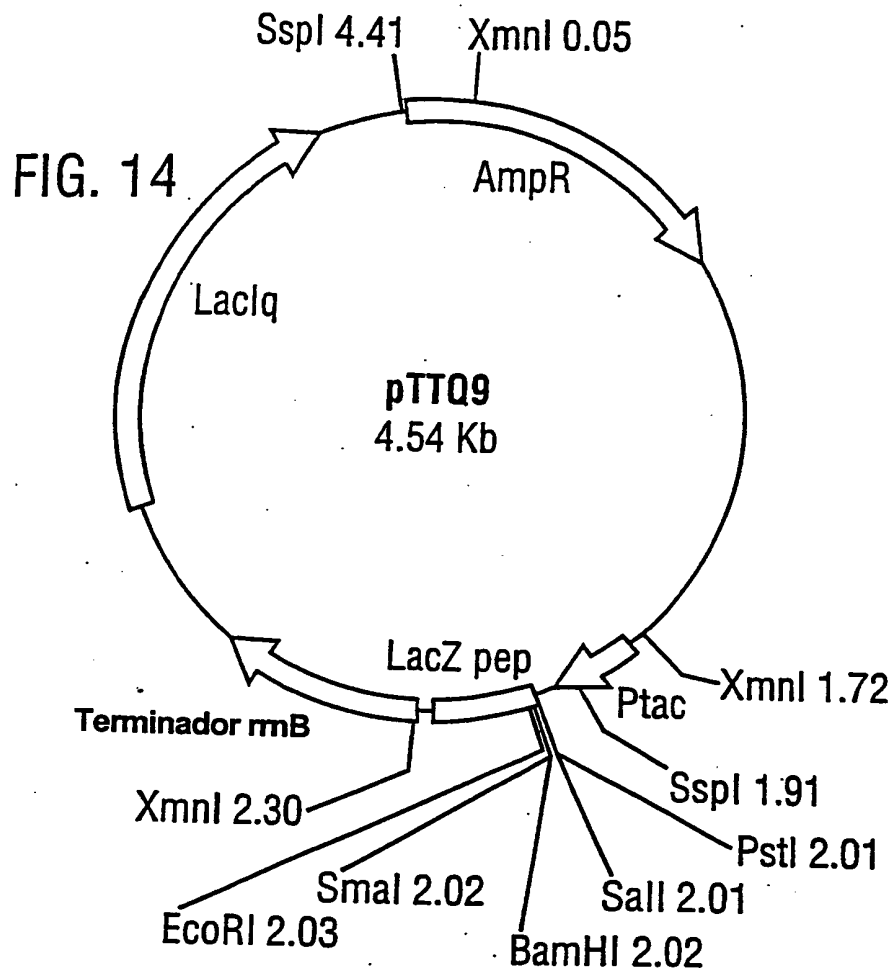


FIG. 13





Seqüência do adaptador de oligonucleotídeos OmpA (SEQ ID NO: 101)

- Sítios de restrição interna são mostrados em negrito
- A extremidade coesiva XhoI 5' se liga no sítio SalI do vetor, bloqueando-o
- S.D. representa a sequência de Shine Dalgarno OmpA.

[Handwritten signature]

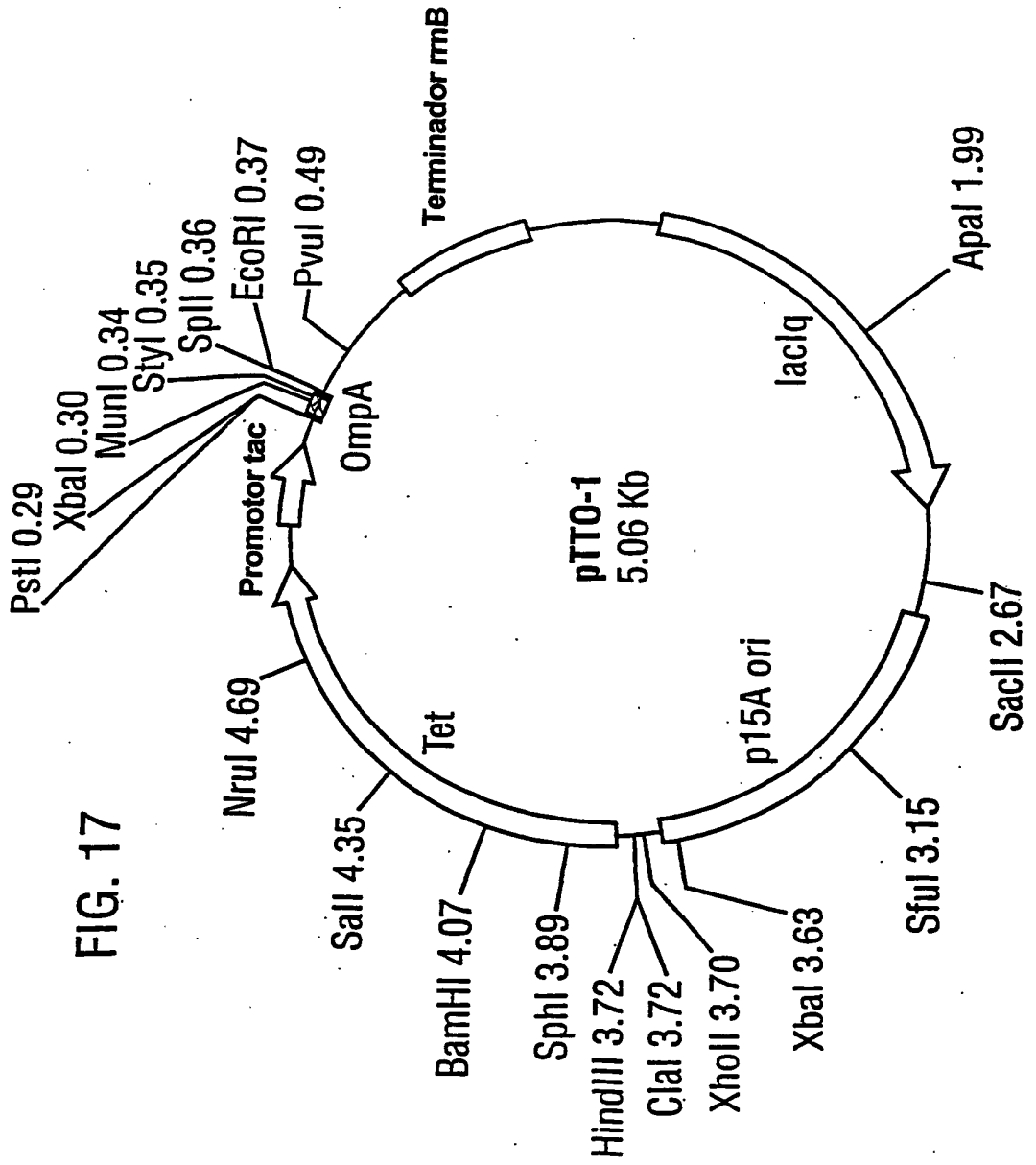


FIG. 17

[Handwritten signature]

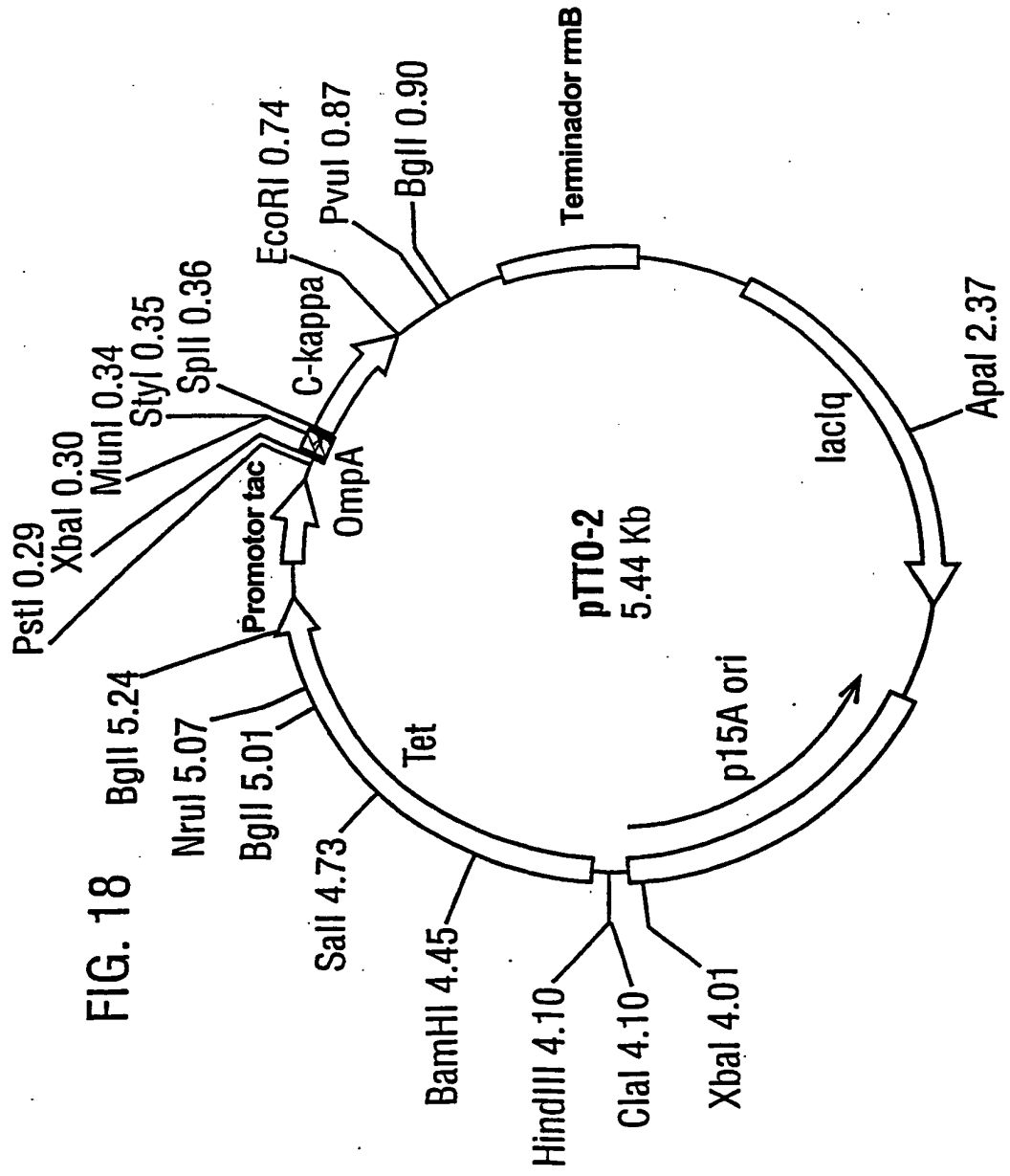


FIG. 18

FIG. 19

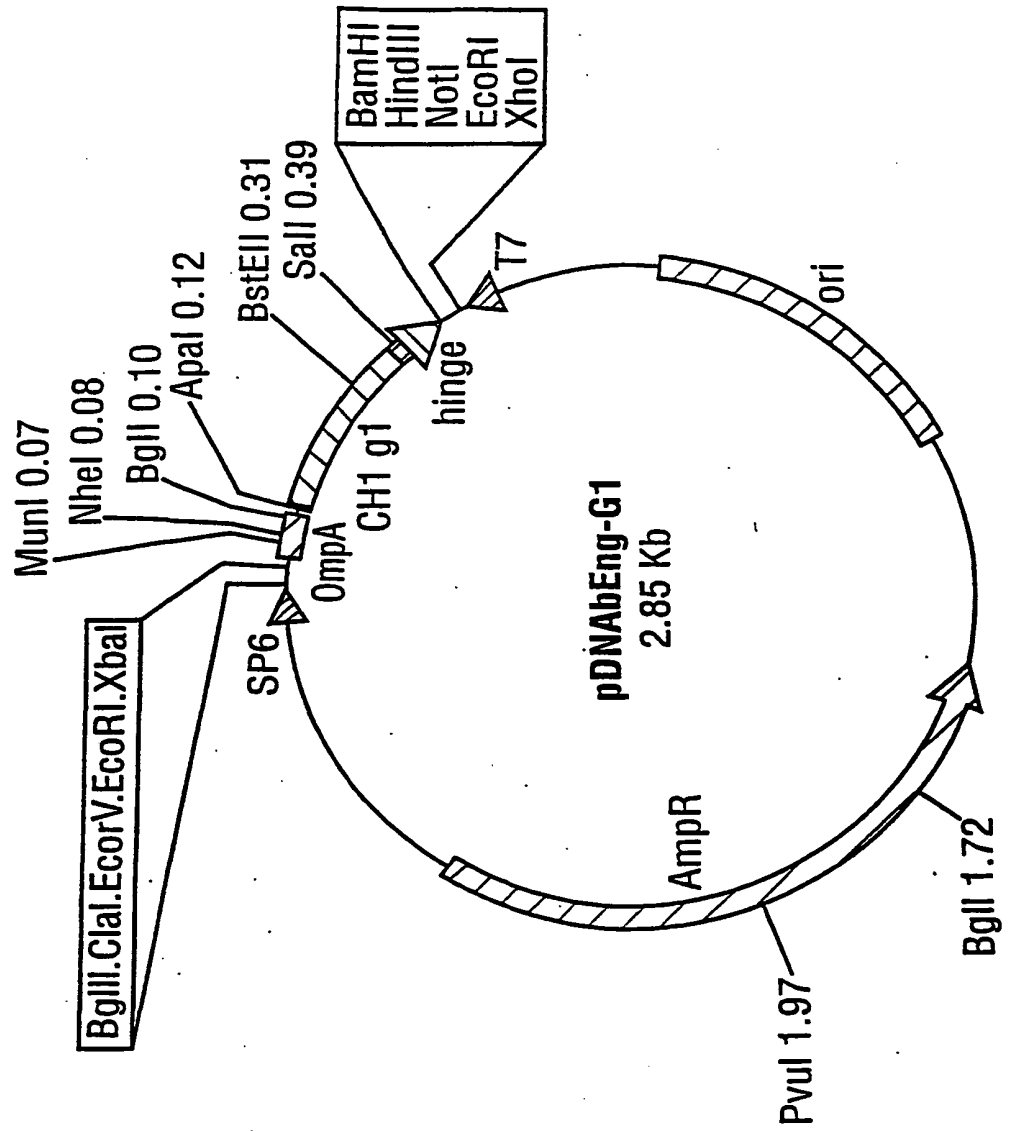


FIG. 20 CASSETES DE OLIGONUCLEOTÍDEO CODIFICANDO DIFERENTES SEQUÊNCIAS INTERGÊNICAS PARA EXPRESSÃO fab' DE E. coli

IGS CASSETTE-1; Espaço intergênico = +1

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TAATG, AAG, AAG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 102)

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

Extremidade da sequência c-Kappa -> Início da sequência OmpA ->

IGS CASSETTE-2; Espaço intergênico = +1

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGG, GAG, TGT, TAA AATG, AAG, AAG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 103)

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

IGS CASSETTE-3; Espaço intergênico = +13

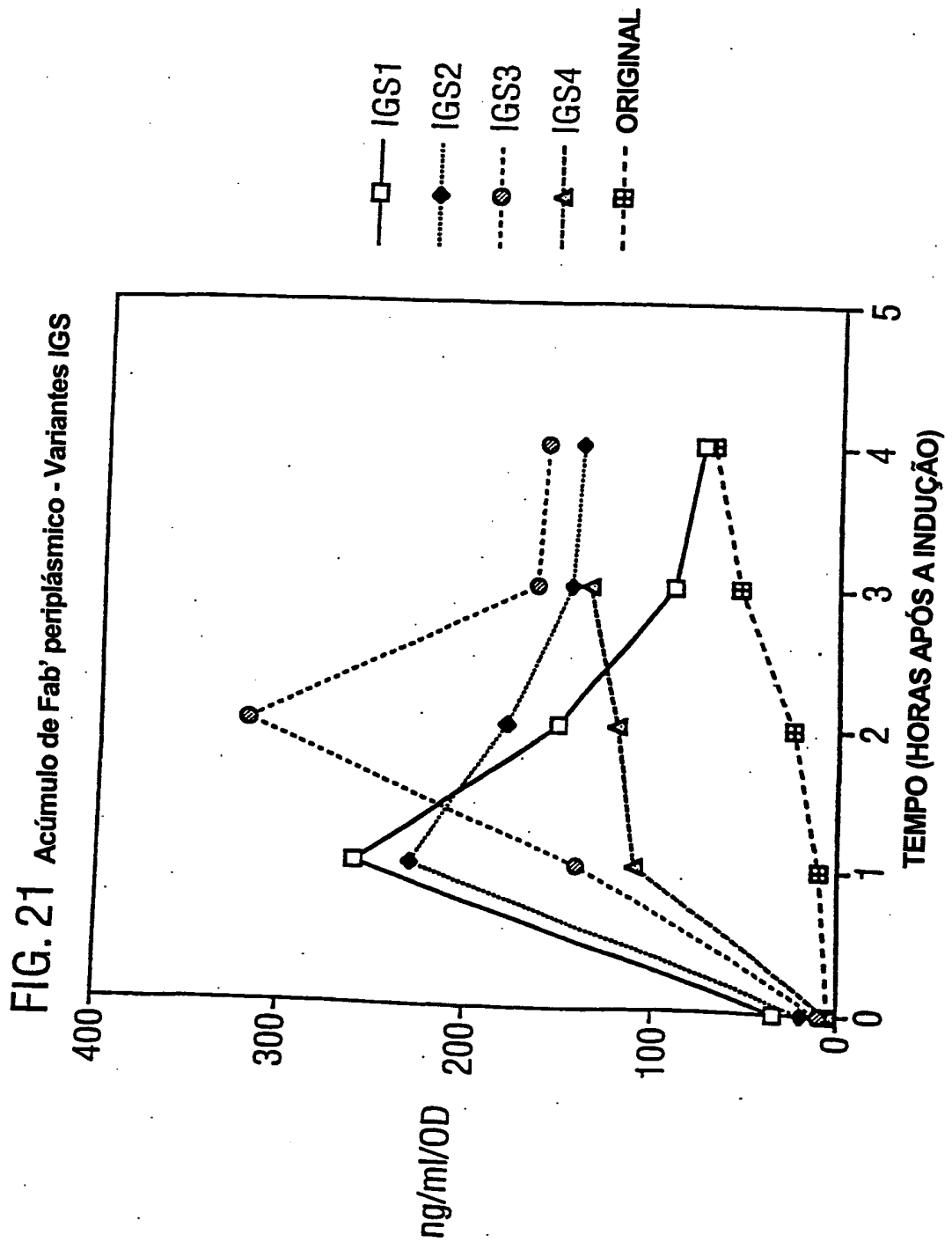
G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGC, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA GGAGGAAAAAAAAAATG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 104)

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

IGS CASSETTE-4; Espaço intergênico = +13

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TGA CGAGGATTATATATATG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (SEQ ID No: 105)

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I



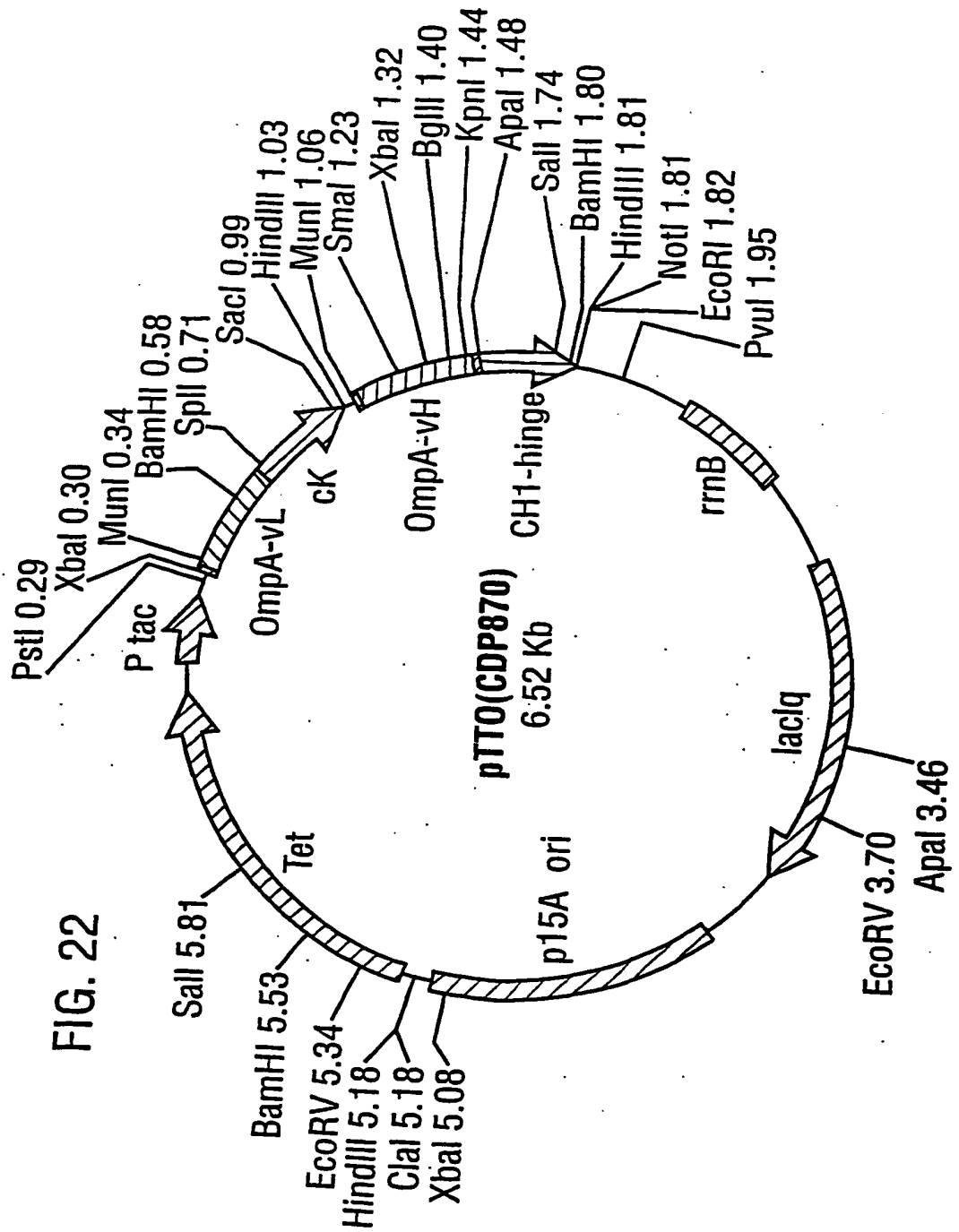




FIG. 23

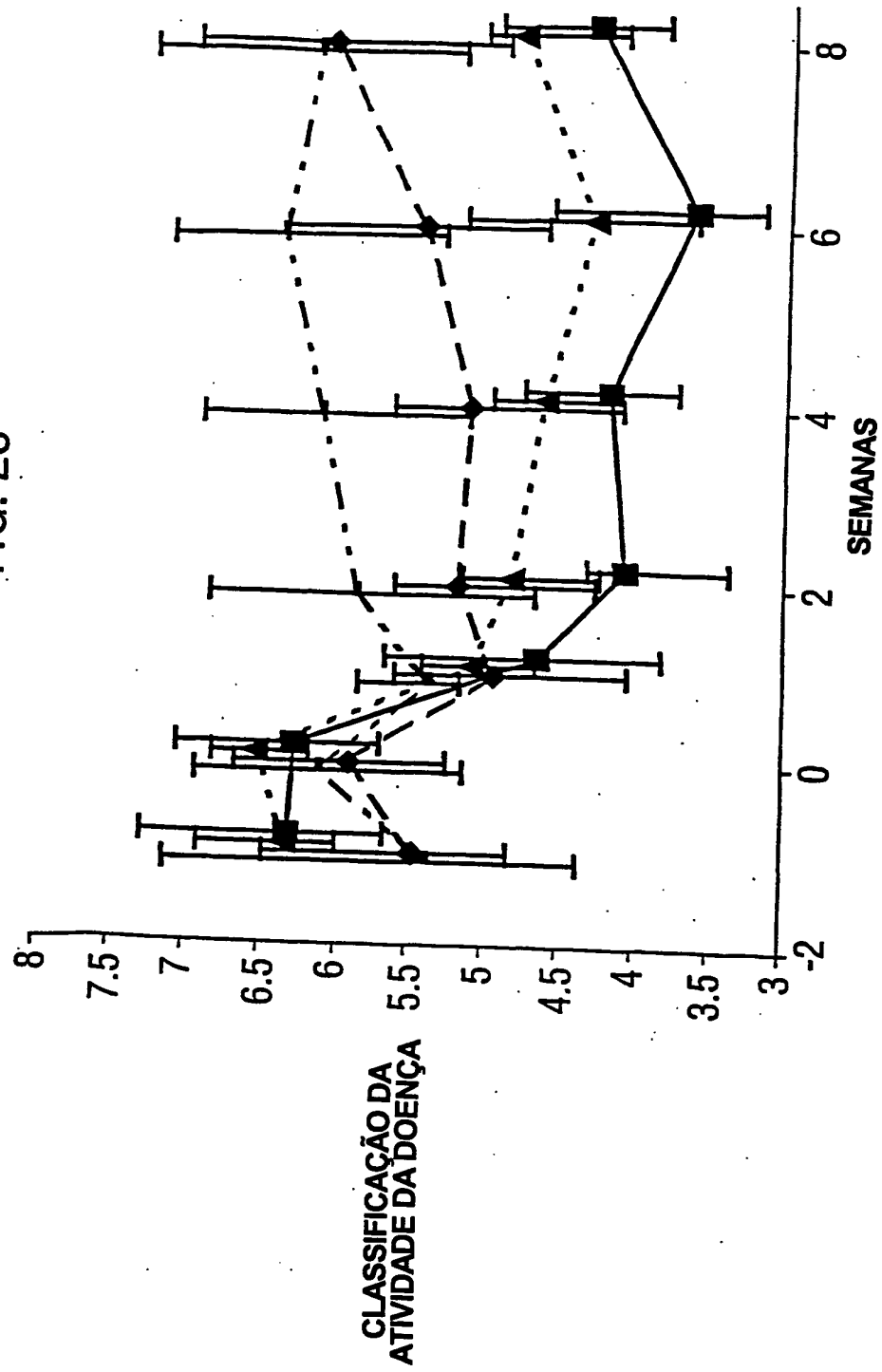


FIG. 24

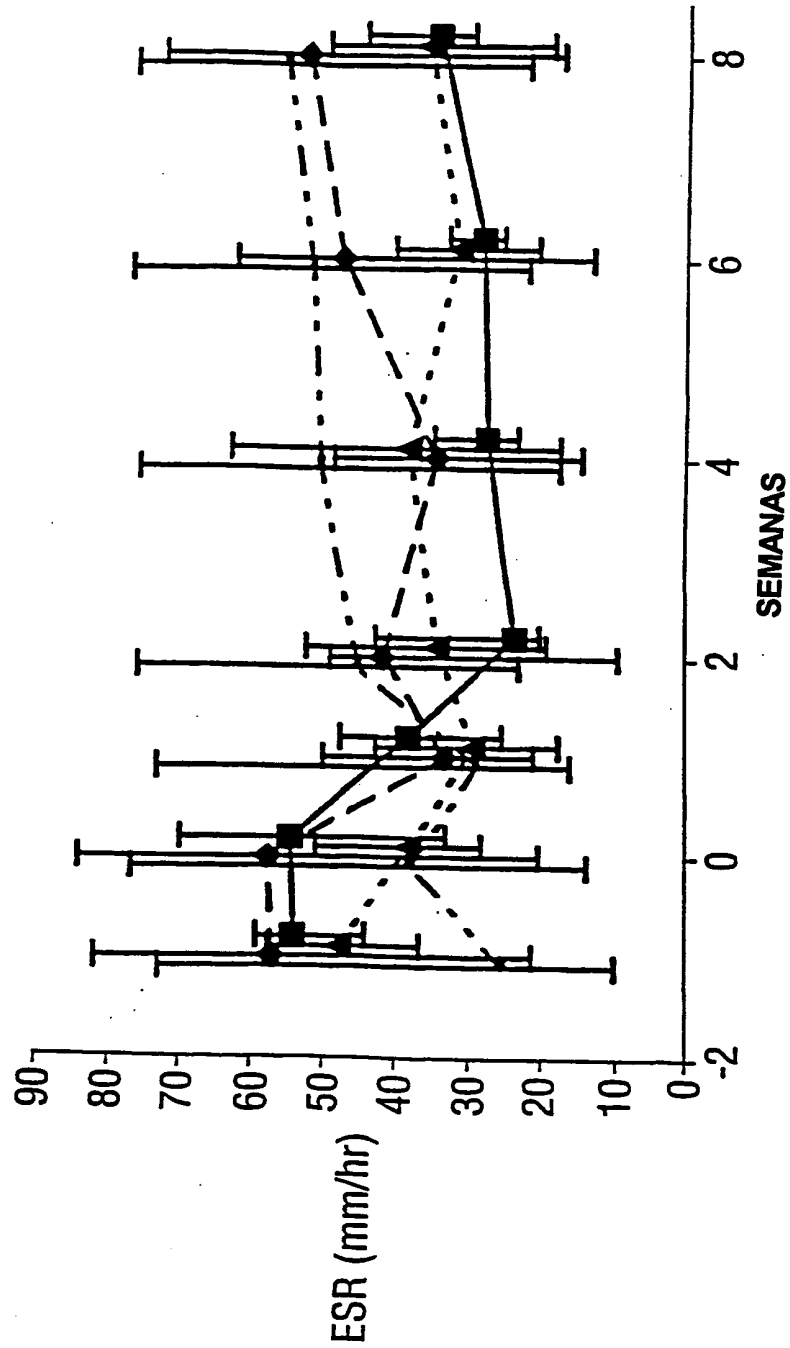


FIG. 24(cont.)

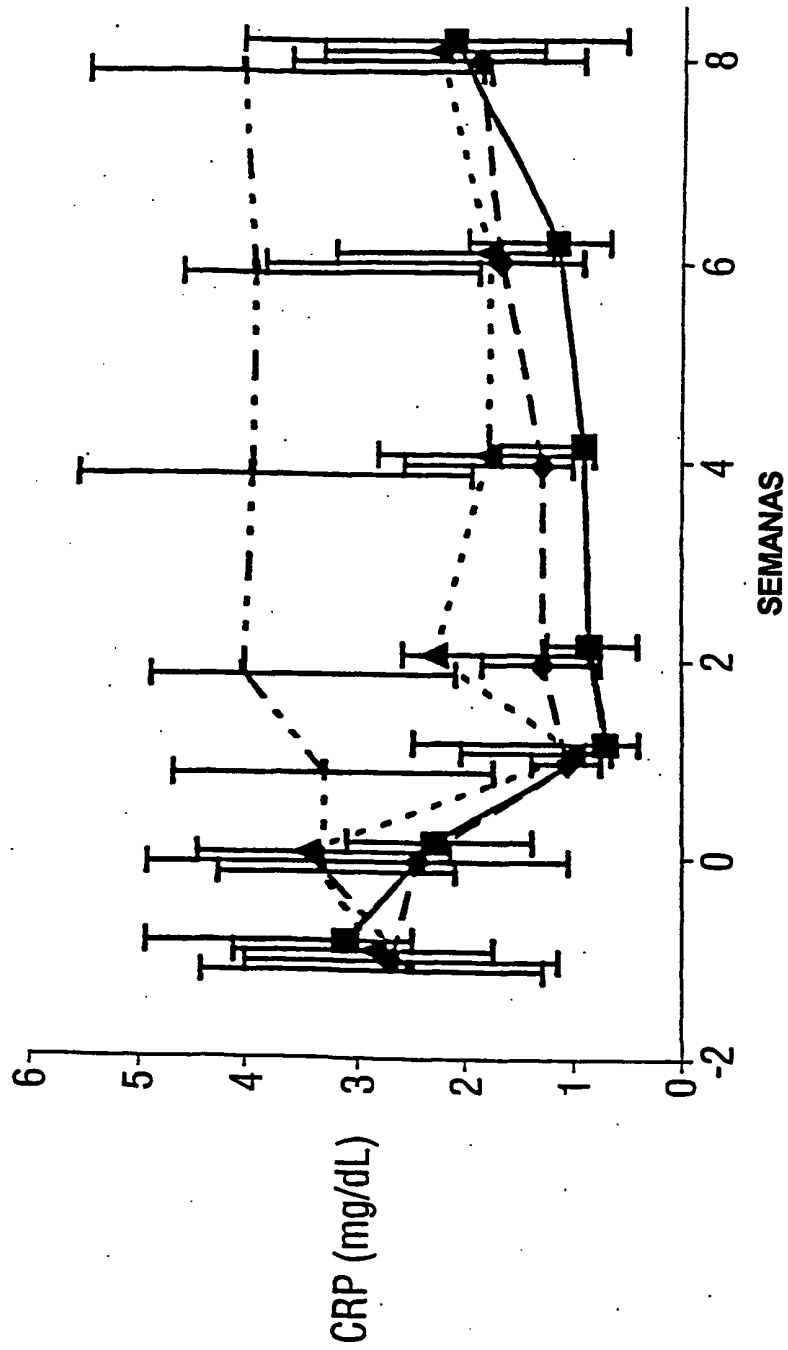


FIG. 24(cont.)

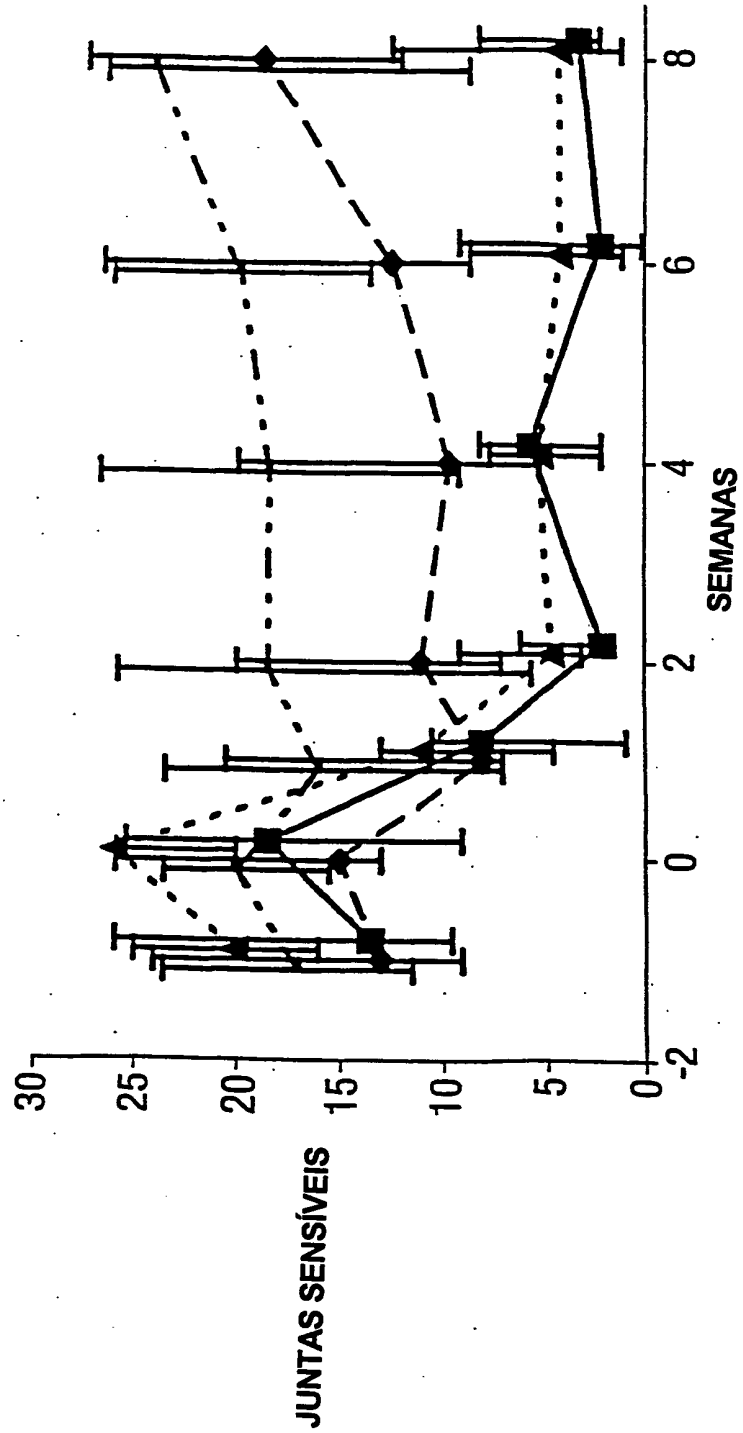


FIG. 24(cont.)

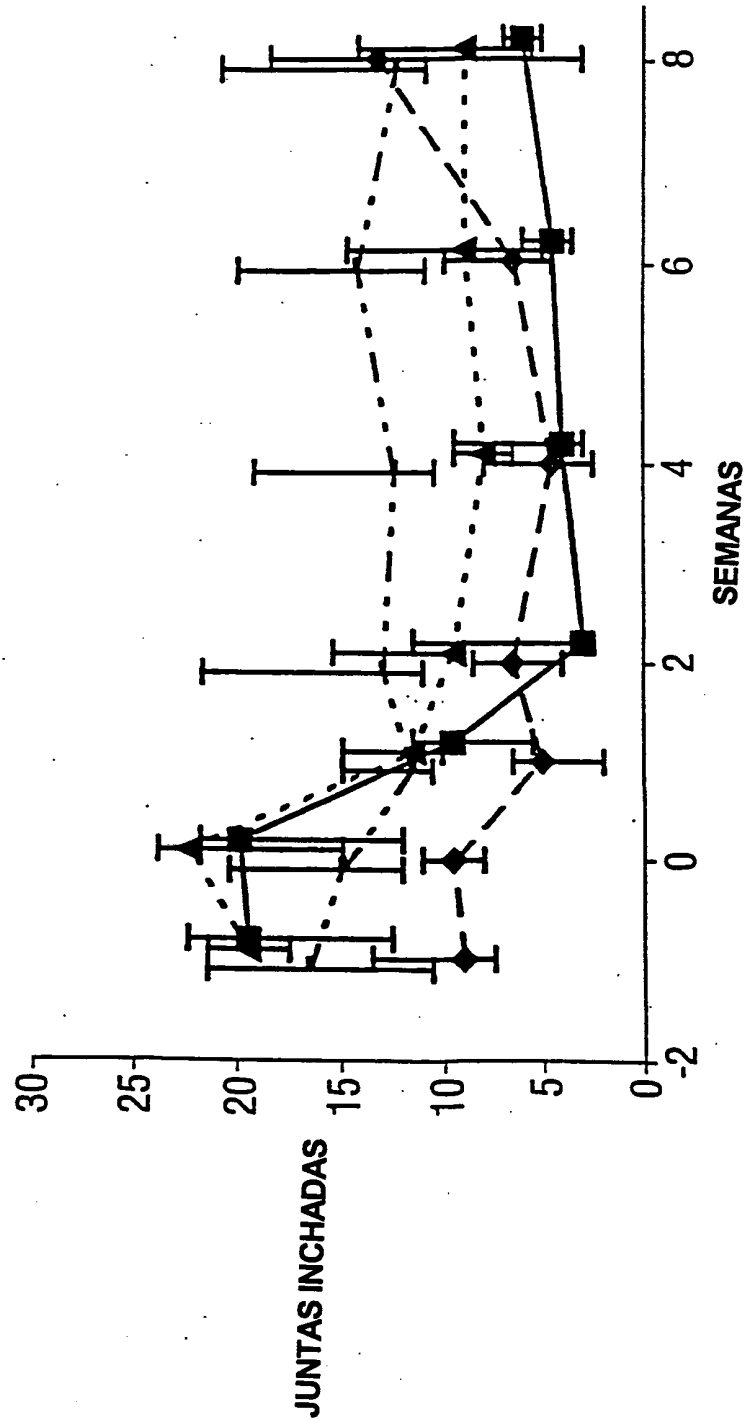
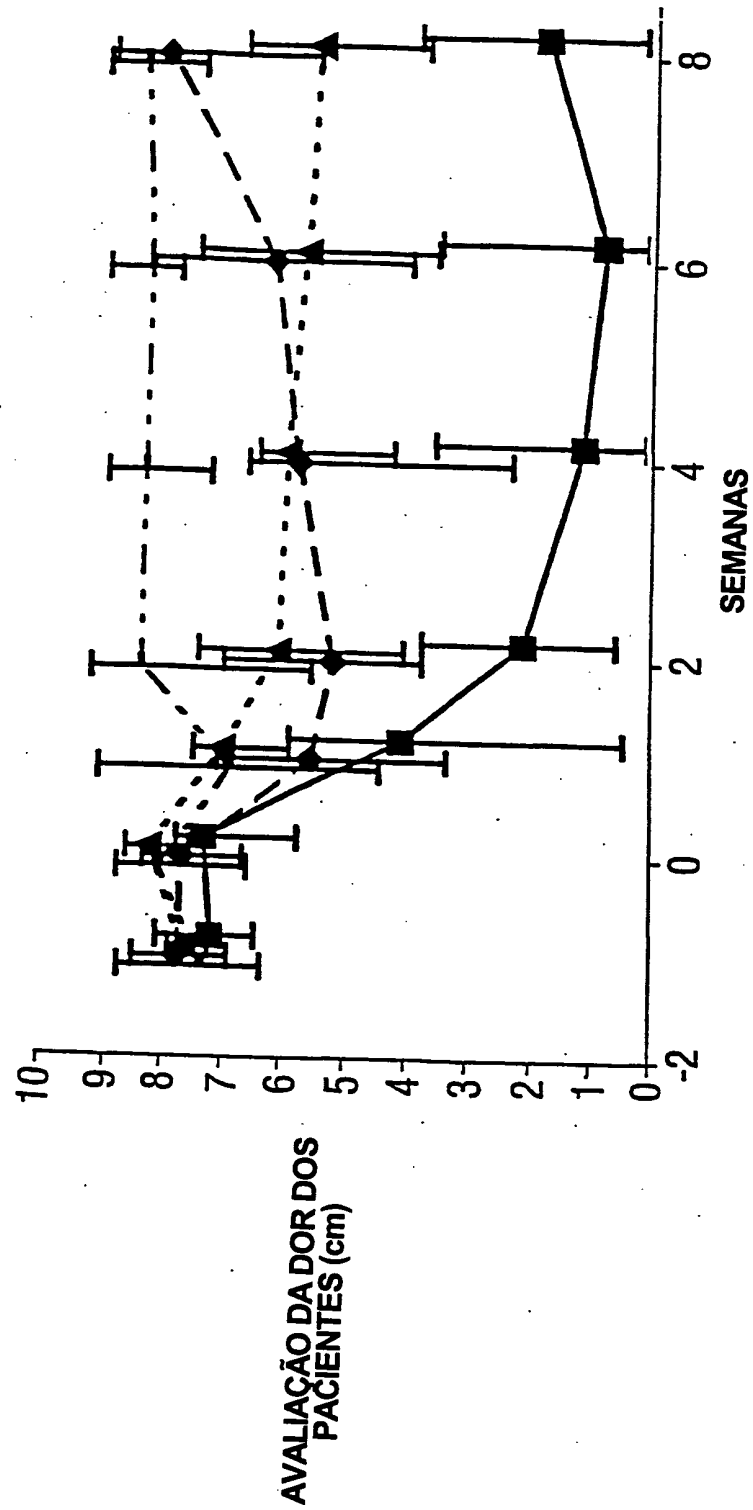


FIG. 24(cont.)



1988

FIG. 24(cont.)

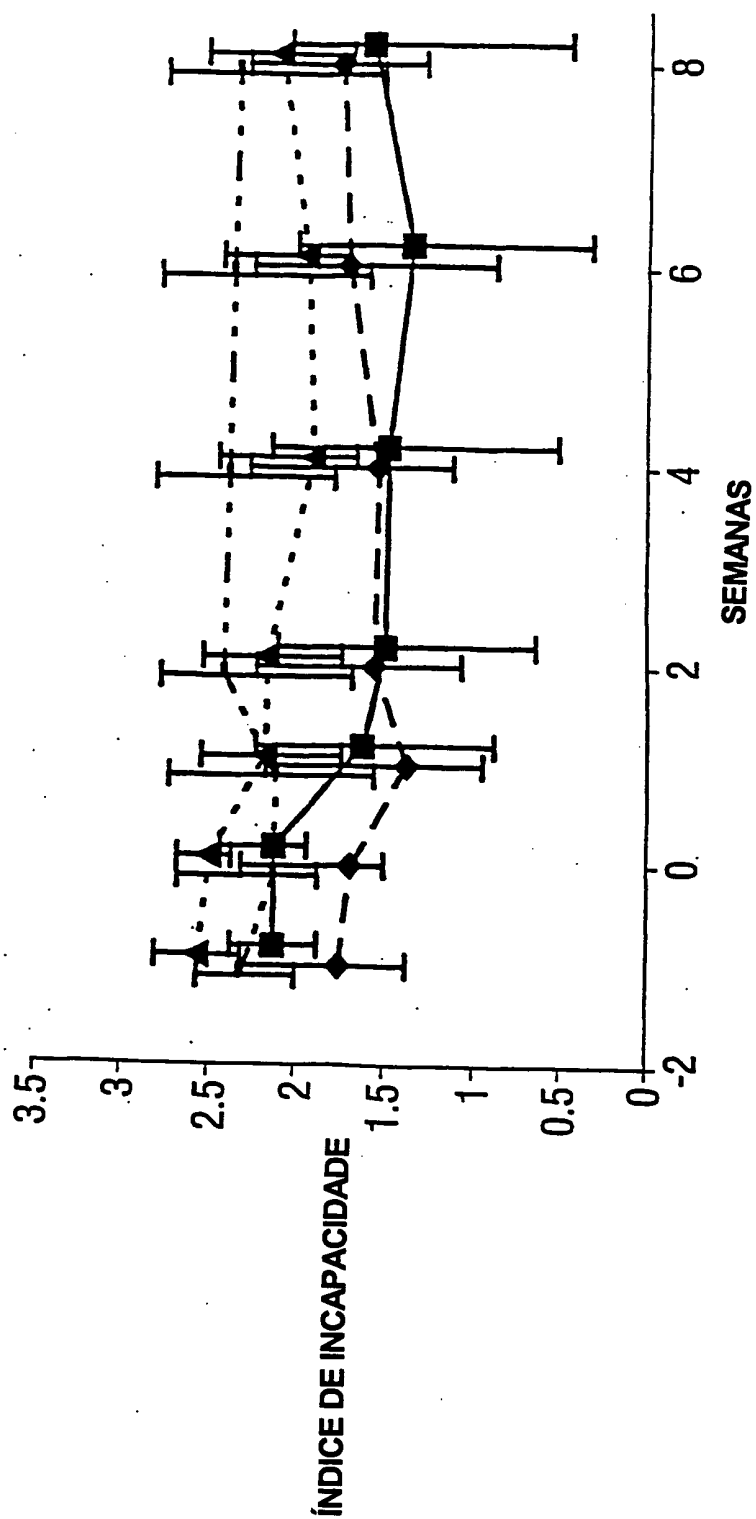


FIG. 24(cont.)

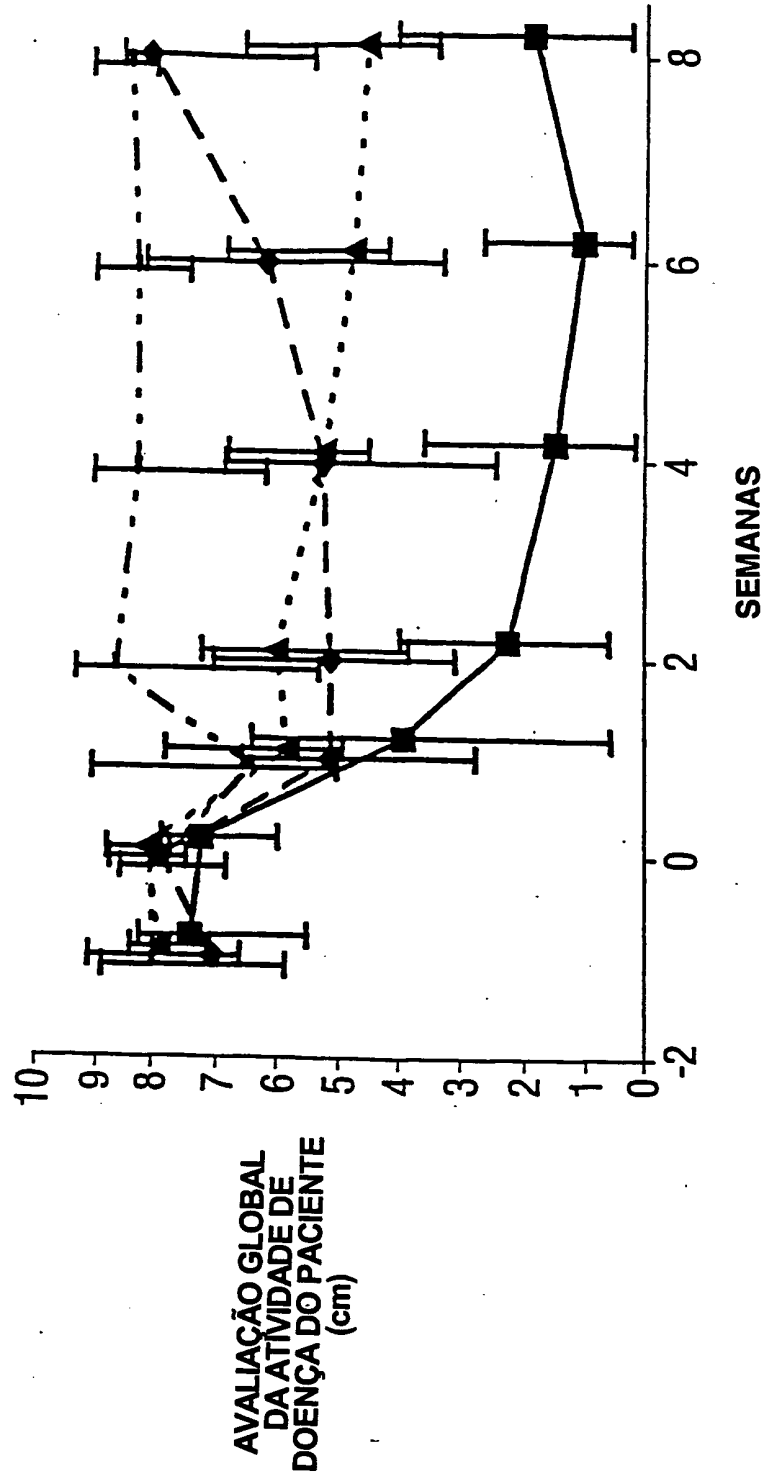


FIG. 24(cont.)

