



(11) **Número de Publicação:** PT 945464 E

(51) **Classificação Internacional:** (Ed. 6)
C07K016/22 A

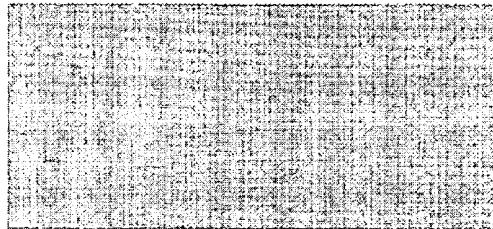
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1996.10.07	(73) Titular(es): CAMBRIDGE ANTIBODY TECHNOLOGY LIMITED THE SCIENCE PARK MELBOURN CAMBRIDGESHIRE SG8 6EJ GB
(30) Prioridade: 1995.10.06 GB 9520486 1996.01.19 GB 9601081	
(43) Data de publicação do pedido: 1999.09.29	(72) Inventor(es):
(45) Data e BPI da concessão: 2001.02.07	TRISTAN JOHN VAUGHAN GB ANDREW JAMES WILLIAMS GB JONATHAN ALEXANDER GREEN GB KEVIN STUART JOHNSON GB ALISON JANE WILTON GB
	(74) Mandatário(s): ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) Epígrafe: MEMBROS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICA PARA O FACTOR BETA DE CRESCIMENTO DE TRANSFORMAÇÃO HUMANO; MATERIAIS E MÉTODOS

(57) Resumo:

MEMBROS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICA PARA O FACTOR BETA DE CRESCIMENTO DE TRANSFORMAÇÃO HUMANO; MATERIAIS E MÉTODOS



945464



86 300
EP 0 945 464/PT

DESCRICAÇÃO

"Membros de ligação específica para o factor beta de crescimento de transformação humano; materiais e métodos"

O presente invento refere-se a membros de ligação específica para o factor beta de crescimento de transformação (TGF- β) humano e a materiais e métodos relacionados. Em particular, refere-se a membros de ligação específica que compreendem domínios de ligação de anticorpos humanos. Podem-se isolar e utilizar anticorpos humanos contra o TGF- β humano no tratamento de doenças, em particular na doença fibrótica e também em doenças imunitárias/inflamatórias. Está descrito o isolamento de auto-anticorpos próprios a partir de repertórios de segmentos de anticorpos apresentados em fagos (A.D. Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12, 725-734, 1993; A. Nissim *et al.*, *EMBO J.*, 13, 692-698, 1994; A.D. Griffiths *et al.*, 13, 3245-3260, 1994; C. Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10003-10007 1993; WO93/11236). No entanto, o presente invento proporciona anticorpos específicos contra uma isoforma particular do TGF- β , anticorpos estes que têm propriedades inesperadas e vantajosas.

O TGF- β é uma citóquina que se sabe estar envolvida em muitos processos celulares, tais como a proliferação e a diferenciação celulares, o desenvolvimento embrionário, a formação da matriz extracelular, o desenvolvimento dos ossos, a cura de feridas, a hematopoiese e respostas imunitárias e inflamatórias (A.B. Roberts M. Sporn 1990 pp419-472 em *Handbook of Experimental Pharmacology*, eds. M.B. Sporn & A.B. Roberts, Springer Heidelberg; J. Massague *et al.*, *Annual Rev. Cell Biol.* 6, 597-646, 1990).

A acumulação de matriz extracelular excessiva está associada a várias doenças fibróticas. Existe, assim, a necessidade de controlar agentes como o TGF- β 1 e o TGF- β 2, de modo a impedir os seus efeitos prejudiciais nestas doenças e esta constitui uma aplicação dos anticorpos humanos contra o TGF- β humano.



A modulação de respostas imunitárias e inflamatórias pelos TGF-beta inclui (i) inibição da proliferação de todos os subconjuntos de células T (ii) efeitos inibidores na proliferação e função dos linfócitos B (iii) regulação, no sentido da diminuição, da actividade de células assassinas naturais e da resposta de células T (iv) regulação da produção de citóquinas por células imunitárias (v) regulação da função de macrófagos e (vi) recrutamento e activação de leucócitos.

Uma outra aplicação dos anticorpos contra o TGF- β pode ser no tratamento de doenças imunitárias/inflamatórias, como a artrite reumatóide, em que é necessário controlar estas funções.

Constitui um objectivo premente isolar um fragmento de anticorpo específico para o TGF β da mesma espécie. Os animais não produzem normalmente anticorpos para抗énios próprios, um fenómeno designado por tolerância (G.J. Nossal, *Science*, 245, 147-153, 1989). Em geral, a vacinação com um抗énio próprio não resulta na produção de anticorpos circulantes. É, portanto, difícil produzir anticorpos humanos contra抗énios próprios de humanos. Existem também, adicionalmente, problemas éticos na vacinação de humanos. Em relação à criação de anticorpos não humanos específicos para o TGF- β existem vários problemas. O TGF- β é uma molécula imunossupressora e, além disso, há uma grande conservação de sequências entre as moléculas de TGF- β humano e de ratinho. Os TGF- β 1 humano e de ratinho diferem apenas num resíduo de aminoácido, uma alteração de alanina (humano), para serina (ratinho) num resíduo encoberto (R. Deryck et al., *J. Biol. Chem.*, 261, 4377-4379, 1986). Os TGF- β 2 humano e de ratinho apenas diferem em três resíduos; resíduo 59 (T ratinho, S humano); resíduo 60 (K ratinho, R humano) e resíduo 94 (N ratinho, K humano). Isto torna difícil criar anticorpos em ratinhos contra o TGF- β humano. Além disso, qualquer anticorpo criado poderá ser dirigido apenas contra um conjunto restrito de epítopenos.

Foram criados anticorpos policlonais que se ligam ao TGF- β 1 humano e ao TGF- β 2 humano, tanto contra epítopenos neutralizantes, como contra epítopenos não neutralizantes, no coelho (Danielpour et al., *Growth Factors*, 2, 61-71, 1989; A. Roberts et al., *Growth Factors*, 3, 277-286, 1990), galinha (R&D Systems, Minneapolis) e peru (Danielpour et al., *J. Cell Physiol.*, 138, 76-86,



1989). Também se utilizaram péptidos que representam sequências parciais de TGF- β como imunogénios, para produzir anti-soros policlonais neutralizantes em coelhos (W.A. Border *et al.*, *Nature* 346, 371-374, 1990; K.C. Flanders, *Biochemistry* 27, 739-746, 1988; K.C. Flanders *et al.*, *Growth Factors* 3, 45-52, 1990). Além disso, têm havido poucas descrições do isolamento de monoclonais de ratinho contra o TGF- β . Após a imunização com TGF- β 2 de bovino (idêntico ao TGF- β 2 humano), isolaram-se três anticorpos monoclonais, não neutralizantes, que são específicos para o TGF- β 2 e um antícorpo neutralizante que é específico para TGF- β 1 e TGF- β 2 (J.R. Dasch *et al.*, *J. Immunol.*, 142, 1536-1541, 1989). Noutra descrição, isolaram-se anticorpos neutralizantes, após imunização com TGF- β 1 humano, os quais ou eram específicos para TGF- β 1, ou tinham uma reacção cruzada com TGF- β 1, TGF- β 2, e TGF- β 3 (C. Lucas *et al.*, *J. Immunol.* 145, 1415-1422, 1990). Pode-se adquirir comercialmente um antícorpo monoclonal neutralizante de ratinho, que se liga a ambas as isoformas TGF- β 2 e TGF- β 3, da Genzyme Diagnostics.

O presente texto descreve o primeiro isolamento de anticorpos humanos dirigidos contra o TGF- β 1 humano e contra o TGF- β 2 humano. Está disponível um antícorpo monoclonal de ratinho dirigido contra o TGF- β 1 humano, da R&D Systems. Este antícorpo neutraliza apenas fracamente o TGF- β 1, num ensaio de neutralização. Também se geraram anticorpos monoclonais de ratinho, neutralizantes, a partir de ratinhos imunizados com péptidos de TGF- β 1 humanos, que compreendem as posições de aminoácidos 48 a 60 (antícorpo reactivo com TGF- β 1, TGF- β e TGF- β 3) e os aminoácidos das posições 86-101 (antícorpo específico para TGF- β 1 ; M. Hoefer & F.A. Anderer, *Cancer Immunol. Immunother.* 41, 302-308, 1995).

A tecnologia de anticorpos em fagocitos (WO92/01047; PCT/GB92/00883; PCT/GB92/01755; WO93/11236) oferece a possibilidade de isolar directamente anticorpos humanos contra o TGF- β humano. No pedido WO93/11236 está descrito o isolamento de auto-anticorpos próprios a partir de bibliotecas de exibição em fagocitos e foi sugerido que os anticorpos específicos para TGF- β podem ser isolados a partir de bibliotecas de exibição em fagocitos.

O presente pedido mostra que se podem isolar anticorpos com diferentes especificidades para moléculas de TGF- β . O TGF- β 1, o TGF- β 2 e o TGF- β 3 são



um grupo de citóquinas estreitamente relacionadas. São dímeros que consistem em 112 monómeros de aminoácidos, ligados por meio de uma ponte de dissulfureto inter-cadeias. O TGF- β 1 difere do TGF- β 2 em 27 alterações, essencialmente conservativas, e do TGF- β 3 em 22 alterações, essencialmente conservativas. Estas diferenças foram relacionadas com a estrutura 3D (M. Schlunegger & M.G. Grutter, *Nature* 358, 430-434, 1992). Os requerentes isolaram anticorpos que são essencialmente específicos para o TGF- β 1 (reactividade cruzada com o TGF- β 2 muito baixa); anticorpos que são essencialmente específicos para TGF- β 2 (reactividade cruzada com TGF- β 1 muito baixa); e anticorpos que se ligam tanto a TGF- β 1, como a TGF- β 2. Assim, estes três tipos diferentes de anticorpos, cada tipo com especificidades de ligação distintas, deverão reconhecer epítopenos diferentes nas moléculas de TGF- β . Estes anticorpos têm uma reactividade cruzada com TGF- β 3 baixa, tal como determinado por estudos de ligação utilizando ensaios com biossensores (e.g. BIACore™), ELISA e ensaios com radiorreceptores. O anticorpo estudado de forma mais ampla, o IgG4 6B1, mostra uma reactividade cruzada de 9% com o TGF- β 3, em comparação com o TGF- β 2, tal como determinado pelas suas constantes de dissociação relativas, determinadas utilizando um biossensor.

As isoformas de TGF- β são inicialmente exportadas das células como formas inactivas, latentes (R. Pircher *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 136, 30-37, 1986; L.M. Wakefield *et al.*, *Growth Factors*, 1, 203-218, 1989). Estas formas inactivas são activadas por proteases no plasma, para gerar a forma activa do TGF- β . É esta forma activa de TGF- β 2 que se liga aos receptores, promovendo a deposição de matriz extracelular e os outros efeitos biológicos do TGF- β . A forma activa de TGF- β representa uma proporção relativamente baixa do TGF- β que há no plasma. Assim, para que um anticorpo neutralizante contra TGF- β seja mais eficaz na prevenção da fibrose, o anticorpo deverá reconhecer a forma activa, mas não a forma latente. No Exemplo 6, demonstra-se que há um anticorpo ("IgG4 6B1") que reconhece a forma activa, mas não a latente, de TGF- β 2.

O epítopo de IgG4 6B1 foi identificado utilizando uma combinação de bibliotecas de exibição de péptidos e estudos de inibição, utilizando péptidos da região de TGF- β 2 identificados a partir do fago seleccionado a partir da



biblioteca de exibição de péptidos em fagos. Isto está descrito nos Exemplos 11 e 14. A sequência identificada a partir da biblioteca de péptidos é RVLSL e representa os aminoácidos 60 a 64 de TGF- β 2 (Exemplo 11). Também se verificou que o anticorpo IgG4 6B1 se liga a um péptido que corresponde aos aminoácidos 56 a 69 de TGF- β 2 (TQHSRVLSLYNTIN) com uma extensão de três aminoácidos (CGG) no terminal N. O RVLSL é o epítopo mínimo, é provável que o IgG4 6B1 se ligue a mais aminoácidos adjacentes. De facto, se o epítopo for tridimensional, poderão existir outras sequências não contíguas às quais o anticorpo se irá ligar. O IgG4 6B1 mostra uma ligação muito mais fraca ao péptido que corresponde aos aminoácidos 56 a 69 de TGF- β 1 (CGG-TQYSKV-LSLYNQHN).

Os resultados do Exemplo 14 suportam a hipótese de atribuir o epítopo de IgG4 6B1 no TGF- β 2 aos aminoácidos na região dos resíduos 60 a 64. O péptido utilizado neste exemplo, resíduos 56 a 69, corresponde aos aminoácidos da hélice alfa H3 (M.P. Schlunegger & M.G. Grutter, *Nature*, 358 430-434, 1992; também conhecida como hélice a3 (S. Daopin *et al.*, *Proteins:Structure, Function and Genetics*, 17 176-192, 1993). O TGF- β 2 forma um dímero cabeça-para-cauda com a hélice alfa H3 (também referido como calcanhar) de uma subunidade formando uma interface com regiões "finger" (incluindo os resíduos 24 a 37 e os resíduos na região dos aminoácidos 91 a 95; também referidos como "finger" 1 e 2) de outra subunidade (S. Daopin *et al.*, *supra*). Foi proposto que as características estruturais essenciais que interagem com o receptor de TGF- β 2, consistem nos aminoácidos da extremidade do terminal C da hélice alfa H3 de uma cadeia, juntamente com os resíduos dos "finger" 1 e 2 da outra cadeia (D.L. Griffith *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 878-883, 1996). A identificação de um epítopo para IgG4 6B1 na hélice alfa H3 de TGF- β 2 é consistente com o facto de o IgG4 6B1 impedir a ligação do receptor e neutralizar a actividade biológica de TGF- β 2.

Como referido acima, se o epítopo para IgG4 6B1 for tridimensional, poderão haver outros aminoácidos não contíguos aos quais o anticorpo se poderá ligar.

Há evidências anteriores que apontam no sentido de os anticorpos dirigidos contra esta região do TGF- β 2 poderem ser específicos para o TGF- β 2 e



neutralizar a sua actividade. Flanders *et al.*, (*Development*, 113 183-191, 1991) demonstraram que se podem criar anti-soros policlonais em coelhos, contra os resíduos 50 a 75 do TGF- β 2 maduro e que estes anticorpos reconhecem o TGF- β 2 mas não o TGF- β 1, em análise de transferência de Western. Num artigo anterior, K.C. Flanders *et al.*, (*Biochemistry* 27 739-746, 1988) demonstraram que os anti-soros policlonais produzidos em coelhos contra os aminoácidos 50 a 75 de TGF- β 1 podiam neutralizar a actividade biológica de TGF- β 1. O anticorpo isolado neste pedido, o IgG4 6B1, é um anticorpo humano dirigido contra os aminoácidos nesta região, que neutraliza a actividade biológica do TGF- β 2 humano. É surpreendente que este anticorpo neutralizante contra TGF- β 2 possa ser isolado em humanos (nos quais a imunização com um péptido não pode ser utilizada por razões éticas) directamente a partir de um repertório de exibição de anticorpos em fagos.

O conhecimento de que os resíduos da hélice alfa H3 formam um epítopo neutralizante para TGF- β 2 significa que se podem obter fagos que apresentam anticorpos neutralizantes, por selecção de repertórios de anticorpos em fagos, ligando a um péptido desta região acoplada a uma proteína transportadora, tal como albumina de soro bovino ou hemocianina de lapa do género *Fissurella*. Esta abordagem pode ser aplicada para seleccionar anticorpos que são capazes de neutralizar a actividade biológica de TGF- β 1, seleccionando o péptido TQYSKVLSLYNQHN acoplado à proteína transportadora. É possível que esta abordagem se possa estender a péptidos de regiões de ligação ao receptor de isoformas de TGF- β , que não a hélice alfa H3.

Os presentes inventores demonstraram também que os anticorpos específicos para TGF- β se podem obter por isolamento a partir de bibliotecas derivadas de diferentes fontes de genes de imunoglobulinas: de repertórios de domínios variáveis de imunoglobulinas naturais, *e.g.* a partir de hospedeiros imunizados ou não imunizados; e repertórios sintéticos derivados a partir de genes V da linha germinal, combinados com CDR3 sintéticos. Descrevem-se as propriedades destes anticorpos no formato Fv de uma só cadeia e IgG4 completa.

Como referido acima, em WO93/11236 sugeria-se que os anticorpos humanos dirigidos contra o TGF- β humano podiam ser isolados a partir de



bibliotecas de exibição em fagos. Demonstra-se aqui que as bibliotecas de exibição em fagos, a partir das quais os auto-anticorpos próprios eram isolados na WO93/11236, podem ser utilizados como uma fonte de anticorpos humanos, específicos para isoformas particulares de TGF- β . Por exemplo, no exemplo 1 do presente pedido, o anticorpo 1A-E5 específico para TGF- β 1 e os anticorpos 2A-H11 e 2A-A9 específicos para TGF- β 2 foram isolados a partir da "biblioteca sintética" descrita nos exemplos 5 a 7 da WO93/11236 e em Nissim *et al.*, (1994; *supra*). Além disso, a biblioteca de exibição em fagos, derivada de linfócitos de sangue periférico (PBL) de um humano não imunizado (exemplos 1 a 3 da WO93/11236), era a fonte de anticorpo 1B2 específico para TGF- β 1. As bibliotecas de exibição em fagos construídas subsequentemente, utilizando genes de anticorpos derivados a partir de amígdalas e medula óssea humanas, também proporcionaram fontes de anticorpos específicos para o TGF- β humano. Assim, o TGF- β humano é um exemplo de um auto-antigénio humano contra o qual se podem isolar anticorpos a partir de "bibliotecas universais de grandes dimensões". Podem-se obter anticorpos humanos contra o TGF- β humano com propriedades melhoradas por rearranjo de cadeias, por exemplo, combinando os domínios VH de anticorpos derivados a partir de uma biblioteca com os domínios VL de outra biblioteca, expandindo assim o conjunto de parceiros VL testados para cada domínio VH. Por exemplo, os anticorpos 6B1, 6A5 e 6H1 específicos para TGF- β 2 utilizam o domínio VH de 2A-H11 isolado a partir da "biblioteca sintética", combinado com uma cadeia leve da biblioteca de PBL.

Assim, os domínios VH e VL de anticorpos específicos para TGF- β podem ser obtidos a partir de bibliotecas de exibição em fagos, derivadas a partir de genes V rearranjados, tais como os de PBL, amígdalas e medula óssea e a partir de domínios V derivados a partir de segmentos V da linha germinal, clonados, combinados com CDR sintéticos. Também se verificou existir uma outra gama de anticorpos que são específicos para TGF- β 1 ou TGF- β 2. Os anticorpos que foram isolados, tanto contra TGF- β 1, como contra TGF- β 2, utilizaram essencialmente os genes V derivados a partir de linhas germinais de VH da família VH3. Utilizou-se uma maior variedade de regiões variáveis de cadeia leve, de ambos os tipos, lambda e capa.

Os anticorpos individuais que foram isolados apresentam propriedades inesperadamente vantajosas. Por exemplo, verificou-se que os anticorpos



dirigidos contra o TGF- β 2 (6H1, 6A5 e 6B1) se ligam ao TGF- β 2 com velocidades na dissociação lentas (constantes de velocidade na dissociação, k_{off} da ordem dos 10^{-3} s^{-1} e constantes de dissociação inferiores a 10^{-8}M) para neutralizar a actividade de TGF- β 2 em ensaios *in vitro* e são potentes em aplicações *in vivo*. Verificou-se que o anticorpo IgG4 6B1 se liga especificamente ao TGF- β 2 em imuno-histoquímica em tecidos de mamífero e que não reage de forma cruzada com outros抗ígenos em tecidos humanos. As propriedades destes anticorpos podem torná-los particularmente adequados para aplicações terapêuticas. O facto destes anticorpos partilharem a mesma cadeia pesada, mostra que os domínios VH podem ser eficazes com várias cadeias leves diferentes, embora possam existir diferenças na potência, ou alterações sutis de epítopo com cadeias leves diferentes. Como se pode ver nos Exemplos 3 e 4 e Tabelas 4 e 5, o IgG4 6B1 é o anticorpo mais potente em actividade neutralizante de TGF- β 2 no ensaio com radiorreceptores e no ensaio de proliferação de TF1. É expectável, no entanto, que as suas propriedades sejam qualitativamente semelhantes às dos anticorpos 6A5 e 6H1, com os quais partilha um domínio VH comum. Assim, seria de esperar que a redução na cicatriz neural observada no tratamento com Fv de uma só cadeia 6A5 e IgG4 6H1, apresentada no Exemplo 5, fosse reproduzida pelo 6B1. Os anticorpos dirigidos contra TGF- β 1 (em particular o 1B2 e seus derivados) têm também propriedades inesperadamente vantajosas. Verificou-se que o anticorpo 27C1/10A6 derivado de 1B2 por rearranjo de cadeias ("shuffle"), "picagem" ("spiking") e conversão no anticorpo IgG4 completo é potente num modelo de cicatriz *in vitro*. O domínio VH deste anticorpo foi derivado por mutagénese de "picagem" dirigida para um local, a partir do anticorpo progenitor 7A3. Obteve-se um número elevado de clones "picados" que apresentam propriedades semelhantes em ensaios *in vitro*. Poderão haver várias alterações no CDR3 da VH, em comparação com o 27C1, por exemplo, o 28A-H11 difere em 7 das 14 posições, 2 das quais são alterações não conservativas. Assim, poderão haver até 50% de resíduos alterados no CDR3 de VH, sem afectar as propriedades de ligação.

Verificou-se que os anticorpos específicos para o TGF- β 1 humano e TGF- β 2 humano são eficazes em modelos animais para o tratamento de doenças fibróticas e outras doenças, como a artrite reumatóide, em que o TGF- β é sobre-expresso. Verificou-se que os anticorpos contra TGF- β são eficazes no



tratamento da glomerulonefrite (W.A. Border *et al.*, *Nature* 346, 371-374, 1990); cicatriz neural (A. Logan *et al.*, *Eur J. Neurosci.* 6, 355-363, 1994); cicatriz dérmica (M. Shah *et al.*, *Lancet* 339, 213-214 1992; M. Shah *et al.*, *J. Cell Science* 107, 1137-1157, 1994; M. Shah *et al.*, 108, 985-1002, 1995); fibrose pulmonar (S. N. Giri *et al.*, *Thorax* 48, 959-966, 1993); lesão arterial (Y.G. Wolf, L.M. Rasmussen & E. Ruoslahti *J. Clin. Invest.* 93, 1172-1178, 1994) e artrite reumatóide (Wahl *et al.*, *J. Exp. Medicine* 177, 225-230, 1993). Foi sugerido que o TGF- β 3 actua de forma antagónica ao TGF- β 1 e TGF- β 2 na cicatriz dérmica (M. Shah *et al.*, 1995, *supra*). Deste modo, os anticorpos contra TGF- β 1 ou TGF- β 2 com reactividade cruzada baixa, aparente, com TGF- β 3, tal como determinado por estudos de ligação utilizando um ensaio com biossensores (*e.g.* BIACore™), ELISA ou com radiorreceptores, como descrito no presente pedido, ou seja, anticorpos que se ligam preferencialmente a TGF- β 1 ou TGF- β 2, em comparação com TGF- β 3, deverão ser vantajosos nestas ou noutras condições, como condições fibróticas, em que é desejável contrariar os efeitos de promoção de fibrose de TGF- β 1 e TGF- β 2. Um anticorpo que reage de forma cruzada forte com TGF- β 3 teve, no entanto, efeito num modelo animal de artrite reumatóide (Wahl *et al.*, 1993, *supra*).

É provável que haja outras aplicações além das condições acima mencionadas, uma vez que há outros modelos de doenças *in vitro*, em que se verificou que os anticorpos contra o TGF- β têm uma eficácia terapêutica promissora. De importância particular poderá ser a utilização de anticorpos contra TGF- β no tratamento de doenças dos olhos que envolvem fibrose ocular, incluindo a retinopatia proliferativa (R.A. Pena *et al.*, (ref. a seguir), descolamento da retina e pós-cirurgia de drenagem de glaucoma (P.T. Khaw *et al.*, *Eye* 8 188-195, 1994). Connor *et al.*, (*J. Clin. Invest.* 83 1661-1666, 1989) mostraram que estavam presentes níveis muito maiores de TGF- β 2 em aspirados vítreos de pacientes com fibrose intra-ocular associada a retinopatia proliferativa, em comparação com pacientes com descolamento de retina sem complicações, sem fibrose ocular, e que a actividade biológica deste TGF- β 2 podia ser neutralizada com anticorpos dirigidos contra TGF- β 2. Além disso, Pena *et al.*, (*Invest. Ophthalmology. Vis. Sci.* 35:2804-2808, 1994) mostraram que os anticorpos contra TGF- β 2 inibem a contracção do colagénio estimulada pelo TGF- β 2. A contracção do gel vítreo pelos fibroblastos e outros tipos de



células tem um papel crítico no processo da doença de retinopatia proliferativa, um processo que se pensa ser mediado pelo TGF-β2.

Existem outras evidências que apontam no sentido de o TGF-β2 ser a isoforma de TGF-β mais importante que promove a fibrose intra-ocular. Verificou-se que o TGF-β2 é a isoforma de TGF-β predominante na retina neural, no pigmento retinal do epitélio coroide e vítreo do olho humano (Pfeffer *et al.*, *Exp. Eye Res.* 59:323-333, 1994) e que se encontra no humor aquoso humano em olhos submetidos a extração de cataratas com implantação de lentes intra-oculares (Jampel *et al.*, *Current Eye Research* 9:963-969, 1990). As células epiteliais do pigmento retinal humano, não transformadas, segregam predominantemente TGF-β2 (Kvanta *Ophthalmic Res.* 26:361-367, 1994).

Outras doenças que têm potencial para o tratamento com anticorpos contra TGF-β incluem síndrome da dificuldade respiratória do adulto, cirrose do fígado, pós-enfarte do miocárdio, pós-estenose recidiva angioplástica, cicatrizes quelóides e esclerodermia. O nível aumentado de expressão de TGF-β2 na osteoporose (Erlenbacher *et al.*, *J. Cell Biol.* 132:195-210, 1996) significa que esta é uma doença potencialmente tratável por anticorpos dirigidos contra o TGF-β2.

A utilização de anticorpos contra TGF-β para o tratamento de doenças tem sido objecto de pedidos de patente para doenças fibróticas (WO91/04748); cicatriz dérmica (WO92/17206); doenças de deficiência de macrófagos (PCT/US93/00998); infecções patogénicas de macrófagos (PCT/US93/02017); cicatriz neural (PCT/US93/03068); desordens vasculares (PCT/US93/03795); prevenção de cataratas (WO95/13827). Os anticorpos humanos contra o TGF-β humano descritos neste pedido deverão ser valiosos nestas condições.

Demonstra-se aqui que os anticorpos humanos, quer contra o TGF-β1 humano, quer contra o TGF-β2 humano podem ser eficazes no tratamento de fibrose em modelos animais de cicatriz neural e glomerulonefrite, quer no formato de Fv de uma só cadeia, quer no formato de anticorpo completo. Esta constitui a primeira descrição da eficácia de anticorpos dirigidos apenas contra TGF-β2, como tratamento único nestas indicações, embora se tenha observado alguma eficácia de anticorpos apenas contra TGF-β2 num modelo de fibrose



pulmonar (Giri *et al.*, *Thorax* 48, 959-966, 1993, *supra*). A eficácia dos anticorpos humanos contra o TGF- β humano no tratamento da doença fibrótica foi determinado medindo um decréscimo na acumulação de componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina e laminina em modelos animais.

A evidência da eficácia dos anticorpos contra TGF- β 2 e TGF- β 1 aqui descrita na prevenção da cicatriz neural na experiência no modelo animal significa que estes anticorpos são provavelmente eficazes noutros estados de doença mediados pelo TGF- β . Para comparação, verificou-se que anti-soros isolados de peru, dirigidos contra isoformas de TGF- β , por Danielpour *et al.*, (*Cell Physiol.* 138:79-86, 1989) são eficazes na prevenção da cicatriz dérmica (Shah *et al.*, *J. Cell Science* 108:985-1002, 1995), cicatriz neural (Logan *et al.*, *supra*) e experiências *in vitro* relacionadas com a retinopatia proliferativa (Connor *et al.*, *supra*).

TERMINOLOGIA

Membro de ligação específica

Esta expressão descreve um membro de um par de moléculas que têm especificidade de ligação uma para a outra. Os membros de um par de ligação específica podem derivar de fontes naturais, ou ser total, ou parcialmente, produzidos de forma sintética. Um dos membros do par de moléculas tem uma área na sua superfície, ou uma cavidade, que se liga especificamente, e é portanto complementar, a uma organização espacial e polar particular, do outro membro do par de moléculas. Assim, os membros do par têm a propriedade de se ligar especificamente um ao outro. Exemplos de tipos de pares de ligação específica são antigénio-anticorpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-substrato. Este pedido refere-se às reacções do tipo antigénio-anticorpo.

Anticorpo

Este termo descreve uma imunoglobulina quer natural, quer produzida total ou parcialmente de forma sintética. O termo também inclui qualquer polipeptídeo ou proteína com um domínio de ligação que é, ou é homólogo a, um



domínio de ligação de anticorpo. Estes podem derivar de fontes naturais, ou podem ser parcial ou totalmente produzidos de forma sintética. Exemplos de anticorpos são os isotipos de imunoglobulinas e as suas subclasses isotípicas; fragmentos que compreendem um domínio de ligação a抗原, como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd e "diacorpos" ("diobody").

É possível tomar anticorpos monoclonais e outros anticorpos e utilizar técnicas de tecnologia de ADN recombinante para produzir outros anticorpos, ou moléculas quiméricas que retêm a especificidade do anticorpo original. Estas técnicas poderão envolver a introdução de ADN que codifica para a região variável da imunoglobulina, ou regiões determinantes de complementaridade (CDR) de um anticorpo, nas regiões constantes ou regiões constantes mais regiões de estrutura de uma imunoglobulina diferente. Veja-se, por exemplo EP-A-184187, GB2188638A ou EP-A-239400. Um hibridoma, ou outra célula que produz um anticorpo podem ser submetidos a mutação genética, ou outras alterações, que podem ou não alterar a especificidade de ligação dos anticorpos produzidos.

Uma vez que os anticorpos podem ser modificados de várias maneiras, o termo "anticorpo" deverá ser entendido como abrangendo qualquer membro ou substância de ligação específica, possuindo um domínio de ligação com a especificidade necessária. Assim, este termo inclui fragmentos de anticorpo, derivados, equivalentes funcionais e homólogos de anticorpos, incluindo qualquer polipeptídeo que compreenda um domínio de ligação de imunoglobulina, quer natural, quer total ou parcialmente sintético. Incluem-se, portanto, as moléculas quiméricas que compreendem um domínio de ligação de imunoglobulina, ou equivalente, fundidas com outro polipeptídeo. A clonagem e expressão de anticorpos quiméricos são descritas em EP-A-0120694 e EP-A-0125023.

Verificou-se que fragmentos de um anticorpo completo podem realizar a função de抗原 de ligação. Exemplos de fragmentos de ligação são (i) o fragmento Fab que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) o fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CH1; (iii) o fragmento Fv que consiste nos domínios VL e VH ou um único anticorpo; (iv) o fragmento dAb (Ward, E.S. et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)) que consiste num domínio VH; (v) regiões CDR isoladas; (vi) fragmentos F(ab')2, um fragmento bivalente que compreende



dois fragmentos Fab ligados (vii) moléculas Fv de uma só cadeia (scFv), em que um domínio VH e um domínio VL estão ligados por um ligante peptídico, que permite que os dois domínios se associem para formar um local de ligação a抗ígeno (Bird *et al.*, *Science* **242**, 423-426, 1988; Huston *et al.*, *PNAS USA*, **85**, 5879-5883, 1988); (viii) dímeros Fv de uma só cadeia biespecíficos (PCT/US92/09965) e (ix) "diacorpos", fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos por fusão de genes (WO94/13804; P. Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** 6444-6448, 1993).

Os "diacorpos" são multímeros de polipéptidos, em que cada polipéptido compreende um primeiro domínio que compreende uma região de ligação de uma cadeia leve de imunoglobulina e um segundo domínio, que compreende uma região de ligação de uma cadeia pesada de imunoglobulina, estando os dois domínios ligados (*e.g.* por um ligante peptídico), mas incapazes de se associar um com o outro para formar um local de ligação a um抗ígeno: os locais de ligação ao抗ígeno são formados por associação do primeiro domínio de um polipéptido do multímero, com o segundo domínio de outro polipéptido dentro do multímero (WO94/13804).

Quando se pretende utilizar anticorpos biespecíficos, estes podem ser anticorpos biespecíficos convencionais, que podem ser produzidos de uma variedade de modos (Holliger, P. e Winter G., *Current Opinion Biotechnol.*, **4**, 446-449 (1993)), *e.g.* preparados quimicamente, ou a partir de hibridomas híbridos, ou podem ser quaisquer dos fragmentos de anticorpos biespecíficos acima mencionados. Poderá ser preferível utilizar dímeros de scFv ou "diacorpos" em vez de anticorpos completos. Os "diacorpos" e os scFv podem ser construídos sem uma região Fc, utilizando apenas domínios variáveis, reduzindo potencialmente os efeitos de reacção anti-idiotípica. Outras formas de anticorpos biespecíficos incluem os "Janusins" de uma só cadeia descritos em Traunecker *et al.*, *Embo Journal*, **10**, 3655-3659, (1991).

Os "diacorpos" biespecíficos, ao contrário dos anticorpos completos biespecíficos, poderão ser também particularmente úteis, uma vez que podem ser facilmente construídos e expressos em *E. coli*. Podem-se seleccionar facilmente "diacorpos" (e muitos outros polipéptidos, tais como fragmentos de anticorpo) com especificidades de ligação adequadas, utilizando exibição em fagos (WO94/13804) em bibliotecas. Se um dos braços de um "diacorpo" deve



ser mantido constante, por exemplo com uma especificidade dirigida contra um抗igeno X, então pode-se construir uma biblioteca em que o outro braço varia, seleccionando-se um anticorpo com a especificidade adequada.

Domínio de ligação ao抗igeno

Esta expressão descreve a parte de um anticorpo que comprehende a área que se liga especificamente, e é complementar a parte, ou à totalidade de um抗igeno. Quando o抗igeno é grande, um anticorpo só se pode ligar a uma parte particular do抗igeno a qual se designa por epítopo. Um domínio de ligação a um抗igeno pode ser constituído por um ou mais domínios variáveis de anticorpo. De preferência, um domínio de ligação ao抗igeno comprehende uma região variável de cadeia leve de um anticorpo (VL) e uma região variável de cadeia pesada de um anticorpo (VH)

Especifico

Este termo pode ser utilizado para referir a situação em que um membro de um par de ligação específica não apresenta nenhuma ligação significativa a outras moléculas, além do(s) seu(s) parceiro(s) de ligação específica. O termo também é aplicável ao caso em que, e.g., um domínio de ligação ao抗igeno é específico para um epítopo particular, que é transportado por vários抗igenos, caso em que o membro de ligação específica que transporta o domínio de ligação ao抗igeno será capaz de se ligar a vários抗igenos que transportam o epítopo.

Neutralização

Este termo refere-se à situação em que a ligação de uma molécula a outra molécula resulta na anulação ou inibição da função biológica efectora da outra molécula.

Pode-se obter uma variante, um derivado ou um mutante de um anticorpo por modificação da molécula progenitora, por adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos, ou por ligação de outra molécula. Estas alterações podem ser realizadas ao nível do nucleótido ou da proteína. Por exemplo, o polipeptídeo codificado pode ser um fragmento Fab que é então



ligado a uma cauda Fc de outra fonte. Alternativamente, pode-se ligar um marcador, como uma enzima, fluoresceína, etc.

Compreender

Este termo é geralmente utilizado no sentido de incluir, isto é permitir a presença de uma ou mais características ou componentes.

O presente invento proporciona, de um modo geral, um membro de ligação específica que compreende um domínio de ligação ao抗énio de um anticorpo humano. Mais particularmente, proporciona um membro de ligação específica para o TGF- β 1 humano.

O presente invento proporciona um membro de ligação específica, que compreende um domínio de ligação ao抗énio de um anticorpo humano, específico para TGF- β 1, e que tem uma reactividade cruzada baixa com o TGF- β 3. A reactividade cruzada pode ser determinada utilizando qualquer um dos ensaios seguintes: com biossensores (*e.g.* BIACoreTM), ELISA e com radiorreceptores. O presente invento proporciona um membro de ligação específica que compreende um domínio de ligação ao抗énio, de um anticorpo humano, específico para o TGF- β 1 humano, que se liga preferencialmente a estas isoformas, em comparação com TGF- β 3.

O membro de ligação específica pode ser na forma de um fragmento de anticorpo como um Fv de uma só cadeia (scFv). Podem-se também utilizar outros tipos de fragmentos de anticorpo, como Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Facb ou um "diacorpo" (G.Winter & C. Milstein *Nature* 349, 293-299, 1991; WO94/13804). O membro de ligação específica pode existir na forma de um anticorpo completo. O anticorpo completo pode existir em qualquer das formas de isotipos de anticorpo, *e.g.* IgG, IgA, IgE e IgM e qualquer das formas das subclasses dos isotipos, IgG1 ou IgG4.

O membro de ligação específica pode ser também na forma de um anticorpo manipulado, *e.g.* moléculas de anticorpo biespecíficas (ou fragmentos como F(ab')₂), que têm um braço de ligação a um抗énio (i.e. um domínio de ligação específica) contra o TGF- β e outro braço contra uma especificidade



diferente. De facto, os membros de ligação específica dirigidos contra o TGF- β 1 e/ou o TGF- β 2 aqui descritos podem ser combinados num formato de "diacorpo" biespecífico. Por exemplo, os anticorpos 31G9 dirigido contra o TGF- β 1 e 6H1 dirigido contra o TGF- β 2 podem ser combinados para originar uma molécula dimérica única, com ambas as especificidades.

O domínio de ligação pode compreender parte ou todo um domínio VH codificado por um segmento de gene da linha germinal, ou um segmento de gene rearranjado. O domínio de ligação pode compreender parte ou a totalidade quer de um domínio VL capa, quer de um domínio VL lambda.

O domínio de ligação pode ser codificado por uma forma alterada ou variante de um gene de uma linha germinal, com uma ou mais alterações de nucleótidos (adição, deleção, substituição e/ou inserção), e.g. cerca de, ou menos de 25, 20, 15, 10 ou 5 alterações, 4, 3, 2, ou 1, que podem ser numa ou mais estruturas e/ou CDR.

O domínio de ligação pode compreender uma sequência de gene VH3 de uma das seguintes linhas germinais; a linha germinal DP49; a linha germinal DP53; a linha germinal DP50; a linha germinal DP46, ou uma forma sua derivada rearranjada.

Um domínio VH preferido para os membros de ligação específica anti-TGF- β 2 de acordo com o presente invento é o VH de 6H1, cuja sequência é apresentada na Figura 2(a) (i). O 6H1 pode ser emparelhado com uma variedade de domínios VL, como aqui exemplificado. Podem-se utilizar variantes da sequência de aminoácidos de VH de 6H1.

O membro de ligação específica neutraliza o efeito de TGF- β 1 *in vitro* e/ou *in vivo*.

O membro de ligação específica pode ser um anticorpo de afinidade elevada. As afinidades preferidas são discutidas mais à frente.

O domínio de ligação pode compreender um domínio VH possuindo uma sequência de aminoácidos como apresentada na Fig 1(a)(i) ou (ii) ou Fig 1(c)(i).



O domínio de ligação pode compreender um domínio VH codificado por uma sequência de nucleótidos como apresentada na Fig 1(a)(i) ou (ii) ou Fig 1(c)(i).

O domínio de ligação pode compreender um domínio VL, com uma sequência de aminoácidos como apresentada na Fig 1(a)(iii) ou Fig 1(b).

O domínio de ligação pode compreender um domínio VL codificado por uma sequência de nucleótidos como apresentada na Fig 1(a)(iii) ou Fig 1(b).

O domínio de ligação pode compreender parte ou todo um domínio VH, possuindo uma forma variante dos aminoácidos da Fig 1(a)(i), sendo a forma variante uma das apresentadas na Fig. 3.

O membro de ligação específica pode ser na forma de scFv.

O domínio de ligação a um抗ígeno, de um anticorpo humano, pode compreender um ou mais CDR (regiões determinantes de complementaridade), com uma sequência de aminoácidos apresentada em quaisquer das Figuras. Numa concretização preferida, o domínio de ligação compreende um ou mais dos CDR, CDR1, CDR2, e/ou CDR3 apresentados nas Figuras. Numa concretização preferida, o domínio de ligação compreende uma sequência CDR3 de VH como apresentada. O membro de ligação específica pode compreender toda, ou uma parte das regiões de estrutura apresentadas, que flanqueiam e estão entre os CDR, nas Figuras, ou diferentes regiões de estrutura, incluindo versões modificadas das apresentadas.

O designado "enxerto de CDR", em que uma ou mais sequências de CDR de um primeiro anticorpo são colocadas numa estrutura de sequências que não são desse anticorpo, e.g. de outro anticorpo, é descrito em EP-B-0239400.

Um membro de ligação específica que compreende um domínio de ligação a抗ígeno, de um anticorpo humano, de acordo com a invenção, pode ser um membro que compete para a ligação ao TGF- β 1 humano com qualquer membro de ligação específica de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 3. A competição entre os membros de ligação pode ser determinada facilmente *in vitro*, por exemplo, dirigindo uma molécula repórter específica para um membro



de ligação, a qual pode ser detectada na presença de outro(s) membro(s) de ligação não marcados, para permitir a identificação de membros de ligação específica que se ligam ao mesmo epítopo, ou a um epitopo sobreponível.

Os membros de ligação específica preferidos para TGF- β 1 competem para a ligação ao TGF- β 1 com o anticorpo CS37, discutido em maior pormenor mais à frente.

Os membros de ligação específica para TGF- β 2 competem para a ligação ao TGF- β 2 com o anticorpo 6B1 discutido em maior pormenor mais à frente. Podem-se ligar ao epítopo RVLSL ou a um péptido que compreende a sequência de aminoácidos RVLSL, particularmente a um péptido que adopta uma conformação de hélice- α . Podem-se ligar ao péptido TQHSRVLSLYNTIN. Para testar este facto, pode-se utilizar um péptido com esta sequência mais CGG no terminal N. Os membros de ligação específica podem ser tais que a sua ligação ao TGF- β 2 é inibida por um péptido que compreende RVLSL, tal como um péptido com a sequência TQHSRVLSLYNTIN. Para testar este facto, pode-se utilizar um péptido com esta sequência, mais CGG no terminal N.

A sequência TQHSRVLSLYNTIN corresponde à hélice alfa H3 (resíduos 56-69) de TGF- β 2, como aqui se discute noutra secção. A região equivalente no TGF- β 1 tem a sequência TQYSKVLSLYNQHN. Os anticorpos anti-TGF- β 1 que se ligam a esta região são de interesse particular para o presente invento e podem ser obtidos por exemplo, por prospecção de um péptido com esta sequência (ou com CGG no terminal N) contra uma biblioteca de exibição em fagos. Os membros de ligação específica que se ligam ao péptido podem ser seleccionados através da sua ligação e podem ser neutralizados quanto à actividade de TGF- β 1. A ligação destes membros de ligação específica ao TGF- β 1 pode ser inibida pelo péptido TQYSKVLSLYNQHN (opcionalmente com CGG no terminal N).

Um membro de ligação específica que é específico para TGF- β 2 poderá não apresentar nenhuma, ou substancialmente nenhuma ligação à forma latente de TGF- β 2, i.e. pode ser específico para a forma activa de TGF- β 2. No Exemplo 6 demonstra-se que o 6B1 tem esta propriedade.



O 6B1 é particularmente adequado para utilização terapêutica no tratamento de desordens fibróticas, por ter as seguintes propriedades vantajosas. O 6B1 liga-se ao TGF- β 2 com uma constante de dissociação de 2,3 nM, na forma de uma só cadeia e de 0,89 nM na forma de anticorpo completo, IgG4 6B1 (Exemplo 13). O anticorpo IgG4 6B1 neutraliza a actividade biológica do TGF- β 2 num ensaio anti-proliferação (IC_{50} 2 nM; exemplos 7 e 10) e num ensaio com radiorreceptores (IC_{50} inferior a 1 nM; Tabela 6). O anticorpo liga-se ao péptido TQHSRVLSTYNTIN (TGF- β 2₅₆₋₆₉) da hélice alfa H3 de TGF- β 2 e reconhece o péptido correspondente de TGF- β 1, de forma mais fraca. O 6B1 reconhece a forma activa, mas não a latente, de TGF- β 2 (Exemplo 6), reconhece o TGF- β 2 em tecidos de mamífero por ICC e não se liga de forma não específica a outros tecidos humanos (Exemplo 12). O anticorpo liga-se preferencialmente a TGF- β 2, em comparação com TGF- β 3, sendo a reactividade cruzada com TGF- β 3 de 9%, determinada pela razão das constantes de dissociação.

Os outros anticorpos descritos neste pedido, que contêm o domínio VH de 6H1, 6H1 e 6H5, têm propriedades semelhantes. As constantes de dissociação foram determinadas como sendo de 2 nM para IgG4 6B1 (Exemplo 2) e 0,7 nM para Fv de uma só cadeia de 6A5 (Tabela 1). O IgG4 6H1 neutraliza a actividade biológica de TGF- β 2 com valores de IC_{50} de 12 a 15 nM (Exemplos 7 e 10). O 6A5 e o 6H1 inibem a ligação ao receptor do TGF- β 2 num ensaio com radiorreceptores com valores de IC_{50} de cerca de 1 nM no formato de Fv de uma só cadeia e de 10 nM, ou menos, no formato de anticorpo completo, IgG4. Verificou-se que tanto o IgG4 6H1 como o scFv 6A5 eram eficazes na prevenção de cicatriz neural (Exemplo 5).

Para os anticorpos contra TGF- β 1, as propriedades desejadas para que um anticorpo seja eficaz no tratamento de doenças fibróticas são semelhantes. Estes anticorpos neutralizam o TGF- β 1 e têm uma constante de dissociação para TGF- β 1 inferior a cerca de 100 nM, mais preferencialmente, inferior a cerca de 10 nM, mais preferencialmente inferior a cerca de 5 nM. Os anticorpos ligam-se preferencialmente ao TGF- β 1, em relação ao TGF- β 3, têm preferivelmente uma reactividade cruzada com o TGF- β 3 inferior a cerca de 20% (tal como medido pela razão entre as constantes de dissociação) e mais preferivelmente têm menos de cerca de 10% de reactividade cruzada. O



anticorpo reconhece preferencialmente a forma activa, mas não a forma latente, de TGF- β 1. O anticorpo 31G9 tem uma constante de dissociação de 12 nM (Tabela 5). Os anticorpos scFv CS37 e IgG4 27C1/10A6 apresentam valores de IC₅₀, num ensaio com radiorreceptores, de 8 nM e 9 nM, respectivamente, indicando uma constante de dissociação na gama nanomolar inferior. Verificou-se que o IgG4 27C1/10A6 é eficaz num modelo de cicatriz neural. A reactividade cruzada de anticorpos da linha de 1B2 com o TGF- β 3 é muito baixa (Exemplo 9).

Para além de uma sequência de anticorpo, o membro de ligação específica pode compreender outros aminoácidos, e.g. formando um péptido ou polipéptido, ou para conferir à molécula outra característica funcional além da capacidade para se ligar ao抗原. Por exemplo, o membro de ligação específica pode compreender um marcador, uma enzima ou um seu fragmento e semelhantes.

O presente invento proporciona também um polinucleótido que codifica para um membro de ligação específica de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 11.

O presente invento também proporciona construções na forma de plasmídeos, vectores, cassetes de transcrição ou de expressão, que compreendem pelo menos um polinucleótido, como acima descrito.

O presente invento proporciona também uma célula hospedeira recombinante, que compreende uma ou mais construções acima descritas.

Um membro de ligação específica de acordo com o invento pode ser produzido a partir da expressão do ácido nucleico codificante. O ácido nucleico que codifica para qualquer membro de ligação específica, constitui ele próprio, como proporcionado, um aspecto do presente invento, tal como o é também um método para a produção do membro de ligação específica, o qual compreende a expressão a partir do ácido nucleico codificante correspondente. A expressão pode ser conseguida, de forma conveniente, através da cultura sob condições adequadas, de células hospedeiras recombinantes que contêm o ácido nucleico. Após a produção, por expressão, pode-se isolar e/ou purificar um membro de



ligação específica, utilizando qualquer técnica adequada, e utilizar como apropriado.

Os membros de ligação específica e moléculas de ácido nucleico codificantes e vectores de acordo com o presente invento podem ser proporcionados isolados e/ou purificados, *e.g.* a partir do seu meio natural, na forma substancialmente pura ou homogénea ou, no caso do ácido nucleico, isentos ou substancialmente isentos de ácidos nucleicos ou genes, de outra origem que não a sequência que codifica para um polipéptido com a função pretendida. O ácido nucleico de acordo com o presente invento pode compreender ADN ou ARN e podem ser total ou parcialmente sintéticos. O termo "isolado" inclui todas estas possibilidades.

O ácido nucleico pode codificar para qualquer das sequências de aminoácidos apresentadas em quaisquer das Figuras, ou para qualquer forma funcionalmente equivalente. As sequências nucleotídicas utilizadas podem ser quaisquer das apresentadas nas Figuras, ou podem ser uma sua variante, um seu alelo ou um seu derivado. As alterações podem ser feitas ao nível dos nucleótidos, por adição, substituição, deleção ou inserção de um ou mais nucleótidos, alterações estas que podem ser ou não reflectidas ao nível dos aminoácidos, dependendo da degenerescência do código genético.

São bem conhecidos os sistemas para a clonagem e expressão de um polipéptido numa variedade de células hospedeiras diferentes. As células hospedeiras adequadas incluem bactérias, células de mamífero, sistemas de leveduras e de baculovírus. As linhas de células de mamífero disponíveis na arte para a expressão de um polipéptido heterólogo incluem células de ovário de *hamster* chinês, células HeLa, células de rim de *hamster* bebé e muitas outras. Um hospedeiro bacteriano, comum, preferido é a *E. coli*.

A expressão de anticorpos e fragmentos de anticorpo em células procarióticas como a *E. coli* está bem estabelecida na arte. Para revisão, veja-se, por exemplo, Plückthun, A., *Bio/Technology*, 9:545-551 (1991). A expressão em células eucarióticas em cultura está também disponível aos peritos na arte como uma opção para a produção de um membro de ligação específica, veja-se para revisão recente, por exemplo, Reff, M.E. (1993) *Curr.*



Opinion Biotech. 4:573-576; Trill J.J. et al., (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6:553-560.

Podem-se seleccionar, ou construir, os vectores adequados, que contêm as sequências reguladoras adequadas, incluindo sequências promotoras, sequências terminadoras, sequências de poliadenilação, sequências potenciadoras, genes marcadores e outras sequências, conforme adequado. Os vectores podem ser plasmídeos, vírus, e.g. fagos ou fagemídeos, como adequado. Para mais pormenores veja-se, por exemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2^a edição, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muitas das técnicas e protocolos conhecidos para a manipulação de ácidos nucleicos, por exemplo na preparação de construções de ácido nucleico, mutagénese, sequenciação, introdução de ADN nas células e expressão génica e análise de proteínas, estão descritos em pormenor em *Short Protocols in Molecular Biology*, segunda edição, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992. As descrições de Sambrook et al., e Ausubel et al., são aqui incorporadas para referência.

Deste modo, num outro aspecto, o presente invento proporciona uma célula hospedeira contendo um ácido nucleico como aqui descrito. Ainda num outro aspecto, proporciona um método que compreende a introdução deste ácido nucleico numa célula hospedeira. A introdução pode utilizar qualquer técnica disponível. Para células eucarióticas, as técnicas adequadas podem incluir transfecção com fosfato de cálcio, DEAE-dextrano, electroporação, transfecção mediada por lipossomas e transdução utilizando retrovírus ou outros vírus, e.g. vacinia ou, para células de insecto, baculovírus. Para as células bacterianas, as técnicas adequadas podem incluir transformação com cloreto de cálcio, electroporação e transfecção utilizando um bacteriófago.

A introdução pode ser seguida por provocar ou permitir a expressão do ácido nucleico, e.g., através da cultura das células hospedeiras sob condições para a expressão do gene.

Numa concretização, o ácido nucleico de acordo com o invento é integrado no genoma (e.g. cromossoma) da célula hospedeira. A integração pode ser promovida pela inclusão de sequências que promovem a recombinação com o genoma, de acordo com técnicas convencionais.



O presente invento proporciona também um método que compreende a utilização de uma construção como acima descrita, num sistema de expressão, de modo a expressar um membro de ligação específica ou polipéptido, como acima.

Após a produção de um membro de ligação específica, este pode ser utilizado, por exemplo, de qualquer dos modos aqui descritos, tais como na formulação de uma composição, produto farmacêutico ou produto de diagnóstico, tal como um estojo, que compreende, além do membro de ligação específica, um ou mais reagentes para determinar a ligação do membro às células, como discutido. Uma composição pode compreender pelo menos um componente, para além do membro de ligação específica.

O presente invento proporciona também produtos farmacêuticos que compreendem um membro de ligação específica como acima, opcionalmente com um, ou mais excipientes.

O presente invento proporciona também a utilização de um membro de ligação específica como acima, para a preparação de um medicamento para tratar uma condição em que é vantajoso contrariar os efeitos de promoção de fibrose de TGF- β . A condição pode ser uma condição fibrótica caracterizada por uma acumulação de componentes da matriz extracelular num tecido. Os componentes da matriz extracelular podem ser fibronectina ou laminina.

A condição pode ser seleccionada do grupo constituído por: glomerulonefrite, cicatriz neural, cicatriz dérmica, cicatriz ocular, fibrose pulmonar, lesão arterial, retinopatia proliferativa, descolamento da retina, síndrome da dificuldade respiratória do adulto, cirrose do fígado, pós-enfarre do miocárdio, pós-estenose recidiva angioplástica, cicatriz quelóide, esclerodermia, desordens vasculares, cataratas, glaucoma, retinopatia proliferativa.

A condição pode ser a cicatriz neural ou glomerulonefrite.

O presente invento proporciona também a utilização de um membro de ligação específica como acima, para a preparação de um medicamento para tratar uma condição de doença imunitária/inflamatória, em que é vantajoso



contrariar os efeitos do TGF- β . Exemplos de condições são a artrite reumatóide, doenças de deficiência de macrófagos e infecção patogénica de macrófagos.

O presente invento proporciona também um método que compreende administrar a um paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um membro de ligação específica como acima, para tratar uma condição em que é vantajoso contrariar os efeitos de promoção de fibrose do TGF- β . As condições fibróticas são enumeradas acima.

O presente invento proporciona também um método que compreende a administração a um paciente, de uma quantidade profilacticamente eficaz de um membro de ligação específica como acima, para prevenir uma condição em que é vantajoso impedir os efeitos de promoção de fibrose do TGF- β . As condições fibróticas são enumeradas acima.

O presente invento proporciona também métodos que compreendem a administração a pacientes, de quantidades profilática e/ou terapeuticamente eficazes de um membro de ligação específica como acima, de modo a impedir ou tratar uma condição de doença imunitária/inflamatória, em que é vantajoso contrariar os efeitos do TGF- β . Os exemplos destas condições são enumerados acima.

Assim, em vários aspectos, o invento proporciona métodos de tratamento que compreendem a administração de um membro de ligação específica, composições farmacêuticas que compreendem esse membro de ligação específica e a utilização desse membro de ligação específica no fabrico de um medicamento, para administração, por exemplo, num método de produção de um medicamento, ou composição farmacêutica, que compreende a formulação do membro de ligação específica com um excipiente farmaceuticamente aceitável.

De acordo com o presente invento, as composições proporcionadas podem ser administradas a indivíduos que podem ser qualquer mamífero, em particular um roedor, *e.g.* um ratinho, cavalo, porco, ovelha, cabra, gado vacum, cão, gato ou humano. A administração é de preferência numa "quantidade terapeuticamente eficaz", sendo esta suficiente para ser benéfica



para o paciente. Este benefício pode ser pelo menos a melhoria de pelo menos um sintoma. A quantidade efectiva administrada e a taxa e período de tempo de administração dependerão da *Natureza* e gravidade do que está a ser tratado. A prescrição de tratamento, *e.g.* decisões sobre a dosagem etc, é da responsabilidade dos médicos de clínica geral e outros médicos. As doses adequadas de anticorpo são bem conhecidas na arte; veja-se Lederman J.A. et al., (1991) *Int J. Cancer* 47:659-664; Bagshawe K.D. et al., (1991). *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4:915-922.

Uma composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, quer em simultâneo, quer sequencialmente, dependendo da condição a ser tratada.

As composições farmacêuticas de acordo com o presente invento e para utilização de acordo com o presente invento podem compreender, além do ingrediente activo, um excipiente, transportador, tampão, estabilizante, ou outros materiais, farmaceuticamente aceitáveis, bem conhecidos dos peritos na arte. Estes materiais não deverão ser tóxicos e não deverão interferir com a eficácia do ingrediente activo. A *Natureza* precisa do transportador, ou outro material, dependerá da via de administração, que pode ser oral ou por injecção, *e.g.* intravenosa.

As composições farmacêuticas para administração oral podem ser na forma de comprimidos, cápsulas, pó ou líquido. Um comprimido pode compreender um transportador sólido como gelatina ou um adjuvante. As composições farmacêuticas líquidas compreendem geralmente um transportador líquido tal como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. Pode-se incluir solução salina fisiológica, dextrose ou outra solução sacarídea, ou glicóis como etilenoglicol, propilenoglicol ou polietilenoglicol.

Para a injecção intravenosa ou injecção no local do problema, o ingrediente activo será na forma de uma solução aquosa parentericamente aceitável isenta de pirogénios e com um pH, uma isotonicidade e uma estabilidade adequados. Os peritos na arte estão aptos a preparar soluções adequadas, utilizando, por exemplo, veículos isotónicos, como injecção de cloreto de sódio, injecção de Ringer, injecção de Ringer lactada. Podem-se



incluir, se necessário, conservantes, estabilizantes, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos.

Outros aspectos do invento e concretizações serão evidentes para os peritos na arte. De modo a melhor poder compreender o invento, proporcionam-se os exemplos seguintes, a título apenas exemplificativo e não limitativo.

Faz-se referência às seguintes Figuras.

A Figura 1 mostra as sequências de ADN e proteica de anticorpos específicos para TGF-β1. A Figura 1(a) mostra as sequências de aminoácidos e ácido nucleico codificante dos domínios variáveis de anticorpos contra TGF-β1, isolados directamente a partir de repertórios: Figura 1(a)(i)- VH de 1B2 (também conhecido como VH de 7A3); Figura 1(a)(ii)- VH de 31G9; Figura 1(a)(iii)- VL de 31G9. A Figura 1(b) mostra as sequências de aminoácidos e ácido nucleico codificante dos domínios variáveis de cadeia leve de anticorpos contra TGF-β1, isolados por rearranjo de cadeias: Figura 1(b)(i)- VL de 7A3; Figura 1(b)(ii)-VL de 10A6. A Figura 1(c)(i) mostra as sequências de aminoácidos e ácido nucleico codificante para VH de 27C1, de um anticorpo contra TGF-β1 , isolado a partir de uma experiência de "picagem" de CDR3.

A Figura 2 mostra as sequências de ADN e proteica de anticorpos específicos para TGF-β2. A Figura 2(a) mostra as sequências de aminoácidos e de ácido nucleico codificante dos domínios variáveis de anticorpos contra TGF-β2, isolados directamente a partir de repertórios: Figura 2(a)(i)- VH de 2A-H11 (também conhecido como VH de 6H1); Figura 2(a)(ii)- VH de 2A-A9 (também conhecido como VH de 11E6). A Figura 2(b) mostra as sequências de aminoácidos e de ácido nucleico codificante dos domínios variáveis de anticorpos específicos para TGF-β2, isolados após rearranjo de cadeias: Figura 2(b)(i)- VL de 6H1; Figura 2(b)(ii)- VL de 6A5; Figura 2(b) (iii)- VL de 6B1; Figura 2(b)(iv)- VL de 11E6; (v) Figura 2(b)(v)- VL de 14F12.

A Figura 3 mostra as sequências proteicas de CD3 de VH, de clones derivados de 1B2 por mutagénese por "picagem". As diferenças entre CDR3 de VH de 1B2 estão em caracteres a negrito.



A Figura 4 mostra a sequência de ADN e proteica dos domínios VH e VL de VT37, que apresenta reacção cruzada entre TGF- β 1 e TGF- β 2.

A Figura 5 mostra a sequência de ADN e a sequência de aminoácidos codificada na região de comando da cadeia pesada VH do vector vhcassette2. As enzimas de restrição HindIII, Sfil, PstI, BstEII, BamHI e EcoRI cortam nos pontos indicados.

A Figura 6 mostra um mapa do vector pG4D100 (não está à escala). Locais de clonagem múltipla (MCS): 5'-HindIII-Pacl-BamHI-(XbaI)-(PmlI)-(NheI)-Ascl-(BssHII)-Xhol-Pmel-BsiWI-3'. Os locais de restrição mostrados entre parêntesis não são únicos.

A Figura 7 mostra a sequência de ADN, incluindo intrão, e sequência de aminoácido codificada na região do comando da cadeia leve VL para o vector vlcassettel (vlcassette CAT1). As enzimas de restrição HindIII, ApaLI, SacI, Xhol e BamHI cortam nos locais indicados (ApaLI no interior do comando).

A Figura 8 mostra um mapa do vector pLN10 (não está à escala). Local de clonagem múltipla (MCS): 5'-HindIII-(SphI)-(PstI)-SalI-XbaI-BamHI-3' (1224-1259. Os locais de restrição entre parêntesis não são únicos).

A Figura 9 mostra um mapa do vector pKN100 (não está à escala). Local de clonagem múltipla (MCS): 5'-MluI-(AvaI)-HindIII-(SphI)-(PstI)-SalI-XbaI-BamHI-3'. Os locais de restrição entre parêntesis não são únicos.

A Figura 10 mostra a % de neutralização da actividade de TGF- β 2 por anticorpos Fv de uma só cadeia num ensaio que utiliza a proliferação da linha celular TF1 de eritroleucemia a diferentes concentrações nM de scFv.

A Figura 11 mostra a neutralização da actividade de TGF- β 2 por anticorpos IgG4 completos num ensaio que utiliza a proliferação da linha celular de eritroleucemia TF1 a diferentes concentrações nM de anticorpo.

A Figura 12 mostra o efeito do tratamento de animais com anticorpos, na cicatriz neural, tal como medido pela deposição de (Figura 12(a)) fibronectina e



(Figura 12(b)) laminina, detectadas utilizando intensidade de fluorescência integrada. Os gráficos mostram a representação gráfica de pontos experimentais de animais individuais. O gráfico de barras mostra a intensidade de fluorescência integrada média do grupo.

A Figura 13 mostra os resultados de um ELISA para medir a reactividade cruzada dos anticorpos IgG4 6B1 e IgG4 6A5 com isoformas de TGF- β e抗igénios não específicos. A Figura 13(a) mostra a reactividade cruzada de IgG4 6B1 com um painel de抗igénios não específicos e TGF- β , fazendo o gráfico da DO a 450 nm para cada抗igénio: 1- interleucina 1; 2-linfotoxina humana (TNF β); 3-insulina humana; 4-albumina de soro humano; 5-ADNss; 6-oxazolona-albumina de soro bovino; 7-hemocianina de lapa do género *Fissurella*; 8-inibidor de tripsina de clara de ovo de galinha; 9-quimiotripsinogénio; 10-citocromo C; 11-GADPH; 12-ovalbumina; 13-lisozima de ovo de galinha; 14-albumina de soro bovino; 15-TNF α ; 16-TGF- β 1 ; 17-TGF- β 2; 18-TGF- β 3; 19-apenas PBS. A Figura 13(b) mostra a DO a 450 nm para o anticorpo IgG4 6A5 contra o mesmo painel de抗igénios. Tanto para a Figura 13 (a) como para a figura 13(b), utilizaram-se os抗igénios 1 a 15 para revestir a placa a uma concentração de 10 μ g/ml em PBS. Os TGF-beta foram revestidos a 0,2 μ g/ml em PBS. O revestimento foi realizado a 4°C durante a noite. Utilizaram-se 100 μ g de cada抗igénio por poço e duplicados de cada抗igénio para cada IgG a ser testado. As amostras de IgG foram incubadas com os抗igénios revestidos a 37°C, durante 2 horas, após bloqueio com 2% de marvel-PBS. O segundo anticorpo marcado era um Fc1 anti-humano de ratinho, conjugado com fosfatase alcalina e o substrato utilizado para detectar o segundo anticorpo ligado era PNPP a 1 mg/ml, fazendo a leitura de absorvância a 450nm.

A Figura 14 mostra a sequência de aminoácidos e de ácido nucleico codificante para o domínio VL do anticorpo CS37, específico para TGF- β 1 .

A Figura 15 mostra dados de um ELISA que detecta a ligação de IgG4 6B1 a BSA conjugado, ou com o péptido TGF- β 2₅₆₋₆₉, ou com o péptido TGF- β 1₅₆₋₆₉ revestidos numa placa ELISA. O IgG4 6B1 foi incubado a várias concentrações em μ g/ml e a absorvância a 405 nm foi medida, após adição dos agentes de detecção. Os resultados de DO a 450 nm são representados



graficamente às várias concentrações de BSA-TGF- β 2₅₆₋₅₉ ("péptido Beta2"-losangos) e BSA-TGF- β 1₅₆₋₆₉ ("péptido Beta1"-quadrados).

A Figura 16 mostra a % de neutralização do efeito antiproliferativo de TGF- β 2 em células TF1, por anticorpos completos, IgG4 6H1, IgG4 6B1 e monoclonal de ratinho, da Genzyme, a várias concentrações (nM de IgG).

A Figura 17 mostra a % de neutralização do efeito antiproliferativo de TGF- β 1 em células TF1, por anticorpos completos, IgG4 6H1, IgG4 6B1 e o monoclonal de ratinho da Genzyme, a várias concentrações (nM de IgG).

A Figura 18 mostra a % de neutralização do efeito antiproliferativo de TGF- β 3 nas células TF1, por anticorpos completos, IgG4 6H1, IgG4 6B1 e o monoclonal de ratinho da Genzyme, a várias concentrações (nM de IgG).

A Figura 19 mostra as sequências de aminoácidos e de ADN codificante de regiões de anticorpos dirigidos contra TGF- β 2, mostrando as sequências de CDR em itálico: Figura 19(i)- VH de 2A-H11 (também conhecido como VH de 6H1); Figura 19(ii)- VL de 6B1; Figura 19(iii)- VL de 6A5 e Figura 19(iv)- VL de 6H1.

A Figura 20 mostra o vector p6H1 VH-gamma4 (7263 pb). O gene que codifica para VH de 6H1 é inserido como um fragmento de restrição HindIII-Apal.

A Figura 21 mostra o vector p6B1 lambda (10151 pb). O gene que codifica para VL de 6B1 é inserido como um fragmento de restrição EcoRI-BstBI.

A Figura 22 mostra o vector p6B1 gamma4gs (14176 pb). Os genes que codificam para as cadeias pesada e leve de IgG4 6B1 são combinados num único vector.

A Figura 23 mostra os resultados de experiências de ELISA de competição descritas no Exemplo 6. Após incubação durante a noite com TGF- β 2, as placas foram tratadas com as seguintes soluções 1-4 (os números



correspondem aos da Figura): 1-400 µl de Hams F12/DMEM (branco do reagente), 2-400 µl de Hams F12/DMEM mais 4 µg de anticorpo IgG4 6B1 (controlo positivo), 3-400 µl de meios condicionados não tratados com PC3 mais 4 µg de anticorpo IgG4 6B1 (amostra de TGF-β2 latente), 4-400 µl de meios condicionados activados com ácido PC3 mais 4 µg de anticorpo IgG4 6B1 (amostra de TGF-β2 activo).

Todos os documentos aqui mencionados são incorporados para referência

Lista de Exemplos

Exemplo 1- Isolamento de anticorpos específicos para TGF-β1, anticorpos específicos para TGF-β2 e anticorpos específicos para TGF-β1 e TGF-β2.

Exemplo 2- Construção de linhas celulares que expressam anticorpos completos.

Exemplo 3- Neutralização da actividade de TGF-β por anticorpos, determinada utilizando ensaios *in vitro*.

Exemplo 4- Inibição da ligação de TGF-β a receptores, por anticorpos.

Exemplo 5- Prevenção da cicatriz neural, utilizando anticorpos contra TGF-β.

Exemplo 6- Determinação da ligação de IgG4 6B1 à forma Activa e Latente de TGF-β2.

Exemplo 7- Neutralização do efeito inibidor de isoformas de TGF-β na proliferação de células, por anticorpos dirigidos contra TGF-β2.

Exemplo 8- Inibição por anticorpos dirigidos contra TGF-β2 da ligação de outras isoformas de TGF-β a receptores, medida num ensaio com radiorreceptores.



Exemplo 9- Avaliação de anticorpos TGF- β 1 para uma potencial utilização terapêutica.

Exemplo 10- Construção de uma linha celular de expressão elevada para IgG4 6B1, utilizando o sistema de seleção de glutamina-sintetase e avaliação num ensaio de neutralização.

Exemplo 11- Determinação do epítopo em TGF- β 2 para o anticorpo 6B1, utilizando uma biblioteca de exibição de péptidos em fagos.

Exemplo 12- Determinação da ligação de IgG4 6B1 a tecidos, por imunocitoquímica (ICC).

Exemplo 13- Determinação dos parâmetros cinéticos de IgG4 6B1 e de Fv de uma só cadeia para a ligação a TGF- β 2.

Exemplo 14- Ligação de um péptido correspondente aos resíduos 56 a 69 de TGF- β 2 a IgG4 6B1.

EXEMPLO 1

Isolamento e caracterização da ligação de anticorpos a TGF- β 1 e TGF- β 2

1. Identificação e caracterização de anticorpos contra TGF- β 1 humano, por selecção de repertórios de anticorpos em fagos, nativos e sintéticos

Repertórios de anticorpos

Utilizaram-se os seguintes repertórios de anticorpos:

1. Biblioteca de linfócitos de sangue periférico (PBL) derivada a partir de humanos não imunizados (Marks, J.D. Hoogenboom, H.R. Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. & Winter, G. (1991) *J. Mol. Biol.* 222, 581-597)

2. Biblioteca sintética (Nissim, A. Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G. Midgley, C. Lane, D. e Winter, G. (1994) *EMBO J.* 13, 692-698)



derivada a partir de genes de VH da linha germinal humana, clonados, e de CDR3 sintéticos com uma cadeia leve fixa.

3. Biblioteca de amígdalas derivada a partir de amígdalas de humanos não imunizados. Isolaram-se células B de amígdalas a partir de amígdalas completas removidas recentemente (processadas em 2 horas), fornecidas pelo Hospital Addenbrookes, Hills Road, Cambridge, R.U. Cada amígdala foi processada como se segue. Colocaram-se as amígdalas numa placa de petri contendo 5 ml de PBS e macerou-se com um bisturi, para libertar as células. A suspensão foi transferida para um tubo fresco e deixaram-se sedimentar os restos celulares grandes, por acção da gravidade, durante 5 minutos. A suspensão celular foi então colocada em camada sobre 10 ml de Lymphoprep, num tubo de polipropileno de 50 ml (Falcon) e centrifugada a 1000xg durante 20 minutos à temperatura ambiente (sem travagem) e as células na interface foram recolhidas com uma pipeta de vidro. Estas foram diluídas para um volume final de 50 ml em meio RPMI a 37°C, e centrifugadas a 500xg durante 15 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e as células foram lavadas mais duas vezes com RPMI.

Preparou-se ARN poliadenilado a partir de células em peletes, utilizando o estojo "Quickprep™ mRNA kit" (Pharmacia Biotech, Milton Keynes, R.U.). O resultado total em células de uma amígdala (ca. 1×10^6 células) foi processado utilizando uma coluna Oligo(dT)-Cellulose Spun e processado exactamente como descrito no protocolo fornecido. O ARNm foi precipitado com etanol, como descrito, e ressuspenso em 40 ml de RNase isenta de água.

A reacção de síntese de ADNc foi realizada utilizando o estojo "First-Strand cDNA Synthesis Kit" (Pharmacia Biotech, Milton Keynes, R.U.) como se segue:

ARN	20 µl (aquecido a 67°C, 10 minutos antes da utilização)
tampão de 1ª cadeia	11 µl
solução de DTT	1 µl
iniciador pd(N) ₆	1 µl



Após mistura cuidadosa, a reacção foi incubada a 37°C durante 1 hora.

Amplificaram-se genes de VH humanos a partir de ADNc de amígdalas, utilizando os nove iniciadores de síntese no sentido inverso ("back primer") baseados na família (VH 1b/7a-6a back Sfi, que introduz um local Sfi na extremidade 5', Tabela 1) juntamente com uma mistura equimolar dos quatro iniciadores de síntese no sentido directo ("forward primer") JH (JH 1-2, 3, 4-5, 6 for; Marks *et al.*, 1991 *supra*). Assim, realizaram-se nove amplificações primárias por PCR. Cada mistura reaccional (50 µl) compreendia 2 µl de ADNc molde, 25 pmol de iniciador de síntese no sentido inverso, 25 pmol de iniciador de síntese no sentido directo, 250 µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3 e 2,5 u de *Taq* polimerase (Boehringer). Sobre a mistura reaccional colocou-se uma camada de óleo mineral (parafina) e fizeram-se 30 ciclos (94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min, 72°C durante 1 min) utilizando um ciclizador térmico Techne. Os produtos foram purificados num gel de agarose a 1% (p/v), isolados do gel utilizando "Geneclean" (Bio 101 Inc.) e ressuspensos em 15 µl de água. Os genes VH amplificados foram recombinados com genes de VL humanos derivados de PBL (Marks *et al.*, 1991 *supra*) juntamente com o ligante (Gly₄, Ser)₃ (Huston, J.S. *et al.*, 1988, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:5879-83) por montagem por PCR (Marks *et al.*, 1991 *supra*). As construções de anticorpo VH-ligante-VL foram clonadas em locais Sfil e NotI do vector fagomídeo, pCANTAB6 (McCafferty, J. *et al.*, 1994, *Appl. Biochem. Biotech.* 47:157-173) para obter uma biblioteca de 6x10⁷ clones.

4. Biblioteca de Fv de uma só cadeia, grandes derivada a partir de tecidos linfóides, incluindo amígdalas, medula óssea e linfócitos de sangue periférico.

Preparou-se ARN poliadenilado a partir de células B de vários tecidos linfóides de 43 dadores não imunizados, utilizando o estojo "Quickprep mRNA" (Pharmacia).

A primeira cadeia de ADNc foi sintetizada a partir de ARNm utilizando um estojo "First-Strand cDNA Synthesis" (Pharmacia), utilizando hexâmeros aleatórios para iniciar a síntese. Os genes de V foram amplificados utilizando iniciadores de síntese específicos de famílias para os genes de VH, Vκ, Vλ, como anteriormente descrito (Marks *et al.*, *supra*) e subsequentemente



recombinados, juntamente com o ligante de scFv (Gly_4Ser)₃ por montagem por PCR. As construções de anticorpo VH-ligante-VL foram clonadas nos locais de *Sfi* I e *Not* I do vector fagemídeo, pCANTAB6. A ligação, electroporação e plaqueamento das células foram realizados como anteriormente descrito (Marks *et al.*, 1991, *supra*). A biblioteca foi tornada ca. de 1000x maior do que o anteriormente descrito, aumentando as quantidades de vector e inserção utilizadas e realizando electroporações múltiplas. Isto gerou um repertório de scFv que se calculou ter ca. de $1,3 \times 10^{10}$ recombinantes individuais que se verificou ser bastante diversificado, por obtenção de "impressão digital" com *Bst* NI.

a. *Indução de bibliotecas de anticorpos em fagos*

Os quatro repertórios diferentes de anticorpos em fagos acima referidos foram seleccionados quanto a anticorpos contra TGF- β 1. Os repertórios de VH sintéticos (Nissim *et al.*, 1994, *supra*), amígdalas, scFv "grande" e PBL (Marks *et al.*, 1991 *supra*) foram, cada um, tratados como se segue, de modo a recuperar partículas de fagemídeo. Inocularam-se 500 ml de 2YTAK (meios 2YT suplementados com 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina e 2% de glucose) previamente aquecido (37°C) num frasco cónico de 2 l, com aproximadamente 3×10^{10} células de uma cultura-mãe em glicerol (-70°C) da biblioteca adequada. A cultura foi crescida a 37°C com um bom arejamento, até a DO_{600nm} atingir 0,7 (aproximadamente 2 horas). Adicionou-se o fago auxiliar M13KO7 (Stratagene) à cultura até uma multiplicidade de infecção (moi) de aproximadamente 10 (assumindo que uma DO_{600nm} de 1 é equivalente a 5×10^8 células por ml de cultura). A cultura foi incubada em estado estacionário a 37°C durante 15 minutos, seguido de 45 minutos com arejamento ligeiro (200 rpm), à mesma temperatura. A cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi drenado da pelete celular. As células foram ressuspensas em 500 ml de 2YTAK (meios 2YT suplementados com 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de canamicina) e a cultura foi incubada durante a noite a 30°C com um bom arejamento (300 rpm). As partículas fágicas foram purificadas e concentradas através de três precipitações com polietilenoglicol (PEG) (Sambrook, J. Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1990), *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour, New York) e ressuspensas em PBS a 10^{12} unidades de transdução (ut)/ml (clones resistentes à ampicilina).



b. *Prospecção da biblioteca de anticorpos em fagos em TGF-β1*

Os fagos induzidos dos quatro repertórios foram, cada um, prospectado em separado, em TGF-β1. Revestiu-se um imuno-tubo de 75 mmx12 mm (Nunc; Maxisorp) com 2 ml de TGF-β1 humano recombinante (0,5 µg/ml, Genzyme) em PBS durante a noite a 4°C. Após lavagem 3 vezes com PBS, o tubo foi cheio com MPBS a 3% (3% de leite em pó magro "Marvel", Ix PBS) e incubado durante 2 horas a 37°C para bloqueio. Repetiu-se a lavagem, adicionaram-se partículas de fagomídeo (10^{13} ut) em 2 ml de MPBS a 3% e o tubo foi incubado de forma estacionária a 37°C, durante 1 hora. O tubo foi lavado 20 vezes com PBST (0,1%) e em seguida 20 vezes com PBS. As partículas fágicas ligadas foram eluídas do tubo por adição de 2 ml de trietilamina 100 mM e incubando o tubo de forma estacionária à temperatura ambiente, durante 10 minutos. O material eluído foi imediatamente neutralizado, pipetando-o para um tubo contendo 1 ml de Tris-HCl 1M (pH 7,4). Os fagos foram armazenados a 4°C. Utilizaram-se 1,5 ml dos fagos eluídos para infectar 20 ml de *E. coli* TG1 na fase de crescimento logarítmico (Gibson, T.J. (1984). Tese de Doutoramento, University of Cambridge, R.U.). As células infectadas foram crescidas durante 1 hora a 37°C, com arejamento ligeiro em caldo 2YT e em seguida plaqueadas em meio 2YTAG em placas de 243 mmx243 mm (Nunc). As placas foram incubadas durante a noite a 30°C. As colónias foram raspadas das placas para 10 ml de caldo 2YT e adicionou-se glicerol a 15% (v/v), para armazenamento a -70°C.

As culturas-mãe em glicerol resultantes do primeiro ciclo de prospecção, de cada um dos quatro repertórios em TGF-β1 foram recuperadas utilizando fagos auxiliares para derivar partículas de fagomídeo para o segundo ciclo de prospecção. Utilizaram-se 250 µl da cultura-mãe em glicerol para inocular 50 ml de caldo 2YTAG e incubou-se num frasco cónico de 250 ml, a 37°C com um bom arejamento, até se atingir uma DO_{600nm} de 0,7 (aproximadamente 2 horas). Adicionou-se o fago auxiliar M13K07 (moi=10) à cultura que foi em seguida incubada de forma estacionária a 37°C, durante 15 minutos, seguida de 45 minutos com arejamento ligeiro (200 rpm), à mesma temperatura. A cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi drenado da pelete celular. As células foram ressuspensas em 50 ml de 2YTAK pré-aquecido e a cultura foi incubada durante a noite a 30°C, com um bom arejamento. As partículas fágicas foram



purificadas e concentradas por precipitação com PEG (Sambrook *et al.*, 1990 *supra*) e ressuspensas em PBS a 1013 ut/ml.

O fago induzido do primeiro ciclo de prospecção de cada um dos três repertórios foi seleccionado uma segunda vez, essencialmente como descrito acima, excepto que o tubo de prospecção foi revestido com apenas 1 ml de TGF- β 1 (0,5 μ g/ml, Genzyme) e o volume de fago adicionado ao tubo foi reduzido de forma semelhante. Após uma lavagem exaustiva, os fagos ligados foram eluídos do tubo utilizando 1 ml de trietilamina 100 mM e neutralizados por adição de 0,5 ml de Tris-HCl 1M (pH 7,4), como anteriormente descrito. O processo de crescimento e prospecção de fagos foi repetido um terceiro e depois um quarto ciclos de selecção.

c. *Crescimento de clones individuais seleccionados para imunoensaio*

Utilizaram-se as colónias individuais do terceiro e quarto ciclos de selecção para inocular 100 μ l de 2YTG em poços individuais de placas de cultura de tecidos de 96 poços (Corning). As placas foram incubadas a 30°C durante a noite com agitação moderada (200 rpm). Adicionou-se glicerol até 15%, a cada poço, e estas placas principais foram armazenadas a -70°C, até serem utilizadas para análise.

d. *ELISA para identificação de scFv anti-TGF- β 1*

Os clones específicos para TGF- β 1 foram identificados por ELISA, utilizando scFv exibidos em fagos ou scFv solúveis.

i. ELISA de fagos

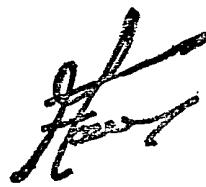
Utilizaram-se células das placas principais para inocular placas de cultura de tecidos de 96 poços, frescas, contendo 100 μ l de 2YTG por poço. Estas placas foram incubadas a 37°C durante 6-8 horas, ou até as células nos poços estarem em crescimento na fase logarítmica (DO600 0,2-1,0). Adicionou-se M13K07 a cada poço até um moi de 10 e incubou-se de forma estacionária durante 15 min, em seguida 45 min com agitação suave (100 rpm), ambas a 37°C. As placas foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min e o



sobrenadante foi eluído. Ressuspendeu-se cada pelete celular em 100 µl de 2YTAK e incubou-se a 30°C durante a noite.

Centrifugou-se cada placa a 2000 rpm e os 100 µl de sobrenadante de cada poço foram recuperados e bloqueados em 20 µl de M6PBS a 18% (leite em pó magro a 18%, 6xPBS), de forma estacionária, à temperatura ambiente, durante 1 hora. Entretanto, as placas de microtítulo flexíveis, que tinham sido bloqueadas durante a noite de forma estacionária, a 4°C, com 50 µl de TGF-β1 0,2 µg/ml em PBS, ou com 50 µl de PBS sozinho (originando uma placa de controlo não revestida) foram lavadas 3 vezes em PBS e bloqueadas durante 2h, de forma estacionária, a 37°C, em PBS 3M. Estas placas foram então lavadas três vezes com PBS e adicionaram-se 50 µl de fago previamente bloqueado a cada poço de ambas as placas, revestida com TGF-β1 e não revestida. As placas foram incubadas de forma estacionária a 37°C durante 1h, após o que se removeram os fagos. As placas foram lavadas incubando durante 2 min em PBST três vezes, seguindo-se incubação durante 2 min em PBS, três vezes, sempre à temperatura ambiente.

Adicionou-se a cada poço de ambas as placas, a revestida com TGF-β1 e a não revestida, 50 µl de uma diluição de 1 para 10 000 de anticorpo anti-fd de ovelha (Pharmacia) em PBS 3M e as placas foram incubadas a 37°C, de forma estacionária, durante 1h. Cada placa foi lavada como descrito acima e adicionaram-se 50 µl de uma diluição de 1 para 5 000 de anti-ovelha de burro conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) em PBS 3M e incubou-se de forma estacionária a 37°C, durante 1h. As placas foram lavadas como descrito acima, seguindo-se duas lavagens em NaCl 0,9%. A actividade de fosfatase alcalina foi visualizada utilizando, ou o substrato cromogénico pNPP (Sigma), ou o sistema Ampak (Dako). O sinal de absorvância gerado por cada clone foi determinado por medição da densidade óptica, ou 405 nm (pNPP) ou a 492 nm (Ampak), utilizando um leitor de placas de microtítulo. Os clones foram seleccionados para análise posterior quando o sinal de ELISA gerado na placa revestida com TGF-β1 era pelo menos o dobro do sinal da placa não revestida.



ii ELISA solúvel

Utilizaram-se células das placas principais para inocular placas de cultura de tecidos de 96 poços, frescas, contendo 100 µl de 2YTAG por poço. Estas placas foram incubadas a 30°C durante 8 horas e em seguida centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi eluído. Ressuspendeu-se cada pelete celular em 100 µl de 2YTA (meios 2YT suplementados com 100 µg/ml de ampicilina) contendo IPTG 10 mM (isopropil-B-D-tiogalactopiranósido) e incubou-se a 30°C, durante a noite.

Cada placa foi centrifugada a 2000 rpm e os 100 µl de sobrenadante de cada poço foram recuperados e bloqueados em 20 µl de M6PBS a 18%, de forma estacionária, à temperatura ambiente, durante 1 hora. Entretanto, as placas de microtítulo flexíveis que tinham sido bloqueadas durante a noite de forma estacionária, a 4°C, com 50 µl de TGF-β1 0,2 µg/ml em PBS, ou com 50 µl de PBS sozinho, foram lavadas 3 vezes com PBS e bloqueadas durante 2h, de forma estacionária a 37°C, em MPBS a 3%. Estas placas foram então lavadas três vezes com PBS e adicionaram-se 50 µl de scFv solúvel previamente bloqueado, a cada poço, de ambas as placas, a revestida com TGF-β1 e a não revestida. As placas foram incubadas de forma estacionária a 37°C durante 1h, após o que se removeram as soluções de scFv. As placas foram lavadas incubando durante 2 min em PBST (PBS contendo 1% de Tween) três vezes, seguindo-se incubação durante 2 min em PBS três vezes, sempre à temperatura ambiente.

Adicionou-se a cada poço de ambas as placas, revestida com TGF-β1 e não revestida, 50 µl de uma diluição de 1 para 200 de anticorpo de murídeo *tag anti-myc*, 9E10 (Munro, S.& Pelham, H.R.B.(1986) *Cell* 46, 291-300) em PBS 3M e as placas foram incubadas a 37°C de forma estacionária durante 1h. Cada placa foi lavada como descrito acima e adicionaram-se 50 µl de uma diluição de 1 para 5 000 de anti-ratinho de cabra, conjugado com fosfatase alcalina (Pierce) em PBS 3M e incubou-se de forma estacionária a 37°C durante 1h. As placas foram lavadas como descrito acima seguindo-se duas lavagens em NaCl a 0,9%. A actividade de fosfatase alcalina foi visualizada utilizando ou um substrato cromogénico pNPP (Sigma) ou o sistema Ampak (Dako). O sinal de absorbância gerado por cada clone foi determinado por medição da densidade



óptica a 405 nm (pNPP) ou a 492 nm (Ampak) utilizando um leitor de placas de microtítulo. Os clones eram seleccionados para posterior análise, quando o sinal de ELISA gerado na placa revestida com TGF- β 1 era pelo menos o dobro do sinal da placa não revestida.

iii. ELISA de especificidade

Os clones identificados como se ligando a TGF- β 1 em vez de a um poço não revestido, como descrito acima, foram posteriormente analisados quanto a especificidade fina. Os ELISA de especificidade foram realizados utilizando scFv quer exibidos em fagos, quer em solução, como acima descrito, excepto que se inocularam 5 ml de meios com cada clone em tubos Falcon de 50 ml, e se cresceu para gerar o scFv em fagos ou solúvel, utilizado no ELISA. Os poços da placa de microtítulo foram revestidos com 50 μ l de TGF- β 1 a 0,2 μ g/ml, TGF- β 2 a 0,2 μ g/ml, albumina de soro bovino 10 μ g/ml (BSA) ou PBS(poço não revestido). Após o bloqueio prévio, quer do fago (ou do scFv solúvel) quer das placas de microtítulo, adicionaram-se 50 μ l de fago bloqueado (ou scFv solúvel) de cada clone a um poço revestido, com TGF- β 1, TGF- β 2, BSA ou a um poço não revestido. Tal como acima, a actividade de fosfatase alcalina foi visualizada utilizando o substrato cromogénico pNPP (Sigma), ou o sistema Ampak (Dako). Os clones foram considerados específicos para TGF- β 1 se o sinal de ELISA gerado no poço revestido com TGF- β 1 era pelo menos cinco vezes maior que o sinal em qualquer dos poços de TGF- β 2, BSA ou não revestido.

iv Determinação da especificidade por BIACore™

Mostrou-se também que os anticorpos eram específicos para TGF- β 1, em relação a TGF- β 2 (obtido da R&D Systems Abingdon) por ligação relativa aos *chips* sensores BIACore™, revestidos com o antigénio adequado. O TGF- β 1 e o TGF- β 2 foram imobilizados por acoplamento de amina aos *chips* sensores Biosensor CM5 (Pharmacia), de acordo com as instruções do fabricante. Injectaram-se fragmentos Fv de uma só cadeia (35 μ l, purificados por cromatografia de afinidade com metal imobilizado, como descrito no exemplo 4) sobre o antigénio imobilizado, a um caudal de 5 μ l/min. A quantidade de TGF- β ligado foi determinada como o aumento total em unidades de ressonância (UR), ao longo deste período. Para o scFv 31G9 observou-se um aumento de



1059 UR com um *chip* de TGF- β 1 e 72 UR com um *chip* de TGF- β 2. Assim, a ligação é muito mais forte ao TGF- β 1 do que ao TGF- β 2.

e. *Sequenciação de anticorpos scFv específicos para TGF- β -1*

A sequência de nucleótidos dos anticorpos específicos para TGF- β 1 foi determinada utilizando, primeiro, iniciadores específicos do vector para amplificar o ADN inserido de cada clone. Utilizaram-se células de uma colónia individual numa placa de ágar 2YTAG como molde, para uma amplificação do ADN inserido, por reacção em cadeia com polimerase (PCR), utilizando os iniciadores pUC19reverse e fdtetseq (Tabela 1). As condições de amplificação consistiram em 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min e 72°C durante 2 min, seguido de 10 min a 72°C. Os produtos de PCR foram purificados utilizando um estojo "PCR Clean-up Kit" (Promega) num volume final de 50 μ l de H₂O. Utilizaram-se entre 2 e 5 μ l de cada preparação de inserção como molde para a sequenciação, utilizando o sistema de sequenciação "Taq Dye-terminator cycle" (Applied Biosystems). Utilizaram-se os iniciadores mycseq 10 e PCR-L-Link, para sequenciar a cadeia leve de cada clone e PCR-H-Link e pUC19reverse, para sequenciar a cadeia pesada (Tabela 1).

f. *Sequência e fonte dos anticorpos scFv específicos para TGF- β 1 iniciais*

Isolaram-se quatro anticorpos específicos para TGF- β 1 diferentes a partir das selecções, utilizando as quatro bibliotecas descritas acima. O nome de cada clone, a sua origem e a linha germinal da sua cadeia pesada e leve são indicados a seguir. A sequência completa de genes do domínio VH dos clones 1-B2 e 31-G9 são dadas na Figura 1(a), juntamente com o gene do domínio VL de scFv 31-G9.

CLONE	BIBLIOTECA FONTE	LINHA GERMINAL DE VH	ISOTIPO DE VL
1-B2	PBL	VH3 DP49	Vcapa
1A-E5	VH sintético	VH3 DP53	Vlambda
1A-H6	Amígdala	VH3 DP50	Vlambda
31-G9	scFv grande	VH3 DP49	Vlambda

Deste modo, estes isolados iniciais foram obtidos a partir de bibliotecas derivadas a partir de diferentes fontes - tanto genes de V naturais de humanos



não imunizados, como bibliotecas sintéticas de genes de V da linha germinal clonada, com CDR sintéticos.

2. Maturação de afinidade dos anticorpos scFv específicos para TGF-β1 iniciais

a. Rearranjo da cadeia leve do anticorpo scFv específico para TGF-β1, 1-B2

i. Construção de repertórios

A cadeia pesada do clone 1-B2 foi recombinada com o repertório completo de cadeias leves derivado dos repertórios de PBL e scFv grandes (derivados de amígdalas). A cadeia pesada de 1-B2 foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores HuJh4-5For (Tabela 1) e pUC19reverse. As condições de amplificação consistiram em 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min e 72°C durante 1 min, seguido de 10 min a 72°C. O produto de PCR foi separado através de um gel de agarose a 1%-TAE, a banda que representa o VH amplificado foi excisada e eluída a partir do gel de agarose utilizando o estojo Geneclean (Bio 101).

As cadeias leves de PBL e de amígdalas foram amplificadas por PCR, utilizando os iniciadores fdetseq e uma mistura de RL1, 2 & 3 (Tabela 1). As condições de amplificação consistiram em 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min e 72°C durante 1 min, seguido de 10 min a 72°C. O produto de PCR foi separado através de um gel de agarose a 1%-TAE, a banda que representa o VL amplificado foi excisada e eluída do gel de agarose utilizando o estojo Geneclean (Bio 101).

Aproximadamente 50 ng de cadeia pesada de 1-B2 amplificada e 50 ng, de cadeias leves derivadas de PBL amplificadas, ou derivadas de amígdalas, amplificadas, foram combinados e precipitados com acetato de sódio e etanol, utilizando 25 µg de glicogénio como transportador. O ADN precipitado foi sedimentado por centrifugação a 13 000 rpm numa microcentrífuga, seco ao ar e ressuspenso em 26 µl de H₂O. Este foi utilizado numa amplificação de montagem, após a adição de tampão de reacção até 1X, dNTP a 200 nM e 5 unidades de *Taq* polimerase. As condições de amplificação consistiram em 20 ciclos de 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min e 72°C durante 1 min 30 s, seguido de 10 min a 72°C. Utilizaram-se 10 µl de cada montagem, como molde,



numa amplificação de "auxílio" (de auxílio) com os iniciadores fdetseq e pUC19reverse. As condições de amplificação consistiram em 25 ciclos de 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min e 72°C durante 1 min 30 s, seguido de 10 min a 72°C.

O produto da amplificação de auxílio foi separado através de agarose a 1%-TAE e a banda que representa o VH-VL de auxílio foi excisada e eluída utilizando o estojo Geneclean. Esta foi digerida com as endonucleases de restrição Sfi I e NotI (NEB) e ligada (sistema de ligação da Amersham) no vector fagemídeo pCantab 6, previamente digerido com Sfi I e NotI. O produto de ligação foi utilizado para transformar células TG1 electrocompetentes, plaqueado em placas 2YTAG e incubado durante a noite a 30°C. Geraram-se aproximadamente 1×10^5 clones individuais a partir do rearranjo de cadeias leves, da cadeia pesada de 1-B2 com as cadeias leves derivadas de PBL e aproximadamente 1×10^6 para o rearranjo com as cadeias leves derivadas de amígdalas.

ii. Selecção de repertórios de rearranjo de cadeias leves

Os dois repertórios de rearranjos de cadeias leves foram seleccionados quanto a anticorpos específicos para TGF-β1. As partículas de fagemídeo foram recuperadas de cada repertório como descrito anteriormente para as bibliotecas iniciais. Os fagos recuperados foram previamente bloqueados durante 1h, num volume final de 100 µl de PBS 3M. Utilizaram-se aproximadamente 10^{11} ut de fagos no primeiro ciclo de selecção e entre 10^9 e 10^{10} nas selecções subsequentes. Para o primeiro ciclo de selecção, adicionou-se TGF-β1 biotinilado numa concentração final de 100 nM, ao fago previamente bloqueado e incubou-se de forma estacionária a 37°C, durante 1h.

Para cada selecção, separaram-se 100 µl de suspensão de pérolas "Dynabead" (Dynal) num magnete e as pérolas foram recuperadas e previamente bloqueadas durante 2h em 1 ml de PBS 3M. As pérolas foram recuperadas num magnete e ressuspensas numa mistura de fagemídeo/TGF-β1 biotinilado e incubadas à temperatura ambiente durante 15 min, enquanto eram rodadas na direcção longitudinal. As pérolas foram capturadas num magnete e lavadas quatro vezes com PBST, seguindo-se três lavagens com PBS. Após



cada lavagem, as pérolas foram capturadas num magnete e ressuspensas na lavagem seguinte. Finalmente, metade das pérolas foram ressuspensas em 10 µl de DTT 50 mM (a outra metade das pérolas foi armazenada a 4°C como reserva) e incubadas à temperatura ambiente durante 5 min. A suspensão total de pérolas foi então utilizada para infectar 5 ml de células TG1 em crescimento na fase logarítmica. Estas foram incubadas a 37°C de forma estacionária, durante 15 min, e em seguida com agitação moderada durante 45 minutos, plaqueadas em placas de 2YTAG e incubadas durante a noite a 30°C.

As colónias foram raspadas das placas para 10 ml de caldo 2YT e adicionou-se glicerol a 15% (v/v) para armazenamento a -70°C. Utilizou-se uma alíquota de 250 µl de cada raspagem de placas para inocular 2YTAG e as partículas de fagomídeo foram recuperadas como descrito anteriormente. Para cada repertório, realizaram-se três ciclos de selecção, utilizando TGF-β1 biotinilado, essencialmente de forma idêntica ao primeiro ciclo de selecção descrito acima. Todas as selecções foram com TGF-β1 100 nM, excepto o terceiro ciclo de selecção do repertório de cadeias leves derivado de amígdalas, em que a concentração de TGF-β1 biotinilado na selecção foi reduzida para 50 nM.

iii. Identificação de anticorpos scFv específicos para TGF-β1 a partir de repertórios de rearranjos de cadeias leves

Os anticorpos scFv específicos para TGF-β1 foram identificados por ELISA tanto em fagos, como em solução, e sequenciados, como descrito anteriormente. Identificaram-se três novos anticorpos scFv específicos para TGF-β1, dois com cadeias leves derivadas de PBL e um com uma cadeia leve derivada de amígdala. Todos os três tinham a sequência da cadeia pesada de 1B2 (DP49), descrita anteriormente. As sequências estão resumidas a seguir e a sequência completa de cada gene do domínio VL é dada na Figura 1(b).

CLONE	FONTE DE VL	LINHA GERMINAL DE VH	ISOTIPO DE VL
7-A3	PBL	DP49(1B2)	Vcapa
10-A6	PBL	DP49(1B2)	Vlambda
14-A1	Amígdala	DP49(1B2)	Vlambda



Assim, o domínio VH de 1B2 derivado da biblioteca de PBL pode ser combinado com os domínios VL derivados de ambas as bibliotecas, de PBL e de amígdalas.

b. "Picagem" de CDR3 do anticorpo scFv específico para TGF- β 1, 1B2

i. Construção do repertório "picado"

Sintetizou-se primeiro um iniciador oligonucleotídico, 84mero mutagénico, 1B2 mutVHCDR3 (veja-se Tabela 1). Este iniciador foi "picado" a 10%; i.e. em cada posição de nucleótido existe 10% de probabilidade de se vir a incorporar um nucleótido não progenitor. A cadeia pesada de 1-B2 foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores pUC19reverse e 1B2 mutVHCDR3. As condições de amplificação consistiram em 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min e 72°C durante 1 min, seguido de 10 min a 72°C. O produto de PCR foi separado através de um gel de agarose a 1%-TAE, a banda que representa o VH amplificado foi excisada e eluída do gel de agarose utilizando o estojo Geneclean (Bio 101).

A cadeia leve de 1B2 progenitora foi amplificada por PCR, utilizando os iniciadores fdtetseq e RL3 (Tabela 1). As condições de amplificação consistiram em 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min e 72°C durante 1 min, seguido de 10 min a 72°C. O produto de PCR foi separado através de um gel de agarose a 1%-TAE, a banda que representa o VL amplificado foi excisada e eluída do gel de agarose, utilizando o estojo Geneclean (Bio 101).

Aproximadamente 50 ng de cadeia pesada de 1-B2 "picada", amplificada, e 50 ng de cadeia leve de 1-B2 progenitora, amplificada foram combinados e precipitados com acetato de sódio e etanol, utilizando 25 μ g de glicogénio como transportador. O ADN precipitado foi sedimentado por centrifugação a 13 000 rpm numa microcentrífuga, seco ao ar e ressuspenso em 26 μ l de H₂O. Este foi utilizado numa amplificação de montagem, após a adição do tampão de reacção até 1X, dNTP a 200 nM e 5 unidades de *Taq* polimerase. As condições de amplificação consistiram em 25 ciclos de 94°C durante 1 min, 65°C durante 4 min. Utilizaram-se cinco μ l de cada montagem como molde, numa amplificação de auxílio com os iniciadores fdtetseq e pUC19reverse. As



condições de amplificação consistiram em 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 2 min e 72°C durante 1 min, seguido de 10 min a 72°C.

O produto da amplificação de auxílio foi separado através de agarose a 1%-TAE e a banda que representa o VH-VL "picado" de auxílio foi excisada e eluída utilizando o estojo Geneclean. Este foi digerido com as endonucleases de restrição Sfi I e Not I (NEB) e ligado (sistema de ligação da Amersham) num vector fagemídeo pCantab 6, previamente digerido com Sfi I e Not I. O produto de ligação foi utilizado para transformar células TG1 electrocompetentes, que foram plaqueadas em placas de 2YTG e incubadas durante a noite a 30°C. Geraram-se aproximadamente 4×10^6 clones individuais a partir desta "picagem" de CDR3 de VH, do CDR3 de VH de 1-B2.

ii. Seleccão de repertórios de "picagem" de CDR3 de 1B2

O repertório foi seleccionado quanto a novos anticorpos scFv específicos para TGF- β 1 por meio de um ciclo de prospecção em TGF- β 1 1 μ g/ml, seguido de dois ciclos de selecção com TGF- β 1 biotinilado a 50 nM, utilizando os métodos anteriormente descritos.

iii. Identificação de anticorpos scFv específicos para TGF- β 1, a partir do repertório de "picagem" de CDR3 de 1B2

Os anticorpos scFv específicos para TGF- β 1 foram identificados por ELISA tanto em fagos, como em solução, e sequenciados, como anteriormente descrito. O clone 27C1 foi isolado a partir do repertório "picado". Este é virtualmente idêntico ao clone 1B2 mas com três diferenças no CDR3 de cadeia pesada. A sequência completa do clone 27C1 é apresentada na Figura 1(c). O domínio VH de 27C1 foi combinado com o domínio VL de 10A6 na construção do anticorpo completo IgG4 27C1/10A6 (exemplo 2). As propriedades deste anticorpo são descritas em maior pormenor nos exemplos 2 a 6. Além do 27C1, isolaram-se um grande número de outros anticorpos, em que até 7 dos 14 aminoácidos diferem no CDR3 do domínio VH (Figura 3). Estes tinham uma preferência similar para se ligar a TGF- β 1, em relação ao TGF- β 2.

3. Identificação e caracterização de anticorpos contra o TGF-β2 humano por selecção de repertórios de anticorpos em fagos nativos e sintéticos

a. Indução de bibliotecas de anticorpos em fagos

Seleccionaram-se dois repertórios de anticorpos em fagos diferentes, para anticorpos contra o TGFβ-2. Os repertórios de VH sintéticos (Nissim et al., 1994) e de amígdala s (construídos como descrito anteriormente) foram, cada um, tratados como descrito para o TGF-β1, para recuperar as partículas de fagomídeo.

b. Prospecção da biblioteca de anticorpos em fagos em TGF-β2

Os fagos induzidos dos dois repertórios foram, cada um, separadamente prospectado em TGF-β2, como descrito anteriormente para o TGF-β1, mas utilizando TGF-β2 0,5 µg/ml, como antígeno de revestimento.

c. Identificação e sequenciação de anticorpos scFv específicos para TGF-β2.

As colónias individuais do terceiro e quarto ciclos de selecção foram pesquisadas, por ELISA quer em fagos, quer em solução, como descrito anteriormente para o TGF-β1, mas utilizando placas de microtítulo flexíveis revestidas com TGF-β2 a 0,2 µg/ml, em vez de TGF-β1. Os clones foram seleccionados para posterior análise, quando o sinal de ELISA gerado na placa revestida com TGF-β2 era pelo menos o dobro do produzido na placa não revestida. Para o ELISA de especificidade, como descrito anteriormente para TGF-β1, os clones foram considerados específicos para TGF-β2, quando o sinal de ELISA gerado no poço revestido com TGF-β2 era pelo menos cinco vezes maior do que o sinal em qualquer dos poços de TGF-β1, BSA ou não revestido.

d. Sequência e fonte de anticorpos scFv específicos para TGF-B-2 iniciais

Isolaram-se quatro anticorpos específicos para TGF-β2 diferentes a partir das seleções, utilizando as duas bibliotecas descritas acima. O nome de cada clone, a sua origem e a linha germinal da sua cadeia pesada e leve são dadas a



seguir. A sequência completa dos genes do domínio VH de 2A-H11 e 2A-A9 são dadas na Figura 2 (a).

CLONE	BIBLIOTECA FONTE	LINHA GERMINAL DE VH	ISOTIPO DE VL
1-G2	Amígdala		
1-N6	Amígdala	DP49	
2A-H11	VH sintético	DP50	Vlambda
2A-A9	sintético	DP46	Vlambda
Gold-11	scFv grande		Vlambda

Assim, isolaram-se, anticorpos humanos que se ligam ao TGF- β 2 humano de diferentes fontes - tanto genes de V naturais de humanos não humanizados, como bibliotecas sintéticas de genes de V da linha germinal clonada, juntamente com CDR sintéticos.

4. Rearranjo de cadeias leves dos anticorpos scFv específicos para TGF- β 2 2A-H11 e 2A-A9

a. Construção de repertórios

As cadeias pesadas dos clones 2A-H11 e 2A-A9 foram recombinadas com o repertório completo de cadeias leves derivado a partir dos repertórios de PBL e scFv grande (derivado de amígdalas), como descrito anteriormente para o anticorpo scFv específico para TGF- β 1, 1-B2. Ambos os repertórios gerados a partir da recombinação com o repertório de cadeias leves de PBL eram aproximadamente 1×10^5 , os gerados a partir da recombinação com o repertório de cadeias leves de amígdalas eram aproximadamente 1×10^6 .

b. Seleção de repertórios de rearranjo de cadeias leves

Os repertórios de rearranjo de cadeias leves foram seleccionados para os anticorpos específicos para TGF- β 2 utilizando TGF- β 2 biotinilado, como descrito anteriormente para a seleção dos repertórios de rearranjo de cadeias leves de TGF- β 1. Em ambos o primeiro e segundo ciclos de seleção, utilizou-se uma concentração de 100 nM para o TGF- β 2 biotinilado. No terceiro ciclo de



selecção do repertório de rearranjo de cadeias leves, derivado de PBL, utilizou-se TGF- β 2 biotinilado nas concentrações de 100 nM e 1 nM. Para o terceiro ciclo de selecção do repertório de rearranjo de cadeias leves, derivado de amígdalas, utilizou-se o TGF- β 2 biotinilado, numa concentração de 50 nM.

c. Identificação dos anticorpos scFv específicos para TGF- β 2 a partir de repertórios de rearranjo de cadeias leves

Identificaram-se os anticorpos scFv específicos para TGF- β 2 por ELISA quer em fagos, quer em solução, e sequenciaram-se, como anteriormente descrito. Identificaram-se 5 novos anticorpos scFv específicos para TGF- β 2. As sequências estão resumidas a seguir e a sequência completa para cada clone é dada na Figura 2(b)

CLONE	FONTE DE VL	LINHA GERMINAL DE VH	ISOTIPO DE VL
6-H1	PBL	DP50(2A-H11)	Vcapa
6-A5	PBL	DP50(2A-H11)	Vlambda
6-B1	PBL	DP50(2A-H11)	Vlambda
11-E6	PBL	DP46(2A-A9)	Vcapa
14-F12	Amígdala	DP46(2A-A9)	Vlambda

d. Determinação da especificidade por ELISA

Os clones identificados como se ligando ao TGF- β 2, em vez de a um poço não revestido, como descrito acima, foram posteriormente analisados quanto à especificidade fina. O ELISA de especificidade foi realizado utilizando scFv quer exibido num fago, quer em solução, como descrito acima, excepto que se inocularam 5 ml de meios em tubos Falcon de 50 ml com cada clone e se cresceram para gerar o scFv em fagos, ou solúvel, utilizado no ELISA. Os poços das placas de microtípulo foram revestidos com 50 μ l, de TGF- β 1 a 0,2 μ g/ml, TGF- β 2 a 0,2 μ g/ml, albumina de soro bovino (BSA) a 10 μ g/ml ou PBS (poço não revestido). Após o bloqueio prévio tanto do fago (ou do scFv solúvel) como das placas de microtípulo, adicionaram-se 50 μ l de fago



bloqueado (ou scFv solúvel) de cada clone a um poço revestido, com TGF- β 1, TGF- β 2, BSA ou a um poço não revestido. Tal como acima, a actividade de fosfatase alcalina foi visualizada utilizando, ou o substrato cromogénico pNPP (Sigma), ou o sistema Ampak (Dako). Os clones foram considerados específicos para TGF- β 2 quando o sinal de ELISA gerado no poço revestido com TGF- β 2 era pelo menos cinco vezes maior do que o sinal em qualquer dos poços de TGF- β 1, BSA ou não revestido. A reactividade cruzada com antigénios não relacionados foi determinada de forma mais extensa para o anticorpo anti-TGF- β 2 no formato de anticorpo completo, veja-se exemplo 2. Também se verificou que a reactividade cruzada de IgG4 6B1 e IgG4 6A5 com TGF- β 1 e TGF- β 3 (obtidos de R&D Systems, Abingdon) é muito baixa.

e. Determinacão de especificidade por BIACore™

Também se mostrou que os anticorpos eram específicos para TGF- β 2, em comparação com o TGF- β 1, por ligação relativa aos *chips* sensores BIACore, revestidos com o antigénio adequado. O TGF- β 1 e o TGF- β 2 foram imobilizados por acoplamento de amina a *chips* sensores Biosensor CM5 (Pharmacia), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos Fv de uma só cadeia (35 μ l; purificados por cromatografia de afinidade de metal imobilizado) foram injectados sobre o antigénio imobilizado a um caudal de 5 μ l/min. A quantidade de TGF- β ligado foi determinada como o aumento total em unidades de ressonância (UR) durante este período. Para os fragmentos Fv de uma só cadeia 6H1, 6A5 e 14F12, estes fragmentos deram um total de 686, 480 e 616 UR, respectivamente, para o *chip* sensor revestido com TGF- β 1 e 77,71 e 115 UR, respectivamente, para o *chip* revestido com TGF- β 2.

5. Construção de neutralizantes biológicos anti-TGF- β 1 com maior afinidade

a. Recombinacão de cadeias pesadas derivadas de scFv anti-TGF- β 1 de alta afinidade, com cadeias leves derivadas de scFv anti-TGF- β 1 e anti-TGF- β 2, apresentando boas propriedades

Os anticorpos derivados por "picagem" de CDR3 do anticorpo scFv, 1-B2 (secção 2b) ligam-se ao TGF- β 1 com uma afinidade elevada. Para melhorar a hipótese de obter anticorpos neutralizantes de afinidade elevada, decidiu-se



proceder a um rearranjo de cadeias de VH derivadas dos scFv anti-TGF- β 1 de afinidade elevada, com VL derivadas de clones de scFv com propriedades promissoras e particularmente com aquelas capazes de neutralizar a actividade do TGF- β 2 *in vitro*.

As cadeias pesadas foram amplificadas por PCR a partir de repertórios de clones de 1-B2 com CDR3 "picada", após selecção em TGF- β 1 (secção 2a.ii), utilizando os iniciadores pUC19reverse e PCR-H-Link (Tabela 1). As condições de amplificação consistiram em 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min e 72°C durante 1 min, seguido de 10 min a 72°C. O produto de PCR foi separado por meio de um gel a agarose a 1%-TAE, a banda que representa a VH amplificada foi excisada e eluída do gel de agarose, utilizando o estojo Geneclean (Bio 101).

As cadeias leves foram amplificadas separadamente por PCR de cada um dos neutralizantes específicos anti-TGF- β 1 (7-A3, 10-A6 e 14-A1; secção 2a.iii) e cada um dos neutralizantes específicos anti-TGF- β 2 (6H1, 6A5, 6B1, 11E6 e 14F-12); secção 4c) utilizando os iniciadores fdtetseq1 e PCR-L-Link (Tabela 1). Utilizaram-se as mesmas condições de PCR que as descritas para a amplificação de VH. Cada VL, produto de PCR, foi então purificada separadamente por meio de um gel agarose a 1%-TAE, como descrito acima. Os produtos purificados foram finalmente misturados em quantidades aproximadamente equimolares (estimado a partir de um gel de agarose analítico) para se obter um "banco" de VL.

Combinaram-se aproximadamente 50 ng de cadeias pesadas amplificadas e 50 ng de cadeias leves reunidas amplificadas e precipitou-se com acetato de sódio e etanol, utilizando 25 μ g de glicogénio como transportador. O ADN precipitado foi sedimentado por centrifugação a 13 000 rpm numa microcentrífuga, seca ao ar e ressuspensa em 23 μ l H₂O. Este foi utilizado numa amplificação de montagem, após a adição de tampão de reacção, dNTP até 200 nM e 5 unidades de *Taq* polimerase. As condições de amplificação consistiram em 20 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min e 72°C durante 2 min, seguido de 10 min a 72°C. Utilizaram-se 5 μ l da montagem como molde, numa amplificação de auxílio de 50 μ l, com os iniciadores fdtetseq e pUC19reverse. As condições de amplificação consistiram em 30 ciclos de



94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min e 72°C durante 2 min, seguido de 10 min a 72°C.

O produto da amplificação de auxílio foi separado através de agarose a 1%-TAE e a banda que representa o VH-VL de auxílio foi excisada e eluída utilizando o estojo Geneclean. Este foi digerido com as endonucleases de restrição Sfi I e Not I (NEB) e ligado ao vector fagemídeo pCantab 6 (McCafferty *et al.*, 1994 *supra*), previamente digerido com Sfi I e Not I, utilizando o sistema de ligação da Amersham. O produto de ligação foi utilizado para transformar células TG1 electrocompetentes, que foram plaqueadas em placas de 2YTAG e incubadas durante a noite a 30°C. Gerou-se um repertório de aproximadamente 3×10^6 clones individuais.

b. Seleccão de repertório de rearranjo de cadeias

O repertório de rearranjo de cadeias foi seleccionado através de um único ciclo de prospecção em TGF- β 1 (1 μ g/ml), como anteriormente descrito (secção 1b).

c. Identificação de anticorpos scFv específicos para TGF- β 1

Os anticorpos scFv específicos para TGF- β 1 foram identificados por ELISA em fagos e sequenciados como descrito anteriormente (secções 1d.i e 1e). Identificaram-se novos anticorpos scFv específicos para TGF- β 1. Isolaram-se cinco novos clones de afinidade elevada - CS32 que compreende VH de 31G9 e VL de 7A3; CS39 que compreende VH de 31G9 e VL de 6H1; CS37 que compreende VH de 31G9 e VL de 11E6 com uma substituição de Val por Ile no resíduo 2 (sequência de VL apresentada na Figura 14); CS35 que compreende a cadeia pesada de 31G9 com substituições de Gln por Glu no resíduo 1, Glu por Gln no resíduo 5 e VL de 14F12; e CS38 que compreende VH de 31G9 com substituições de Gln por Thr no resíduo 3, Gln por Glu no resíduo 5, Phe por Leu no resíduo 27, Asn por Ile no resíduo 56 e Gln por Arg no resíduo 105 e VL de 6A5.



d. Determinação da velocidade na dissociação para fragmentos Fv de uma só cadeia que se ligam a TGF-β1 e TGF-β2

As velocidades na dissociação para a ligação a TGF-β1 ou TGF-β2, dos fragmentos Fv de uma só cadeia descritos neste exemplo foram determinadas como descrito por Karlsson *et al.*, (R. Karlsson *et al.*, *J. Immunol. Methods* 145, 229-240, 1991). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2, juntamente com as constantes de dissociação para aqueles em que foram determinadas. Estes resultados indicam que se isolaram anticorpos de afinidade elevada.

6. Identificação e caracterização de um anticorpo que reage de forma cruzada com ambos os TGF-β1 e TGF-β2 humanos, mas não com TGF-β3 humano, por selecção de um repertório de scFv grandes.

a. Prospecção da biblioteca e identificação de ligantes

A biblioteca de scFv grandes (descrita anteriormente) foi induzida, as partículas de fagemídeo foram recuperadas e prospectadas como descrito anteriormente, com as seguintes modificações. Para o primeiro ciclo de prospecção, utilizaram-se 10^{12} fagos da biblioteca em 0,5 ml de PBS (em vez dos 2 ml *standard*), para o segundo ciclo utilizaram-se $3,5 \times 10^9$ fagos em 0,5 ml de PBS. O imuno-tubo foi revestido com 10 µg de TGF-β2 em 0,5 ml de PBS para ambos o primeiro e segundo ciclos de selecção. As colónias individuais da segunda selecção foram pesquisadas por ELISA utilizando TGF-β1 0,2 µg/ml. Os clones que se ligam a TGF-β1 foram adicionalmente pesquisados quanto a TGF-β2, TGF-β3, BSA e PBS. Os clones eram considerados específicos tanto para TGF-β1 como para TGF-β2, quando os sinais de ELISA gerados nos poços revestidos com TGF-β1 e TGF-β2 eram ambos, pelo menos cinco vezes maiores do que o sinal num poço de TGF-β3, BSA e não revestido.

c. Identificação de um anticorpo scFv que reage de forma cruzada com TGF-β1/TGF-β2

Foi identificado um único anticorpo scFv específico para ambos, TGF-β1 e TGF-β2, por ELISA quer em fagos, quer em solução, e este foi sequenciado



como descrito anteriormente. A sequência completa do domínio VL do gene do anticorpo VT37 é dada na Figura 4. A constante de dissociação deste anticorpo Fv de uma só cadeia foi estimada em 4 nM para TGF- β 1 e 7 nM para TGF- β 2, por análise utilizando BIACore™. Também se determinou a existência de reacção cruzada com TGF- β 3. O scFv VT37 purificado, a 8,3 μ g/ml, foi passado sobre *chips* sensores BIACore™, revestidos com TGF- β 1 (500 UR revestida); TGF- β 2 (450 UR revestida) ou TGF- β 3 (5500 UR revestida). A resposta relativa para a ligação de ScFv VT37 foi: TGF- β 1 - 391 UR ligado; TGF- β 2 - 261 UR ligado ou TGF- β 3 - 24 UR ligado. Assim, este anticorpo liga-se fortemente a TGF- β 1 e TGF- β 2 mas a ligação a TGF- β 3 não é detectável acima do ruído de fundo.

EXEMPLO 2

Construção de linhas celulares que expressam anticorpos completos

Para a construção de linhas celulares que expressam anticorpos IgG4, clonaram-se os domínios variáveis em vectores que expressam a região constante gama 4 humana, para os domínios VH ou as regiões constantes capa ou lambda humanas, para os domínios VL.

Para construir o anticorpo completo, IgG4 27C1/10A6 (específico para TGF- β 1), preparou-se ADN de VH de 27C1 a partir do clone isolado acima, no exemplo 1. O gene de VH foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleótidos VH3BackSfiEu e VHJH6ForBam (Tabela 1) com ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 1,5 min a 72°C. Após digestão com Sfil e BamHI, o gene de VH foi克隆ado no vector vh cassette2 (Figura 5) digerido com Sfil e BamHI. O ADN ligado foi transformado em *E. coli* TG1. Obtiveram-se colónias resistentes a ampicilina e as que contêm a inserção correcta foram identificadas por sequenciação de ADN.

Preparou-se ADN plasmídico a partir destas colónias e o ADN foi digerido com HindIII e BamHI. O fragmento de restrição HindIII-BamHI foi ligado no vector de expressão da cadeia pesada de IgG4 humana, pG4D100 (Figura 6), que tinha sido digerido com HindIII e BamHI e o ADN foi transfectado em *E. coli*



TG1 por electroporação. A sequência da inserção do gene VH foi mais uma vez verificada por sequenciação de ADN.

Para a cadeia leve, o gene de VL de 10A6, isolado no exemplo 1, foi primeiro submetido a mutagénese, para remover o seu local BamHI interno, utilizando mutagénese dirigida ao local (Amersham RPN1523) com o oligonucléotido DeltaBamHI (Tabela 1). O gene de VLDBamH1 resultante foi amplificado por PCR utilizando os oligonucléotidos Vλ3/4BackEuApa e HuJλ2-3ForEuBam (Tabela 1). Após digestão da inserção amplificada com ApaLI e BamHI, o gene de VL foi clonado no vector vlcassatteCAT1 (Figura 7), digerido com ApaLI e BamHI. O ADN ligado foi transformado em *E.coli* TG1. Obtiveram-se colónias resistentes a ampicilina e as que continham a inserção correcta foram identificadas por sequenciação de ADN.

Preparou-se ADN plasmídeo a partir destas colónias e o ADN foi digerido com HindIII e BamHI. O fragmento de restrição HindIII-BamHI que contém a sequência de comando e o domínio VL foi ligado no vector de expressão da cadeia leve lambda humana, pLN10 (Figura 8), que tinha sido digerido com HindIII e BamHI. Após electroporação, os transformantes em *E. coli* foram verificados por sequenciação de ADN.

Preparou-se ADN plasmídeo a partir do clone pG4D100-27C1 e do clone pLN10-10A6. Este ADN foi então co-transfetado em células de ovário de hamster chinês (CHO) DUKXB11, por electroporação (290V; 960 µF). As células foram em seguida crescidas durante 2 dias em meio não selectivo (alfa-MEM mais nucleósidos). As células foram em seguida transferidas para um meio selectivo (alfa-MEM mais 1 mg/ml de G418 sem nucleósidos) e crescidas em placas de 96 poços. As colónias foram então transferidas para placas de 24 poços e as amostras foram ensaiadas por ELISA sanduíche, quanto ao anticorpo IgG4 humano montado e por ligação a TGF-β1 em ELISA (como no exemplo 1). Para o ELISA sanduíche, revestiu-se a placa de ELISA com IgG anti-humano de cabra e o IgG4 humano capturado foi detectado utilizando a cadeia leve lambda anti-humana de cabra, conjugada com fosfatase alcalina. As linhas celulares de expressão elevada foram então derivadas por amplificação dos genes inseridos, utilizando selecção na presença de metotrexato (R.J. Kaufman, *Methods Enzymol.* 185 537-566, 1990).



O anticorpo completo IgG4 6H1 (específico para TGF- β 2) foi construído de um modo semelhante ao da construção de IgG4 27C1/10A6 acima descrita. O gene VH de 6H1 (exemplo 2) foi克lonado em pG4D100, como descrito acima para 27C1, excepto que a amplificação por PCR foi realizada com os oligonucleótidos VH3BackSfiEu e VHJH1-2FORBam. O gene de VL de 6H1 (exemplo 2) foi subclonado em vlcassatteCAT1 como acima, excepto que a amplificação por PCR foi realizada com os oligonucleótidos Vk2BackEuApa e HuJk3FOREuBam. No entanto, uma vez que VL de 6H1 é uma cadeia leve capa, o fragmento HindIII-BamHI foi subclonado no vector de expressão da cadeia leve capa humana, pKN100 (Figura 9), que tinha sido digerido com HindIII e BamHI. Isolaram-se então linhas celulares de expressão elevada como descrito acima. Os clones que expressam o anticorpo foram identificados a partir de placas de cultura por ELISA sanduíche quanto ao conjugado de anticorpo IgG4 humano montado (detectado utilizando conjugado de cadeia leve capa anti-humana de cabra e por ligação a TGF- β 2 em ELISA (como no exemplo 2).

Para construir os anticorpos completos IgG4 6A5 e IgG4 6B1, utilizou-se a mesma construção de VH de 6H1 em pG4D100 que para IgG4 6H1, uma vez que estes anticorpos têm todos o mesmo gene de VH. Os genes 6B1 e 6A5 foram, cada um subclonados em vlcassatteCAT1 como acima descrito para a cadeia leve de 10A6, excepto que a amplificação por PCR foi realizada com os nucleótidos V λ 3backeuApa e HuJ λ 2-3forEuBam. O fragmento de restrição HindIII-BamHI foi então subclonado em pLN10 como descrito acima. Os clones que expressam o anticorpo foram identificados a partir das placas de cultura por ELISA sanduíche quanto ao anticorpo IgG4 humano montado (detectado utilizando conjugado de cadeia leve capa anti-humana de cabra e por ligação a TGF- β 2 em ELISA (como no exemplo 2).

Propriedades das construções de anticorpos completos

Purificação de anticorpos completos

O sobrenadante isento de soro de células CHO que produzem o IgG relevante foi clarificado por centrifugação a 8000 rpm (Beckman JS2-21) antes da purificação. O sobrenadante foi aplicado numa coluna de afinidade



pré-compactada HiTrap, com proteína A-Sepharose de Pharmacia, de 1 ou 5 ml, com capacidades de ligação de 25 ou 120 mg, respectivamente. Cada IgG tinha uma coluna dedicada, para evitar qualquer potencial arrastamento de material de uma purificação para outra. A coluna foi equilibrada com solução salina tamponada com fosfato (PBS), com dez volumes de coluna de 1xPBS, antes de se aplicar o sobrenadante. Após todo o sobrenadante ter sido aplicado à coluna a um caudal de 2-4 ml/minuto, mais uma vez, dependendo do tamanho da coluna, a coluna foi lavada com dez volumes de coluna de 1xPBS para remover qualquer material ligado de forma não específica. A eluição da proteína ligada foi conseguida utilizando acetato de sódio 0,1 M, ajustado para pH 3,3 com ácido acético glacial. O material eluído foi recolhido em 8 fracções de 1,5 ml de volume e a quantidade de proteína foi determinada por medição da absorvância a 280 nm e multiplicando este valor por 0,7, para se obter o valor em mg/ml. Este foi então neutralizado com 0,5 ml de Tris-HCl 1M pH 9,0 por fracção de 1,5 ml e as fracções contendo proteína foram reunidas e dialisadas contra 1xPBS para permitir o tampão de IgG. A coluna foi acertada de novo para pH neutro, fazendo correr 10 volumes de coluna de 1xPBS e esta foi armazenada em 20% de etanol como conservante, até ser novamente necessária.

Analisou-se de seguida uma amostra em SDS-PAGE a 10-15% (Phast system, Pharmacia) e corou-se com prata. Isto permitiu determinar a pureza da preparação de IgG. Verificou-se que esta era normalmente de cerca de 80-90% com apenas algumas outras bandas proeminentes visíveis no gel corado.

Especificidade de ligação por ELISA

Mostrou-se que os anticorpos IgG4 6B1 e 6A5 se ligavam a TGF- β 2 com uma reactividade cruzada com TGF- β 1 e TGF- β 3 muito baixa e sem reactividade cruzada, detectável, com vários抗ígenos não específicos: interleucina-1; linfotoxina humana (TNF β); insulina humana; albumina de soro humano; ADN de cadeia simples; oxazolona-albumina de soro bovino ; hemocianina de lapa do género *Fissurella*; inibidor de tripsina da clara do ovo de galinha; quimiotripsinogénio; citocromo c; gliceraldeído fosfato desidrogenase; ovalbumina; lisozima de ovo de galinha; albumina de soro bovino e factor a de necrose tumoral - (TNFa) (Figura 13(a) e (b)) - Igualmente, os anticorpos IgG4 6B1, 6A5 e 6H1 ligaram-se fortemente a TGF- β 2 que revestia um *chip* sensor



BIACoreTM, mas não se ligaram significativamente a *chips* revestidos com TGF- β 1 ou TGF- β 3.

Propriedades de ligação de anticorpos completos por BIACoreTM

As constantes de afinidade dos anticorpos acima foram determinadas por BIACoreTM, utilizando o método de Karlsson *et al.*, *J. Immunol. Methods* 145, 299-240, 1991 (*supra*) e verificou-se que eram aproximadamente 5 nM para IgG4 27C1/10A6 para TGF- β 1 e 2 nM para IgG4 6H1 para TGF- β 2. O anticorpo IgG4 27C1/10A6 também apresenta alguma reactividade cruzada com TGF- β 2 que revestia *chips* Biosensor, mas a constante de dissociação é aproximadamente dez vezes, ou mais, superior para TGF- β 2, em comparação com TGF- β 1. Não se observou nenhuma reacção cruzada significativa com lisozima que revestia um *chip* sensor BIACoreTM.

A neutralização e a inibição de ligação a radiorreceptores por anticorpos IgG4 contra TGF- β 1 e TGF- β 2 é descrita nos exemplos 3 e 4.

EXEMPLO 3

Neutralização por anticorpos do efeito inibidor de TGF- β 1 e TGF- β 2 na proliferação celular

A actividade neutralizante dos anticorpos descritos nos exemplos 1 e 2 foi testada numa modificação de um bioensaio para TGF- β , como descrito por Randall *et al.*, (1993) *J. Immunol Methods* 164, 61-67. Este ensaio baseia-se na capacidade do TGF- β 1 e do TGF- β 2 inibirem a proliferação induzida por interleucina-5, da linha celular de eritroleucemia, TF1 sendo possível inverter esta inibição com anticorpos específicos para TGF- β .

Método

Células e manutenção

A linha celular de eritroleucemia humana, TF1, foi crescida em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal de vitela, penicilina/estreptomicina e



rhGM-CSF 2 ng/ml numa incubadora humidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C. As culturas foram passadas quando atingiram uma densidade de 2x10⁵/ml e diluídas até uma densidade de 5x10⁴/ml.

Citóquinas e anticorpos

O rhGM-CSF e o rhIL-5 foram obtidos de R&D Systems, o rhTGF-β₂ foi obtido de AMS Biotechnology. O anticorpo anti-TGF-β₂ de coelho era de R&D Systems e o anti-TGF-β_{1,2,3} de rato era de Genzyme. Os outros anticorpos contra TGF-β₂ eram como descrito nos exemplos 1&2.

Titulação da inibição da proliferação por TGF-β2

Prepararam-se diluições de duplicação de TGF-β2 (800 pM - 25 pM) para a construção de uma curva de dose-resposta, numa placa de microtítulo estéril, em 100 µl de meio RPMI 1640 contendo 5% de soro fetal de vitela e antibióticos. Todas as diluições foram realizadas pelo menos em quadruplicado. Também se incluíram outros poços contendo 100 µl do meio acima descrito, para os controlos de reagentes e de apenas células.

As células TF1 foram lavadas duas vezes em meio RPMI 1640 isento de soro e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal de vitela, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml e rhIL-5 4 ng/ml, a uma densidade de 2,5x10⁵/ml. Adicionaram-se alíquotas de 100 µl às séries de diluições previamente preparadas e a placa foi incubada durante 48h numa incubadora humidificada, contendo 5% de CO₂ a 37°C.

A proliferação celular foi medida colorimetricamente por adição de 40 µl de substrato CellTiter96 (Promega), recolocando a placa na incubadora mais 4h e determinando, por fim, a absorvância a 490 nm. Calculou-se então a percentagem de inibição para cada concentração de TGF-β2, em comparação com os poços contendo apenas células.



Ensaio para a neutralização da actividade inibidora de TGF-β2 por anticorpos anti-TGF-β2

A neutralização de TGF-β2 foi determinada fazendo diluições de duplicação de cada anticorpo purificado em 100 µl de meio, como acima. Adicionou-se TGF-β2 a cada diluição de anticorpo para se obter uma concentração final equivalente à que originou 50% de inibição na titulação acima descrita. Preparou-se cada diluição em quadruplicado. Prepararam-se poços adicionais de controlo, contendo apenas anticorpo, apenas células e reagente. A preparação de células e a determinação da proliferação celular foram realizadas como acima descrito.

Resultados

Verificou-se que o TGF-β2 inibe a proliferação de células TF1 em 50% a uma concentração de 50 pM. Esta concentração foi utilizada para todas as experiências de neutralização.

Estes ensaios mostraram que a actividade de TGF-β2 foi neutralizada de um modo dependente da dose tanto para os fragmentos scFv (figura 10) como para os anticorpos IgG4 completos (figura 11). A concentração de anticorpo que originou 50% de inibição foi determinada a partir dos gráficos e é apresentada na Tabela 4.

EXEMPLO 4

Inibição por anticorpos de TGF-β que se liga a receptores, medida num ensaio com radiorreceptores

Expressaram-se e purificaram-se fragmentos Fv de uma só cadeia e anticorpos IgG4 completos de diferentes clones e mediou-se a sua capacidade para inibir a ligação de TGF-β a receptores, num ensaio com radiorreceptores.

Purificação de scFv

Os scFv que contêm uma cauda de poli-histidina são purificados por cromatografia de afinidade com metal imobilizado. O clone bacteriano que



contém o plasmídeo adequado é inoculado em 50 ml de meio 2TY contendo glucose a 2% e ampicilina 100 µg/ml (2TYAG) e crescido durante a noite a 30°C. No dia seguinte, a cultura é adicionada a 500 ml de 2TYAG pré-aquecido e crescida a 30°C durante 1h. As células são recolhidas por centrifugação e adicionadas a 500 ml de 2TY contendo ampicilina e IPTG 1 mM e são crescidas a 30°C durante 4 horas. As células são então recolhidas por centrifugação e são ressuspensas em 30 ml de Tri-HCl 50 nM, pH 8,0, arrefecido em gelo, sacarose a 20% (p/v), EDTA 1 mM. Após 15 min de mistura por rotação na direcção longitudinal a 4°C, a mistura é centrifugada a 12 k rpm durante 15 min a 4°C. O sobrenadante é removido e adiciona-se-lhe 1 ml de NTA-agarose (Qiagen 30210) e mistura-se a 4°C durante 30 min. As pérolas de agarose são lavadas exaustivamente com fosfato de sódio 50 nM, NaCl 300mM e carregadas numa coluna pequena. Após nova lavagem com fosfato de sódio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazolo 10 mM pH 7,4, o scFv é eluído com fosfato de sódio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazolo 250 mM pH 7,4, recolhem-se fracções de 0,5 ml e as fracções contendo proteína são identificadas medindo a A₂₈₀nm. As fracções reunidas são concentradas e o scFv é ainda purificado por filtração em gel em PBS, numa coluna Superdex 75 (Pharmacia).

Purificação de anticorpos completos

Os anticorpos IgG4 completos foram purificados como descrito no Exemplo 2

Ensaio com radiorreceptores para TGF-β

A neutralização da actividade de TGF-β é medida pela capacidade dos scFv e dos IgG inibirem a ligação de TGF-β marcado com ¹²⁵I aos seus receptores em células de carcinoma pulmonar humano A549.

As células A549 (ATCC CCL 185) são crescidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco com um teor elevado de glucose (Sigma D-6546) suplementado com soro fetal de vitela a 10% (PAA), glutamina 2 mM (Sigma G-7513), penicilina/estreptomicina (Sigma P-0781), aminoácidos não essenciais em MEM (Sigma M-7145).



As células são semeadas a $1-2 \times 10^5$ células /ml/poço em placas em cachos de 24 poços e crescidas durante 24 horas em DMEM isento de soro. As monocamadas de células são lavadas duas vezes com DMEM isento de soro e 0,5 ml de meio de ligação (DMEM/Hams F12 (Sigma D-6421) contendo BSA a 0,1% (v/v), adicionado a cada poço.

Faz-se a incubação prévia de alíquotas de ^{125}I -TGF- β 1 ou - β 2 (70-90 TBq/mmol; Amersham International) a 20 pM com anticorpo em meio de ligação à temperatura ambiente, durante 1h. Adicionam-se então amostras em duplicado de 0,5 ml de TGF- β /anticorpo às monocamadas de células e incuba-se a 37°C durante 1-2h. Os poços de controlo contêm apenas TGF- β . O TGF- β não ligado é removido por lavagem, 4 vezes, com solução salina equilibrada de Hank, contendo BSA a 0,1%. As células são solubilizadas em 0,8 ml de Tris-HCl 25 mM pH 7,5, glicerol a 10%, Triton X-100 a 1%, à temperatura ambiente durante 20 min. Os conteúdos de cada poço são removidos e mede-se o ^{125}I num contador gama. A potência de cada scFv ou IgG é medida pela concentração de locais de combinação de anticorpo necessária para inibir a ligação de TGF- β em 50% (IC50; Tabela 5). Assim, os valores de IC50 estão abaixo de 10 nM e nalguns casos abaixo de 1 nM, indicando anticorpos muito potentes.

EXEMPLO 5

Prevenção da formação de cicatrizes por anticorpos contra TGF- β 1 e TGF- β 2 no sistema nervoso central lesionado de rato

Logan *et al.*, (1994) *Eur. J. Neuroscience* 6,355-363 mostraram, num modelo de rato de lesão do CNS, o efeito de melhoria de um anti-soro neutralizante de peru, dirigido contra TGF- β 1 na deposição de tecido fibroso de cicatriz e formação de uma membrana glial limitante que contorna a lesão. Realizou-se um estudo para investigar os efeitos de anticorpos humanos manipulados, neutralizantes, dirigidos contra ambos, TGF- β 1 e TGF- β 2, no mesmo modelo de rato. A derivação dos anticorpos utilizados neste estudo é descrita nos exemplos 1 e 2.



Método

Animais e cirurgia

Anestesiaram-se grupos de 5 ratos fêmea Sprague-Dawley (250 g) com uma injecção i.p. Os ratos anestesiados têm uma lesão definida estereotacticamente, produzida no córtex occipital direito (Logan *et al.*, 1992 *Brain Res.* 587, P216-227) e inseriu-se cirurgicamente uma cânula no ventrículo lateral, exteriorizando-a ao mesmo tempo (Logan *et al.*, 1994, *supra*).

Neutralização de TGF-β

Injectou-se intraventricularmente nos animais, diariamente, 5 µl de anticorpos anti-TGF-β purificados (tabela 3) diluídos num veículo de fluido cerebrospinal artificial, como descrito por Logan *et al.*, 1994, *supra*. Catorze dias após a lesão, todos os animais foram fixados por perfusão e processaram-se secções em cera de poliéster de 7 mm, para avaliação histoquímica do local da lesão, por coloração imunofluorescente.

Análise imuno-histoquímica de fluorescência e por imageologia

As alterações morfológicas no local da ferida foram seguidas por coloração imunofluorescente com anticorpos contra fibronectina e laminina detectados com conjugados de FITC anti-espécies (Logan *et al.*, 1994, *supra*). Estas alterações foram determinadas semi-quantitativamente por análise imageológica utilizando um microscópio confocal Leitz, ligado a um sistema de varrimento laser Biorad MRC500. As leituras foram feitas em posições *standard* a meio caminho ao longo da lesão.

Resultados

Efeitos de anticorpos contra TGF-β no local da lesão no CNS

A quantificação da fluorescência relativa específica, para cada um dos anticorpos, é apresentada na figura 12 a e b. A laminina é uma medida da formação da limitante glial externa nas fronteiras da ferida e, juntamente com a



fibronectina, forma uma matriz de tecido fibroso no centro da ferida. A quantificação destas duas proteínas por análise imageológica, permite determinar o grau de cicatriz no local da ferida.

Comparando com o controlo de solução salina (fig 12 a,b), há um decréscimo considerável da imuno-localização de fibronectina e laminina na ferida, nos cérebros tratados com anticorpo anti-TGF- β . Assim, isto indica que estes anticorpos humanos manipulados, dirigidos contra epítopos em TGF- β 1 & TGF- β 2 melhoram os efeitos da lesão no CNS, tanto separadamente, como em conjunto, por prevenirem a deposição das proteínas de matriz celular, fibronectina e laminina no local da ferida. Anteriormente, Logan *et al.*, (1994 *supra*) demonstraram a eficácia de um anti-soro policlonal de perú dirigido contra TGF- β 1. Esta é a primeira referência a anticorpos dirigidos contra TGF- β 2 que se demonstrou serem eficazes neste modelo.

EXEMPLO 6

Determinação da ligação de IgG4 6B1 à forma activa ou latente de TGF- β 2

O TGF- β 2 é sintetizado e segregado exclusivamente como um complexo biologicamente inactivo, ou latente (Pircher *et al.*, (1986) *Biochem. Biophys Res. Commun.* 158, 30-37). O complexo latente consiste num homodímero de TGF- β 2 ligado por dissulfureto, associado de forma não covalente ao péptido associado à latência (LAP). A activação de TGF- β 2 ocorre quando este é libertado do seu precursor processado. O TGF- β 2 activo é capaz de se dissociar e re-associar de forma reversível ao LAP, o que resulta no "ligar" e "desligar" da sua bioactividade, respectivamente.

Verificou-se que células de adenocarcinoma PC-3 cultivadas (Ikeda *et al.*, (1987) *Biochemistry* 26, 2406-2410) segregam quase exclusivamente o TGF- β 2 latente, fornecendo uma fonte conveniente para a determinação da ligação à forma activa ou latente de TGF- β 2, pelo anticorpo IgG4 6B1.



Método

Cultura de células

Cresceram-se células de adenocarcinoma prostático PC-3 até à confluência, em meio suplementado com FBS a 10%. As células foram lavadas 3x com PBS e fez-se a cultura das células por mais 7 dias em Hams F12/DMEM isento de soro, suplementado com $1,4 \times 10^{-5}$ M de tamoxifen (Brown *et al.*, (1990) *Growth Factors* 3, 35-43). O meio foi removido, clarificado por centrifugação e dividido em duas alíquotas de 15 ml. Acidificou-se uma alíquota durante 15 min com HCl 5 M adicionando gota a gota até se obter pH = 3,5 e em seguida neutralizou-se por adição semelhante de NaOH 5 M/HEPES 1 M pH 7,4. Este processo activa o TGF-β2 latente, quantitativamente.

ELISA de competição

Revestiram-se dezasseis poços de uma placa de ELISA, durante a noite, com 100 µl de TGF-β2 200 ng/ml em PBS, a 4°C. A placa foi lavada 3x com PBS-Tween e bloqueada a 37°C com 200 µl de Marvel a 3% em PBS.

Incubaram-se as seguintes amostras à temperatura ambiente, durante 1 hora.

400 µl de Hams F12/DMEM (branco de reagente)

400 µl de Hams F12/DMEM mais 4 µg de anticorpo IgG4 6B1 (controlo positivo)

400 µl de meio condicionado PC 3, activado com ácido, mais 4 µg de anticorpo IgG4 6B1 (amostra de TGF-β2 activo)

400 µl de meio condicionado não tratado com PC3 mais 4 µg de anticorpo IgG4 6B1 (amostra de TGF-β2 latente)

A placa de ELISA foi esvaziada de solução bloqueadora e adicionaram-se 100 µl de uma das soluções acima, a poços sensibilizados, em quadruplicado, e incubou-se à temperatura ambiente durante 2 horas. A placa foi lavada 3x com PBS/Tween e os poços foram cheios de novo com 100 µl de cadeia γ de IgG anti-humano de cabra conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:5000 em



Marvel a 1% /PBS. Após uma hora, os poços foram lavados 3x com PBS/Tween e o anticorpo ligado foi revelado com substrato *p*-NPP por absorbância a 405 nm.

Resultados

Os resultados desta experiência são apresentados na Figura 23.

Este resultado mostra claramente que a pré-incubação com TGF- β 2 activado inibe a ligação de 6B1 a TGF- β 2 ligado numa placa de ELISA, enquanto que a forma latente não. Isto prova que o IgG4 6B1 apenas se liga à forma activa de TGF- β 2.

EXEMPLO 7

Neutralização por anticorpos dirigidos contra TGF- β 2, do efeito inibidor de isoformas de TGF- β na proliferação celular

A actividade de neutralização de IgG4 6B1, IgG4 6H1 (purificado como no exemplo 2) e um anticorpo monoclonal de ratinho (Genzyme; J.R. Dasch *et al.*, *supra*) foi medida para cada uma das isoformas de TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 3 e TGF- β 3 no ensaio de proliferação celular em TF1 descrito no Exemplo 3. A concentração da isoforma de TGF- β era de 100 pM em cada ensaio.

Como se pode ver na figura 16, o IgG4 6B1 neutraliza fortemente o TGF- β 2 com uma IC₅₀ de aproximadamente 2 nM (Tabela 6). Este valor é comparável a 10 nM para o monoclonal de ratinho da Genzyme e 12 nM para IgG4 6H1. Nem o IgG4 6B1, nem o IgG4 6H1 neutralizam de forma significativa o TGF- β 1 (Fig. 17). No entanto, há uma neutralização significativa do TGF- β 3, tanto pelo 6B1 (IC₅₀ de ca. de 11 nM) como pelo IgG4 6H1 de ca. de 20 nM; Fig.18). Este valor é consideravelmente inferior à potência de neutralização do monoclonal da Genzyme (IC₅₀ ca. 0,1 nM).

Tanto o IgG4 6B1 como o IgG4 6H1 são neutralizantes mais fortes da actividade de TGF- β 2, do que da actividade de TGF- β 3. A neutralização da actividade de TGF- β 3 é maior do que se previa a partir da ligação relativa destas



duas isoformas pelos anticorpos (exemplo 2) e da ligação relativa num ensaio com radiorreceptores (exemplo 8).

EXEMPLO 8

Inibição da ligação de outras isoformas de TGF- β a receptores, por anticorpos dirigidos contra TGF- β 2, medida num ensaio com radiorreceptores

A capacidade do IgG4 6B1 inibir a ligação de isoformas de TGF- β aos receptores foi medida num ensaio com radiorreceptores, como descrito no exemplo 4.

O IgG4 6B1 inibiu a ligação de ^{125}I -TGF- β 2 com uma IC_{50} de 0,05 nM. Não houve nenhuma inibição significativa da ligação de ^{125}I -TGF- β 1, enquanto que para o ^{125}I -TGF- β 3, o IgG4 6B1 inibiu a ligação com uma IC_{50} de aproximadamente 4 nM (Tabela 6). Isto indica a potência do IgG4 6B1 neste ensaio e a sua selectividade para a neutralização da actividade de TGF- β 2. A reacção cruzada com TGF- β 3 neste ensaio é inferior a 2%.

Assim, o IgG4 6B1 inibe preferencialmente a ligação de TGF- β 2 aos seus receptores, em comparação com a ligação de TGF- β 3.

EXEMPLO 9

Determinação de anticorpos para TGF- β 1 para utilização terapêutica

Os anticorpos isolados no Exemplo 1 foram avaliados quanto a um potencial valor terapêutico por medições *in vitro* da capacidade de inibirem a ligação de TGF- β 1 aos seus receptores e propriedades de ligação *in vitro*.

No exemplo 4 (Tabela 5) o CS32 apresentou a inibição mais forte dos anticorpos testados, da ligação de ^{125}I -TGF- β 1 a receptores em células A549. Foi feita uma outra comparação entre o CS32 e outros anticorpos (CS35, CS37 e CS38) que foram isolados como descrito na experiência do Exemplo 1, secção 5c. Esta mostrou que o CS37 parece ser o mais potente destes anticorpos neste ensaio, com uma IC_{50} de aproximadamente 8 nM, em comparação com



40 nM para CS32. O valor de IC₅₀ para CS32 é maior do que no ensaio anterior (Tabela 5) porque a *Natureza* do ensaio significa que o valor absoluto de IC₅₀ pode variar com as condições do ensaio.

Os anticorpos 1A-E5 e 1AH-6 (Exemplo 1, secção 1f) e os anticorpos derivados a partir destes eram muito menos potentes que os anticorpos derivados de 1B2 na neutralização da actividade de TGF-β1, neste ensaio com radiorreceptores.

Assim, o CS37 era o anticorpo candidato mais potente, tal como determinado por inibição da ligação de ¹²⁵I-TGF-β1 ao seu receptor.

Determinação da ligação a TGF-β3 por anticorpos anti-TGF-β1

Verificou-se que os anticorpos 14A1 e 10A6 (Exemplo 1, secção 2 (a) (iii)) se ligam preferencialmente a TGF-β1, relativamente a TGF-β2 e TGF-β3, utilizando o mesmo ELISA de especificidade que o descrito no Exemplo 1, secção 1 (d) (iii), excepto que as placas de microtítulo foram revestidas com 50 µl, de TGF-β1 0,2 µg/ml; TGF-β2 0,2 µg/ml; TGF-β3 0,2 µg/ml; albumina de soro bovino (BSA) 10 µg/ml ou PBS (poço não revestido). Verificou-se que os clones eram específicos para TGF-β1, uma vez que o sinal gerado no poço revestido com TGF-β1 era pelo menos cinco vezes maior do que o sinal com TGF-β2 e TGF-β3.

Os anticorpos derivados da mesma linhagem de 1B2 que estes anticorpos, como o IgG4 27C1/10A6 (que contém o mesmo VL que o 10A6 e o VH de 27C1 foi preparado por mutagénese de resíduos de CD3) deverão ter a mesma reactividade cruzada contra o TGF-β3

EXEMPLO 10

Construção de uma linha celular de expressão elevada para IgG4 6B1 utilizando o sistema de selecção de glutamina-sintetase e avaliação num ensaio de neutralização



Construção de p6H1 VH gamma4

O VH de 6B1 foi amplificado a partir de 6H1 pG4D100 (Exemplo 2) por PCR utilizando os oligonucleótidos P16 e P17. Este ADN foi ligado por PCR com um fragmento de ADN de 158pb de M13VHPCR (R. Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 3833-3837, 1989) contendo uma sequência de sinal, locais de união e um intrão, utilizando os oligonucleótidos P10 e P17. O produto de PCR foi cortado com HindIII e Apal e clonado em pGamma4 cortado com HindIII-Apal (Lonza Biologics plc). Identificou-se um plasmídeo com a inserção correcta e designou-se por 6H1 VH gamma4 (veja-se figura 20). O gene de VH e as regiões flanqueadoras foram sequenciados nesta fase.

Construção de 6B1ΔBam pLN10

O gene de VL de 6B1 foi amplificado a partir do clone de scFv 6B1 em pCANTAB6 (Exemplo 1) e subclonado em pUC19. O gene VL foi então mutado por mutagénese *in vitro*, para remover um local BamHI interno, modificando a sequência de ADN, mas não a sequência da proteína. A mutagénese *in vitro* foi realizada utilizando o oligonucleótilo LamDeltaBamHI (Tabela 1), utilizando um estojo da Amersham International plc. O gene de VL mutado foi amplificado utilizando os iniciadores Vλ3backEuApa e HuJλ2-3ForEuBam e sub-clonado como um fragmento ApaLI-BamHI no vector vlcassetteCAT1. O gene de VL foi então clonado como um fragmento HindIII-BamHI no vector pLN10 (figura 8), para gerar o vector 6B1ΔBampLN10.

Construção de p6B1λ

O gene de Vλ de 6B1 foi amplificado por PCR a partir de p6B1ΔBampLN10 utilizando os oligonucleótidos P22 e P26. O gene de Cλ foi amplificado por PCR a partir de pLN10-10A6 (Exemplo 2) utilizando os oligonucleótidos P25 e P19. Os 2 ADN foram ligados por PCR de sobreposição utilizando os oligonucleótidos P22 e P19 e o produto foi cortado com BstBI e EcoRI e clonado em pMR15.1 cortado com BstBI-EcoRI (Lonza Biologics plc). Identificou-se um plasmídeo com a inserção correcta e designou-se por p6B1λ (Figura 21).



Construcão do vector de expressão final p6B1gamma4gs

O p6H1 VHgamma4 e o p6B1 λ foram digeridos com BamHI e NotI, os fragmentos foram purificados e ligados uns aos outros. Identificou-se um plasmídeo com a configuração desejada a partir dos transformantes e designou-se por p6B1gamma4gs (Figura 22).

Transfeccão de NS0 com p6B1 gamma4gs

Os transfectantes estáveis que segregam IgG4 6B1 foram seleccionados introduzindo p6B1 em células de mieloma NS0, o qual inclui o gene da glutamina-sintetase (gs) que permite o crescimento em meio isento de glutamina (G-) (C. R. Bebbington *et al.*, *Bio/Technology* **10** 169-175, 1992). Linearizaram-se 40 µg de 6pB1 gamma4gs por digestão com Pvul. O ADN foi electroporado em $1,5 \times 10^7$ células NS0. As células foram então adicionadas a DMDM G+/FCS a 10% e distribuíram-se alíquotas de 50 µl em 6 placas de 96 poços e deixou-se recuperar durante 24h. O meio foi então tornado selectivo por adição de 150 µl de DMEM G-/FCS a 10%. Três semanas mais tarde, pesquisaram-se os transfectantes gs⁺ por ELISA, quanto à capacidade de segregar o anticorpo IgG4 λ humano. Os que produziam em maior quantidade foram expandidos e posteriormente analisados. Desta análise seleccionou-se 5D8 como a linha celular de produção candidata. O 5D8 foi clonado uma vez por diluição limitante, para se obter a linha celular 5D8-2A6.

Avaliação de IgG4 6B1 derivado da linha celular 5D8-2A6 no ensaio de neutralização em TF1

O IgG4 6B1 foi purificado a partir da linha celular GS/NS0 5D8-2A6 em meio isento de soro, como descrito no Exemplo 2. O anticorpo IgG4 6B1 foi avaliado no ensaio de neutralização em TF1 como descrito no Exemplo 3. Obteve-se um valor de IC₅₀ de 1,8 nM neste ensaio. Ensaios subsequentes de preparações de IgG4 6B1 derivadas a partir da linha celular 5D8-2A6 indicaram valores de IC₅₀ na gama de 0,65 a 2 nM. Estes são comparáveis aos valores obtidos para o IgG4 6B1 produzido a partir de células CHO (Exemplo 2) e são favoráveis, em comparação com os obtidos para IgG4 6H1, derivado a partir de uma linha celular CHO (IC₅₀ de 15 nM). Os valores obtidos para a IC₅₀ para IgG4



6B1 e IgG4 6H1 neste exemplo são de maior confiança que os obtidos no Exemplo 3 e apresentados na tabela 4, como resultado de melhorias no ensaio e na expressão e purificação dos anticorpos. Pode-se esperar, no entanto, que o valor de IC₅₀ varie com as condições exactas do ensaio.

Assim, o IgG4 6B1 proporciona uma neutralização potente do TGF-β2 e é adequado para utilização como agente terapêutico.

EXEMPLO 11

Determinação do epítopo em TGF-β2 para o anticorpo 6B1 utilizando uma biblioteca de exibição de péptidos em fagos

O anticorpo 6B1 foi ainda caracterizado por mapeamento de epítópos. Isto foi feito utilizando uma biblioteca de exibição de péptidos em fagos para seleccionar sequências de péptidos que se ligam especificamente a 6B1. Estas sequências peptídicas foram então comparadas com a sequência de aminoácidos de TGF-β2. A correlação entre as sequências peptídicas que se ligam a 6B1 e as partes condizentes da sequência de aminoácidos de TGF-β2 indicam um epítopo de TGF-β2 ao qual o 6B1 se liga. Um "epítopo" é a parte na superfície de um antigénio à qual se liga um anticorpo específico.

Neste exemplo, a biblioteca de péptidos utilizada foi construída como descrito por Fisch *et al.*, (I. Fisch *et al.*, (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** 7761-7766) para se obter uma biblioteca de exibição de péptidos em fagos de 1x10¹³ clones independentes. Os péptidos exibidos em fagos que se ligam ao anticorpo 6B1 foram seleccionados a partir desta biblioteca por prospecção. Esta foi realizada como descrito no Exemplo 1.

O anticorpo IgG4 6B1 purificado a 10 µg/ml em 4 ml de PBS foi revestido num tubo de plástico (Nunc; maxisorp) por incubação durante a noite a 4°C. Após lavagem e bloqueio com MPBS (veja-se Exemplo 1) adicionou-se ao tubo uma alíquota da biblioteca de péptidos contendo 5x10³ fagos em 4 ml de MPBS a 3% e incubou-se à temperatura ambiente, durante 1,5 horas. O tubo foi lavado 10 vezes com PBST (0,1%), em seguida dez vezes com PBS. As partículas fágicas ligadas foram eluídas do tubo por adição de 4 ml de



trietilamina 100 mM e incubação do tubo, de forma estacionária, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Os fagos eluídos foram então adicionados a um tubo contendo 2 ml de Tris-HCl 1M (pH 7,4) e 10 ml de caldo 2YT. Os fagos foram então adicionados a 20 ml de células de *E. coli* TG1 em crescimento na fase logarítmica e crescidos durante uma hora, agitando a 100 rpm a 37°C. As células infectadas foram então plaqueadas em meio de ágar 2YT com tetraciclina a 15 µg/ml, em placas de 243 mmx243 mm (Nunc). As placas foram incubadas a 30°C durante 18 horas. As colónias foram raspadas das placas para 10 ml de caldo 2YT contendo 15% (v/v) de glicerol, para armazenamento a -70°C.

Utilizaram-se 250 µl de células do primeiro ciclo de selecção para inocular 500 ml de caldo 2YT (contendo tetraciclina 15 µg/ml) num frasco cónico de 2 litros e estas foram crescidas durante a noite a 30°C, com agitação a 280 rpm. Recolheu-se uma alíquota de 2 ml desta cultura e centrifugou-se para remover todas as células. Utilizou-se 1 ml deste sobrenadante de fagos para um segundo ciclo de selecção, como descrito acima. O padrão do crescimento de fagos e prospecção foi repetido um terceiro e um quarto ciclos de selecção.

As colónias individuais do quarto ciclo de selecção foram utilizadas para inocular 100 µl de caldo 2YT (contendo tetraciclina 15 µg/ml), em poços individuais de placas de cultura de tecidos de 96 poços e foram crescidas durante a noite com agitação suave a 100 rpm, a 30°C. Adicionou-se glicerol a uma concentração final de 15% (v/v) e estas placas principais foram armazenadas congeladas a -70°C.

Estes clones foram pesquisados quanto a clones que se ligam especificamente ao anticorpo 6B1 em ELISA. As células das placas principais foram utilizadas para inocular placas de cultura de tecidos de 96 poços contendo 100 µl de caldo 2YT (contendo tetraciclina 15 µg/ml) por poço e foram crescidas durante a noite com agitação suave a 100 rpm, a 30°C. As placas foram então centrifugadas a 2000 rpm. Os 100 µl de sobrenadante de fagos de cada poço foram recuperados e cada um foi misturado com 100 µl de leite em pó magro a 4% em 2xPBS. Testaram-se então 100 µl de cada um destes por ELISA em fagos. Revestiram-se com anticorpo IgG4 6B1 a 10 µg/ml em PBS, placas de microtítulo flexíveis, por incubação durante a noite a 4°C.



Também se preparam placas de controlo, revestidas com um anticorpo IgG4 irrelevante a 10 µg/ml. Os ELISA foram realizados como descrito no Exemplo 1 e visualizados com o substrato cromogénico pNPP (Sigma).

Aproximadamente 20% de todos os clones analisados ligaram-se à placa revestida com 6B1. Nenhum dos clones analisados se ligou às placas ELISA revestidas com o anticorpo irrelevante. A ligação parece ser, portanto, específica para o local de ligação do anticorpo 6B1.

Os clones que se ligam a 6B1 foram analisados por sequenciação de ADN como descrito por Fisch *et al.* Sequenciaram-se um total de 31 clones diferentes. Estes foram analisados quanto a possíveis concordâncias com a sequência de TGF-β2, utilizando o *software* de Mac Vector. De entre estes clones, 12 apresentaram uma concordância fraca com a sequência de TGF-β2 e 10 não apresentavam nenhuma semelhança. No entanto, havia 4 clones diferentes (alguns dos quais tinham sido seleccionados mais que uma vez), que apresentavam uma concordância razoável com a região da sequência de TGF-β2 entre as posições de aminoácidos 56 a 69. A Tabela 8 mostra a sequência de aminoácidos do exão de cada um destes clones, que parece ser responsável pela ligação a 6B1.

Nenhum destes clones condiz exactamente com a sequência de TGF-β2, nem existe uma única sequência de consenso óbvia entre os clones de péptidos. Apesar de tudo, uma avaliação cuidadosa das sequências revela uma concordância com os resíduos 60 a 64 de TGF-β2 (Tabela 8). O alinhamento de quatro clones com L na posição 64 revela 2 clones com R na posição 60, 1 clone com V na posição 61, 2 com L na posição 62 e 3 com S na posição 63. Isto proporciona a sequência RVLSL correspondente aos resíduos 60 a 64, que formam parte da hélice alfa que forma a região calcaneal de TGF-β2. Não é de esperar que um anticorpo que reconhece esta estrutura faça contacto com todos os resíduos de aminoácidos na hélice e assim, um péptido que imite esta sequência poderá ter variações de sequência consideráveis em posições que correspondem a partes da hélice que não fazem contacto. Pensa-se que a hélice alfa reconhecida faz parte da região da ligação ao receptor de TGF-β2 (D.L. Griffith *et al.*, (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 878-883).



EXEMPLO 12

Determinação da ligação de IgG4 6B1 a TGF- β 2, por imuno-histoquímica, em tecido de mamífero e ausência de reactividade cruzada

Para detectar o TGF- β 2 em secções de tecidos que expressam a citóquina, fixadas em formalina, a secção de tecido é geralmente tratada com uma protease, a pronase E. O passo de digestão desmascara o抗igénio, activando possivelmente o TGF- β 2 latente para originar o TGF- β 2 activo. O IgG4 6B1 detecta apenas a forma activa de TGF- β 2 (Exemplo 6).

Utilizando IgG4 6B1 e métodos imuno-histoquímicos, determinou-se a distribuição de TGF- β 2 em rim de rato normal embebido em cera de parafina, fixado em formalina e tecido de cérebro de rato lesionado experimentalmente, após digestão com pronase E.

A reactividade de IgG4 6B1 em secções congeladas em criostato de tecido humano normal depois de fixado em acetona foi também averiguada, para determinar se existia alguma ligação a outros抗igénios nestes tecidos.

Método

Tecido de rato

Removeu-se a cera a tecidos de rato embebidos em parafina e re-hidrataram-se por meio de uma série de álcoois. As secções foram então tratadas com pronase E a 0,1% durante exactamente 8 min e em seguida lavaram-se com água. o TGF- β 2 foi detectado nas secções utilizando IgG4 6B1 a 500 ng/ml seguindo o protocolo fornecido com um estojo Vectastain ABC (complexo avidina-biotina) da Vector Laboratories. Nas secções de rim, o anticorpo ligado foi localizado com fosfatase alcalina e utilizou-se peroxidase em tecidos de cérebro de rato.



Tecido humano

Utilizaram-se as seguintes amostras de tecido humano: adrenal, aorta, sangue, intestino grosso, intestino delgado, cérebro, rim, nódulo linfático, fígado, pulmão, baço, pâncreas, músculo esquelético, músculo cardíaco, tiróide, nervo, pele, olho.

Fixaram-se secções em criostato e esfregaços durante 15 minutos em acetona, antes de aplicar o anticorpo IgG4 6B1 marcado com FITC, utilizando o estojo de Sigma Immunoprobe. O anticorpo marcado foi incubado durante 18h a 4°C e em seguida detectado, utilizando um método indirecto com fosfatase alcalina (detecção com anticorpo anti-FITC seguido de anticorpo anti-espécie conjugado com enzima). Nos casos em que não foi possível suprimir a actividade endógena de fosfatase alcalina, utilizou-se um método de detecção com peroxidase. Não se utilizou digestão com pronase neste caso, e portanto este processo apenas detecta抗igénios com os quais o anticorpo tem uma reacção cruzada.

Resultados

Tecido de rato

Os rins de rato apresentaram uma coloração positiva em túbulos presentes quer no lado apical, quer no lado basolateral, demonstrando a presença de TGF- β 2 nos tecidos.

O cérebro de rato lesionado, aos 5 dias após a lesão apresentava coloração positiva de neurónios, astrócitos e macrófagos, que estava ausente no cérebro normal. Isto indica que o TGF- β 2 é expresso no cérebro de rato após uma lesão.

Tecido Humano

Não se observou nenhuma coloração específica de nenhum tecido, utilizando secções em criostato fixadas dos tecidos enumerados acima. Assim, o IgG4 6B1 não reage de forma cruzada com抗igénios nestes tecidos e



quando utilizado terapeuticamente irá ligar-se apenas ao TGF- β 2 activo em secções de tecido detectadas por métodos imuno-histoquímicos.

EXEMPLO 13

Análise cinética da ligação de Fv de uma só cadeia 6B1 e IgG4 6B1 a isoformas de TGF- β

Pode-se utilizar ressonância de plasmon de superfície (SPR) para examinar as interacções em tempo real entre um ligando imobilizado e um analito e calcular constantes cinéticas a partir destes dados. Isto foi realizado utilizando o sistema BIACore 2000 (Pharmacia Biosensor) com o抗ígeno imobilizado numa superfície e o anticorpo como analito.

O sistema utiliza as propriedades ópticas da ressonância de plasmon de superfície para detectar alterações na concentração de proteína, numa matriz de dextrano. O抗ígeno está ligado de forma covalente à matriz de dextrano numa quantidade definida e à medida que a solução que contém o anticorpo passa sobre a superfície à qual está ligado, dá-se a ligação do anticorpo ao抗ígeno e ocorre uma alteração detectável na concentração local de proteína e portanto um aumento no sinal de SPR. Quando a superfície é lavada com tampão o anticorpo dissocia-se do抗ígeno e há uma redução no sinal de SPR, de modo que a velocidade de associação, e dissociação, e a quantidade de anticorpo ligado ao抗ígeno numa dada altura podem todas ser medidas. As alterações no sinal de SPR são registadas como unidades de ressonância (UR) e são representadas em relação ao tempo no eixo dos y de um diagrama sensor.

A densidade de ligando imobilizado na superfície de um *chip* BIACore é importante quando se calculam os dados cinéticos a partir dos diagramas sensores gerados. Esta deverá ser bastante baixa, de modo a que apenas seja necessária uma pequena quantidade de anticorpo analito para a saturação da superfície do *chip*. Para simplicidade, a densidade de uma superfície de *chip* é indicada em UR e uma quantidade ideal para um ligando como o TGF- β 2 ou TGF- β 3 (25 kDa) é 400-600 UR, em relação à linha de base, estabelecida durante a imobilização do ligando na superfície. A quantidade efectiva de TGF- β que deve ser adicionada para se obter a densidade correcta terá que ser



determinada por investigação, mas é reproduzível, uma vez encontrada a concentração correcta.

A imobilização do ligando na matriz de dextrano da superfície do *chip* é facilitada através de grupos amina em cadeias laterais de lisina na proteína e grupos carboxilo na matriz de dextrano. Os grupos carboxilo no dextrano são activados com N-hidroxissuccinimida (NHS) e N-etil-N'-(3-dietilaminopropil)carbodiimida (EDC), o抗igénio em solução ácida é então ligado à superfície e, por fim, quaisquer grupos carboxilo que não reagiram são bloqueados com etanolamina.

A imobilização de ligando é automatizada pela máquina BIACore 2000 e todos os passos são realizados no amostrador automático ou na célula de fluxo, na superfície de dextrano do *chip*. O tampão utilizado ao longo do processo de imobilização e na análise das amostras é solução salina tamponada com Hepes (HBS) com um tensioactivo (Pharmacia Biosensor). Os *chips* (Pharmacia, CM5) têm um revestimento de dextrano numa camada fina de ouro. Misturam-se NHS a 100 mM e EDC a 400 mM no amostrador automático e em seguida injecta-se um volume fixo sobre a superfície da célula de fluxo. Isto é seguido por uma injecção de抗igénio num tampão adequado. No caso do TGF-β, obteve-se uma superfície com a densidade correcta utilizando uma solução 25-30 µg/ml de TGF-β2 (AMS) ou TGF-β3 (R&D Systems) em acetato 10 mM. Após injecção do ligando, o *chip* é bloqueado utilizando etanolamina 1M. A quantidade total de TGF-β ligado foi determinada a partir do aumento total em unidades de ressonância, ao longo deste período.

Para determinar os parâmetros cinéticos, fez-se uma série de diluições de amostras de anticorpo em HBS a partir de cerca de 500 µg/ml até menos de 1 µg/ml, normalmente através de diluições de duplicação. Após o anticorpo ter sido injectado na superfície do抗igénio, a superfície é lavada com HBS, em seguida é regenerada por remoção do anticorpo ligado com um pulso de HCl 100 mM. Nas concentrações mais elevadas de anticorpo, o抗igénio na superfície do *chip* está saturado e determina-se a velocidade na dissociação, lavando com tampão na fase de dissociação. Para determinar a velocidade na ligação ("on-rate"), utilizam-se concentrações mais baixas de anticorpo, que



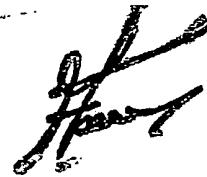
originam uma fase de ligação linear no diagrama sensor, permitindo a determinação de k_{on} .

O conjunto de diluições foi repetido numa preparação separada do mesmo anticorpo.

Para manipular o diagrama sensor de modo a obter as constantes cinéticas k_{on} e k_{off} , utiliza-se o pacote de software BIAevaluation. Para cada curva de ligação utilizada nos cálculos, teve-se em atenção que as condições fossem as adequadas para a determinação das constantes cinéticas.

O IgG4 6B1 foi purificado a partir da linha celular GS/NS0 do Exemplo 10, como no Exemplo 2. O Fv de uma só cadeia 6B1 foi expresso intracelularmente em *E. coli*, redobrando *in vitro* (utilizando a metodologia de WO94/18227) e purificado para se obter um produto homogéneo. Os valores de k_{on} e k_{off} foram determinados para IgG4 6B1 quanto à ligação, tanto a TGF-β2, como a TGF-β3, e para o Fv de uma só cadeia 6B1, quanto à ligação a TGF-β2. A constante de dissociação foi calculada dividindo k_{off} por k_{on} . Os valores para estes parâmetros cinéticos são apresentados na Tabela 7

Assim, o scFv 6B1 e o IgG4 6B1 apresentam constantes de dissociação muito baixas de 2,3 nM e 0,89 nM, respectivamente para TGF-β2 e há 9% de reacção cruzada com TGF-β3 (avaliado pela razão das constantes de dissociação de IgG4 6B1 para TGF-β3 e TGF-β2). Para comparação, em estudos anteriores, em que os erros padrão eram maiores e os valores menos precisos, os valores de Kd para TGF-β2 foram determinados como sendo de 0,7 nM para scFv 6A5 (Tabela 2) e 2 nM para IgG4 6H1 (Exemplo 2). Os valores de Kd para todos os anticorpos dirigidos contra TGF-β2 que partilham o mesmo domínio VH de 6H1, são baixos e inferiores a 10 nM.



EXEMPLO 14

Ligaçāo de um péptido correspondente aos resíduo 56 a 69 de TGF-β2 a IgG4 6B1

Sintetizou-se um péptido correspondente aos aminoácidos de TGF-β2 em torno dos resíduos RVLSL, identificou-se o epítopo a partir da selecção de fagos da biblioteca de exibição de péptidos (Exemplo 11).

O péptido 17-mero CGG-TQHSRVLSLYNTIN (TGF-β2₅₆₋₆₉; sintetizado por Cambridge Research Biochemicals) contém os resíduos 56 a 69 de TGF-β2 com RVLSL (resíduos 60 a 64) no seu centro. A extensão do terminal N, CGG, é um espaçador com um resíduo de cisteína para facilitar o acoplamento do péptido a proteínas transportadoras. O péptido correspondente aos resíduos 56 a 69 de TGF-β1 (TGF-β1₅₆₋₆₉, CGG-TQYSKVLSTYNQHN) também foi sintetizado. Como controlo, utilizou-se o péptido irrelevante GPEASRPPKLHPG.

Utilizaram-se duas abordagens para confirmar que o epítopo em TGF-β2 para IgG4 6B1 compreendia os aminoácidos RVLSL.

- (i) Avaliação da capacidade de IgG4 6B1 para se ligar a TGF-β2₅₆₋₆₉ e a TGF-β1₅₆₋₆₉ acoplado a BSA, por ELISA
- (ii) Avaliação da capacidade dos péptidos para se ligarem a IgG4 6B1 revestindo um *chip* sensor BIACore.

- (ii) Determinação da capacidade de IgG4 6B1 para se ligar a TGF-β2₅₆₋₆₉ e a TGF-β1₅₆₋₆₉ acoplado a BSA, por ELISA

A ligação de IgG4 6B1 aos péptidos sintéticos TGF-β1₅₆₋₆₉ e TGF-β2₅₆₋₆₉ conjugados com BSA foi determinada num ensaio ELISA. Esta foi comparada com a ligação de um anticorpo de controlo IgG4 2G6, que é um anticorpo manipulado, com uma cadeia pesada que contém uma VH de um anticorpo dirigido contra o hapteno NIP, combinada com uma cadeia leve que contém uma VL de um anticorpo dirigido contra a lisozima.



Método

Conjugaram-se 2 mg de cada um dos péptidos TGF- β 1₅₆₋₆₉ e TGF- β 2₅₆₋₆₉ a BSA, utilizando um estojo Imject Activated Immunogen Conjugation (Pierce).

Revesti-se uma placa de microtítulo Immunosorp (Nunc) durante a noite, com 10 μ g/ml de péptidos conjugados em PBS (linhas A-D TGF- β 1₅₆₋₆₉, linhas E-F TGF- β 2₅₆₋₆₉) a 100 μ l/poço. Os poços foram lavados 3x com PBS-Tween e fizeram-se as seguintes adições: coluna 1 - 100 μ l de PBS em cada poço como reagente de controlo; coluna 2, linhas A, B, E e F 200 μ l de IgG4 6B1, 10 μ g/ml; coluna 2, linhas C, D, G e H 200 μ l de IgG4 2G6 10 μ g/ml.

Colocaram-se 100 μ l de PBS em todos os restantes poços. Para produzir diluições de duplicação dos anticorpos, removeram-se 100 μ l de cada poço da coluna 2 e colocaram-se no poço seguinte na coluna 3. A amostra foi misturada e recolheram-se 100 μ l que se adicionaram ao poço seguinte na coluna 4. Este processo foi repetido ao longo da placa, sendo os últimos 100 μ l desprezados. A placa foi em seguida incubada a 4°C durante 18h.

Após lavagens, 3x, com PBS-Tween, os poços foram cheios de novo com 100 μ l de um conjugado de fosfatase alcalina e um fragmento F(ab')₂ de cabra, específico para a cadeia gama de IgG humana, diluído 1:1000 em PBS e incubou-se durante mais uma hora. Após mais lavagens, 3x, com PBS-Tween, o anticorpo ligado foi revelado com o substrato p-NPP durante 20 min.

Resultados

Verificou-se que o IgG4 6B1 se liga a ambos os péptidos conjugados (Figura 15), mas o sinal de ELISA obtido com TGF- β 1₅₆₋₆₉ era muito inferior ao obtido com TGF- β 2₅₆₋₆₉, para uma concentração equivalente de IgG4 6B1. Foi necessária uma concentração aproximadamente 8 a 10 vezes superior de IgG4 6B1 para se obter um sinal equivalente com TGF- β 1₅₆₋₆₉, em comparação com TGF- β 2₅₆₋₆₉. Não se obteve nenhum sinal com o anticorpo de controlo IgG4 2G6 com nenhum dos conjugados péptido-BSA. O IgG4 6B1 liga-se, portanto, fortemente ao TGF- β 2₅₆₋₆₉ e mais fracamente ao TGF- β 1₅₆₋₆₉ acoplado a BSA.



(ii) *Avaliação da capacidade dos péptidos se ligarem a IgG4 6B1 revestindo um chip sensor BIACore*

A ligação de IgG4 6B1 a TGF- β 2₅₆₋₆₉ foi confirmada por ligação do péptido a IgG4 6B1 revestindo um *chip* sensor BIACore. A determinação das propriedades de ligação por ressonância de plasmon de superfície utilizando o BIACore 2000 da Pharmacia, foi descrita no Exemplo 13. O método para criar um *chip* sensor BIACore revestido com IgG4 6B1 foi igual ao método para o acoplamento com TGF- β 3, descrito no Exemplo 13, excepto que o IgG4 5B1 foi acoplado a 5 μ g/ml em tampão acetato 10 mM, pH 3,5. Gerou-se uma superfície de 5000 UR utilizando 25 μ l de IgG4 6B1.

Aplicaram-se 20 μ l dos péptidos à superfície de 6B1 a 1 mg/ml, com regeneração da superfície utilizando um pulso de ácido para remover o péptido ligado entre as amostras. A quantidade de ligação foi determinada estabelecendo uma resposta de linha de base de UR absolutas antes da injecção e subtraindo em seguida este valor ao valor aos 20 segundos após a injecção estar completa, para obter uma resposta relativa em UR. Esta é considerada como a quantidade de ligação à superfície de 6B1.

A ligação obtida é apresentada na Tabela 9. Houve um nível de ligação muito baixo do péptido irrelevante. O TGF- β 1₅₆₋₆₉ parece ligar-se especificamente a um nível baixo a IgG4 6B1. No entanto, o péptido TGF- β 2₅₆₋₆₉ ligou-se a IgG4 6B1 especificamente e muito mais fortemente.

O nível baixo de ligação de IgG4 6B1 ao péptido TGF- β 1 nos ensaios ELISA e BIACore não é inesperado, tendo em conta que 10 dos 14 aminoácidos de TGF- β são idênticos ao péptido TGF- β 2. Apesar de tudo, o IgG4 6B1 liga-se ao péptido TGF- β 2₅₆₋₆₉ muito mais fortemente do que se liga ao péptido TGF- β 1₅₆₋₆₉. O nível de discriminação entre estes péptidos de TGF- β 1 e TGF- β 2 é muito menor, no entanto, do que aquele que se observa para os ensaios com radiorreceptores (Tabela 6) e de neutralização (Tabela 6 e Figuras 16 e 17) com as isoformas nativas. Nestes ensaios, o IgG4 6B1 neutraliza fortemente o TGF- β 2, mas tem pouco efeito na actividade biológica de TGF- β 1. Esta maior discriminação reflecte presumivelmente o contexto dos resíduos dos péptidos nas isoformas nativas.



Conclusões

Estes resultados suportam a atribuição do epítopo de IgG4 6B1 em TGF- β 2 aos aminoácidos na região dos resíduos 60 a 64. O péptido utilizado neste exemplo, resíduos 56 a 69, corresponde aos aminoácidos da hélice alfa H3 (M.P. Schlunegger & M.G. Grutter *Nature* 358 430-434, 1992). O TGF- β 2 forma um dímero cabeça-para-cauda com a hélice alfa H3 (também referido como o calcanhar) de uma subunidade que forma uma interface com as regiões "finger" (incluindo os resíduos 24 a 37 e os resíduos na região dos aminoácidos 91 a 95; também designados por finger 1 e 2) da outra subunidade (S. Daopin *et al.*, *Proteins: Structure, Function and Genetics* 17 176-192, 1993). Foi proposto que as características estruturais primárias que interagem com o receptor de TGF- β 2 consistem em aminoácidos na extremidade do terminal C da hélice alfa H3 de uma cadeia, juntamente com os resíduos dos finger 1 e 2 da outra cadeia (D.L. Griffith *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 878-883, 1996). A identificação de um epítopo para IgG4 6B1 com a hélice alfa H3 de TGF- β 2 é consistente com o facto de o IgG4 6B1 impedir a ligação ao receptor e neutralizar a actividade biológica do TGF- β 2.

Se o epítopo para IgG4 6B1 for tridimensional, poderão haver outros epítopos não contíguos, aos quais o anticorpo se poderá ligar.

Há evidências anteriores de que os anticorpos dirigidos contra esta região do TGF- β 2 podem ser específicos para TGF- β 2 e neutralizar esta actividade. Flanders *et al.*, (*Development*, 113 183-191, 1991) mostraram que se podiam criar anti-soros policlonais em coelhos contra os resíduos 50 a 75 de TGF- β 2 maduro e que estes anticorpos reconheciam o TGF- β 2, mas não o TGF- β 1, em transferências de Western. Num artigo anterior, K.C. Flanders *et al.*, (*Biochemistry*, 27 739-746, 1988) mostraram que os anti-soros policlonais criados em coelhos contra os aminoácidos 50 a 75 de TGF- β 1 podiam neutralizar a actividade biológica de TGF- β 1. O anticorpo que isolámos e caracterizámos, IgG4 6B1, é um anticorpo humano dirigido contra os aminoácidos nesta região, que neutraliza a actividade biológica do TGF- β 2 humano. É surpreendente que um anticorpo neutralizante deste tipo contra o TGF- β 2 possa ser isolado em humanos (em que a imunização com um péptido



não pode ser utilizada por razões éticas) directamente a partir de um repertório de exibição de anticorpos em fagos.

A descrição completa da WO97/13844, incluindo as reivindicações, é aqui especificamente incorporada.

[Signature]

Tabela 1: Iniciadores oligonucleotídicos utilizados na identificação e caracterização de anticorpo de TGF β 1

*JL
JL*

VH2b back Sfi 5'-CGC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG (AG) TC ACC TGT AAG GAG GGT TCTT GG-3'

VH 3b back Sfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC (GC) AG GTG CAG CTG GTG GAG (AT) C(TC) GG-3'

VH3c back Sfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG GAG (AT) C(TC) GG-3'

VH4b back Sfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG-3'

VH4c back Sfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG (GC) TG CAG CTG CAG GAG TC(GC) GG-3'

VH5b back Sfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GA(AG) GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG-3'

VH 6a back Sfi 5'-AGC TCG GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG GTA CAG CAG TCA GG-3'

VH3BACKSfIEu 5'- AGC TCG GTC CTC GCA ACT GCG GCC CCT GGG GCC CAC AGC GAG GTG CAG CTC GTC GAG TCT GG - 3'
VH3BACKEuApA 5'- CGA GTC ATT CTG CAC T'GA GAT CCA CTC ACC T'GA GGA GAC GCT GAC CGT GGT CCC - 3'

VIIHGFORBam 5'-GA GAA TCG GTC TGG GAT TCC TGA GGG CCG G-3'
DeltaBamHI 5'- AGC TCG GTC CTC GCA ACT GGT GTG CAC TCC CAC GTT ATA CTG ACT CAG GAC CC - 3'

Vλ3 / 1 BACKEuApA 5'- CGA GTC CTC GCA ACT GGT GCT GCA CTC ACC TAG GAC GGT CTT GGT CCC- 3'
HuJλ2 - 3 For EuBam 5'-G GTC CTC GCA ACT GCG GAT CCA CTC ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC- 3'
VHJH1 - 2 FORBam 5'-CGA GTC ATT CTG CAC TGT GAT CCA CTC ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC - 3'

[Handwritten signature]

Vκ2BackEuλpa 5'- AGC TCG GTC CTC GCA ACT GGT GTG CAC TCC GAT GTC ATG ACT CAG TCT CC-3'

HuJKFcrBuBam 5'-G GTC CTC GCA ACT GGG GAT CCA CTC ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC -3'

Vλ3BackEuλpa 5'- AGC TCG GTC CTC GCA ACT GGT GTG CAC TCC TCG TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC -3'

LamΔeltaBamHI 5'- C CGG CCC TCA GGA ATC CCA GAC CGA TTC TC- 3'

P10 5'-CTA AGC TTA CTG AGC ACA CAG GAC CTC ACC-3'

P16 5'-TTT GGA TAT CTC TCC ACA GGT GTC CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT G-3'

P17 5'-ATG GGC CCT TGG AAG CTG AAG AGA CGG TGA CCA GGG TGC C-3'

P19 5'-TTG AAT TCA GGT CGG GGC ACT TCT CCC TCT ATG AAC ATT CCG TAG GGG CCA CTG TCT TC-3'

P22 5'-TTA ACG ATT TCG AAC GCC ACC AAG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC-3'

P25 5'-GTC CTA GGT GAG TAG ATC TAT CTG GGA TAA GCA TGC TGT TTT C-3'

P26 5'-GAT CTA CTC ACC TAG GAC GGT CAG CTT GG-3'



Tabela 2

Propriedades de fragmentos Fv de uma só cadeia quanto a ligação a TGF-beta1 ou TGF-beta2, determinadas utilizando BIACore		
Anticorpo	$K_{off} (s^{-1})$	$K_d (nM)$
TGF-beta1		
31G9	$9,0 \cdot 10^{-4}$	12
CS32	$1,2 \cdot 10^{-3}$	
CS39	$1,7 \cdot 10^{-3}$	
TGF-beta2		
6A5	$1,4 \cdot 10^{-4}$	0,7
6B1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	
6H1	$1,1 \cdot 10^{-3}$	
14F12	$2,1 \cdot 10^{-3}$	

Tabela 3

Níveis de dose diária para animais individuais em cada grupo				
Grupo	Clone	Formato de anticorpo	Antigénio	Dose
1	Sol. salina de controlo	-	-	-
2	31G9	scFv	TGF- β_1	20 ng
3	6A5	scFv	TGF- β_2	20 ng
4	27C1/10A6	IgG4	TGF- β_1	692 ng
5	6H1	IgG4	TGF- β_2	1,76 μ g
6	31G9 + 6A5	scFv	TGF- β_1 TGF- β_2	20 ng "
7	27C1/10A6 + 6H1	IgG4	TGF- β_1 TGF- β_2	692 ng 1,76 μ g

Tabela 4

Valores de IC ₅₀ para anticorpos no ensaio em TF1		
Anticorpo	scFv (nM)	IgG4 (nM)
6H1	1,5	100
6B1	15	11
6A5	8	150
14F12	90	nd
nd = não determinado		



Tabela 5

Valores de IC ₅₀ para anticorpos, medidos utilizando um ensaio com radiorreceptores	
Anticorpo anti-TGF-β1	IC ₅₀ , nM
scFv 7A3	> 100
scFv 31G9	30
scFv CS32	4,5
scFv CS39	60
IgG 27C1/10A6	9
scFv VT37	100
Anticorpo anti-TGF-β2	IC ₅₀ , nM
scFv 6A5	1,5
IgG 6A5	6
scFv 6B1	0,3
IgG 6B1	0,6
scFv 6H1	0,22
IgG 6H1	10
IgG 11E6	1,6
scFv 14F12	3
ScFv VT37	2

Tabela 6

Potência de neutralização de isoformas de TGF-beta		
<i>IC₅₀ do ensaio de proliferação de células TF1 (nM de IgG)</i>		
	IgG4 6B1	Genzyme
TGF-beta1	> 100	1,5
TGF-beta2	2	10
TGF-beta3	11	0,1
<i>IC₅₀ do ensaio com radiorreceptores em células A549 (nM de IgG)</i>		
TGF-beta1	> 400	0,55
TGF-beta2	0,05	0,5
TGF-beta3	4	0,03

Tabela 7

Parâmetros cinéticos de IgG4 6B1 e Fv de uma só cadeia 6B1				
formato de anticorpo	antigénio	$k_{off} \text{ s}^{-1}$	$k_{on} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	constante de dissociação, $K_d \text{ nM}$
scFv 6B1	TGF-β2	$6,68 \cdot 10^{-4}$	$2,87 \cdot 10^5$	2,32
IgG4 6B1	TGF-β2	$3,36 \cdot 10^{-4}$	$3,84 \cdot 10^5$	0,89
IgG4 6B1	TGF-β3	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^4$	10,0

Tabela 8

Sequências de péptidos a partir da ligação de fagos a IgG4 6B1	
Esta tabela mostra a sequência de aminoácidos de 4 clones de exibição de péptidos em fagos, que apresentam uma concordância com a sequência de TGF-beta2. Estes clones foram alinhados por baixo da parte relevante da sequência de TGF-beta2, que é apresentada nas posições de aminoácidos 56 a 77	
TGF-beta2	TQHSRVLSLYNTINPEASASPC
Clone 1	RQLSLQQRMH
Clone 2	DPMMDMVLKLC
Clone 3	WSEFMRQSSL
Clone 3	VESTSLQFRG

Tabela 9

Ligação de péptidos de TGF-beta a IgG4 6B1 immobilizado num chip BIACore		
péptido	Concentração de péptido, μM	quantidade de ligação à superfície de IgG4 6B1, UR
TGF-β2 ₅₆₋₆₉	537	1012,8
TGF-β1 ₅₆₋₆₉	524	190,7
péptido irrelevante	745	60,9

Lisboa, -4. MAI 2001

Por CAMBRIDGE ANTIBODY TECHNOLOGY LIMITED

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO

Eng.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74-4.^o
1200-195 LISBOA



REIVINDICAÇÕES

1. Membro de ligação específica que compreende um domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo humano específico para TGF- β humano, que se liga à isoforma de TGF- β humano, TGF- β 1, preferencialmente em relação a TGF- β 3, e que neutraliza o TGF- β 1, em que o domínio de ligação ao antígeno do anticorpo humano compreende o domínio VH, VH de 31G9, cuja sequência de aminoácidos é apresentada na figura 1(a)(ii) e/ou o domínio VL, VL de CS37, cuja sequência de aminoácidos é apresentada na Figura 14.
2. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo o referido domínio VL de CS37.
3. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 2, compreendendo o referido domínio VH de 31G9.
4. Membro de ligação específica compreendendo um domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo humano, que compete para a ligação a TGF- β 1 com um membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 3, que se liga a TGF- β 1 com uma constante de dissociação que é pelo menos cinco vezes inferior à sua constante de dissociação para TGF- β 3 e que neutraliza o TGF- β 1.
5. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 1, ou a reivindicação 4, compreendendo um domínio VL que é uma sequência de aminoácidos variante do domínio VL, VL de CS37, por meio de uma substituição de um aminoácido na sequência apresentada na Figura 14.
6. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 1, que se liga ao péptido TQYSKVLSLYNQHN.
7. Membro de ligação específica de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, compreendendo uma molécula de anticorpo Fv de uma só cadeia.
8. Membro de ligação específica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, que compreende um ou mais aminoácidos além dos que formam o referido domínio de ligação ao antígeno do anticorpo humano.



9. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 8, que compreende uma região constante de anticorpo.

10. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 9, que compreende um anticorpo completo.

11. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 9 ou 10 em que a referida região constante de anticorpo é do isotipo IgG4.

12. Método que compreende provocar ou permitir a ligação *in vitro* de um membro de ligação específica de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, à isoforma TGF- β 1 de TGF- β humano.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que a referida ligação do membro de ligação específica neutraliza a referida isoforma.

14. Membro de ligação específica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, para utilização num método de tratamento de um indivíduo, para contrariar os efeitos do TGF- β que são prejudiciais para o indivíduo.

15. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 14, em que os referidos efeitos são efeitos que promovem a fibrose.

16. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 15 em que o referido indivíduo tem uma condição seleccionada do grupo constituído por glomerulonefrite, cicatriz neural, cicatriz dérmica, cicatriz ocular, fibrose pulmonar, lesão arterial, retinopatia proliferativa, descolamento da retina, síndrome da dificuldade respiratória do adulto, cirrose do fígado, pós-enfarre do miocardio, pós-estenose recidiva angioplástica, cicatriz quelóide, esclerodermia, desordens vasculares, cataratas e glaucoma.

17. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 16, em que a referida condição é a cicatriz neural ou glomerulonefrite.



18. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 14, em que os referidos efeitos contribuem para uma condição de doença imunitária ou inflamatória.

19. Membro de ligação específica de acordo com a reivindicação 18, em que a referida condição é seleccionada do grupo constituído por artrite reumatóide, doença de deficiência de macrófagos e infecção patogénica de macrófagos.

20. Utilização de um membro de ligação específica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de um indivíduo, para contrariar os efeitos do TGF- β que são prejudiciais para o indivíduo.

21. Utilização de acordo com a reivindicação 20, em que os referidos efeitos são efeitos de promoção de fibrose.

22. Utilização de acordo com a reivindicação 21, em que o referido indivíduo tem uma condição seleccionada do grupo constituído por glomerulonefrite, cicatriz neural, cicatriz dérmica, cicatriz ocular, fibrose pulmonar, lesão arterial, retinopatia proliferativa, descolamento da retina, síndrome da dificuldade respiratória do adulto, cirrose do fígado, pós-enfarre do miocardio, pós-estenose recidiva angioplástica, cicatriz quelóide, esclerodermia, desordens vasculares, cataratas e glaucoma.

23. Utilização de acordo com a reivindicação 22, em que a referida condição é cicatriz neural ou glomerulonefrite.

24. Utilização de acordo com a reivindicação 23, em que os referidos efeitos contribuem para uma condição de doença imunitária ou inflamatória.

25. Utilização de acordo com a reivindicação 24, em que a referida condição é seleccionada do grupo constituído por artrite reumatóide, doença de deficiência de macrófagos e infecção patogénica de macrófagos.

26. Ácido nucleico que codifica para um membro de ligação específica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11.



27. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 26, que é parte de um vector de expressão.

28. Método que comprehende a utilização de um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 26 ou a reivindicação 27, num sistema de expressão, para a produção de um membro de ligação específica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

29. Célula hospedeira que contém um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 26 ou a reivindicação 27.

30. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 29, que é capaz de produzir o referido membro de ligação específica, sob condições de cultura adequadas.

31. Método para a produção de um membro de ligação específica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, compreendendo a cultura de uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 30, sob condições adequadas para a produção do referido membro de ligação específica.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que após a referida produção, o referido membro de ligação específica é isolado da cultura de células.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, em que após o referido isolamento, o membro de ligação específica é utilizado na formulação de uma composição, que comprehende pelo menos um componente adicional.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, em que a referida composição é uma composição farmacêutica que comprehende um excipiente farmaceuticamente aceitável.

35. Composição farmacêutica que comprehende um membro de ligação específica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 e um excipiente farmaceuticamente aceitável.



36. Método para a obtenção de um domínio de ligação ao抗原, de um anticorpo, com as propriedades de ser específico para o TGF- β humano, de se ligar à isoforma TGF- β 1 do TGF- β humano, preferencialmente em relação ao TGF- β 3, e de neutralizar o TGF- β 1, em que o método compreende proporcionar, por meio de adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos apresentada na Figura 1 (a) (ii), um domínio VH, que é uma sequência de aminoácidos variante do domínio VH, VH de 31G9, e/ou proporcionar, por meio de adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos apresentada na Figura 14, um domínio VL, que é uma sequência de aminoácidos variante do domínio VL, VL de CS37, combinar o domínio VH e/ou os domínios VL assim proporcionados com um ou mais domínios VL ou VH, respectivamente, para obter uma ou mais combinações VH/VL, e testar a combinação ou combinações VH/VL, quanto às referidas propriedades, para identificar um domínio de ligação ao抗原, do anticorpo, com as referidas propriedades.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, em que o referido domínio de ligação ao抗原 do anticorpo, identificado como tendo as referidas propriedades, é produzido na forma de uma molécula de anticorpo Fv de uma só cadeia, isolada.

38. Método de acordo com a reivindicação 36, em que o referido domínio de ligação ao抗原 do anticorpo, identificado como possuindo as referidas propriedades, é produzido num polipeptídeo compreendendo um ou mais aminoácidos, além dos que formam o domínio de ligação ao抗原 do anticorpo.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, em que o referido polipeptídeo compreende uma região constante de anticorpo.

40. Método de acordo com a reivindicação 39, em que o referido polipeptídeo compreende um anticorpo completo.

41. Método de acordo com a reivindicação 39 ou 40, em que a referida região constante do anticorpo é do isotipo IgG4.

42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 41, em que o referido domínio de ligação ao抗igeno do anticorpo, identificado como tendo as referidas propriedades, é produzido por meio de expressão a partir do ácido nucleico codificante.

43. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 42, em que o referido domínio de ligação ao抗igeno, do anticorpo, identificado como tendo as referidas propriedades, é formulado numa composição que compreende pelo menos um componente adicional.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, em que a referida composição compreende um excipiente farmaceuticamente aceitável.

Lisboa, -4. MAI 2001

Por CAMBRIDGE ANTIBODY TECHNOLOGY LIMITED

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO



Figura 1(a) (i)

CAG	GTG	CAA	C ^{TC} G	G ^{TC} G	GAG	TCT	GGG	GGG	GTG	GTG	C ^{TC} T	GGG	AGG	
Q	V	Q	R	V	E	S	G	G	V	V	Q	P	G	R>
50														
TCC	C ^{TC} G	AGA	C ^{TC} C	TCC	TGT	GCA	CCC	TCT	CGA	T ^{TC} C	ACC	T ^{TC} C	AGC	TAT
S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	Y>
100														
GGC	ATG	CAC	TGG	G ^{TC} C	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	C ^{TC} G	GAA	T ^{TC} G
G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	1.	E	W
150														
GCA	G ^{TC} T	A ^{TC} A	T ^{TC} A	TAT	GAT	GGA	AGT	AAT	AAA	TAT	GCA	GAC	T ^{TC} C	G ^{TC} G
A	V	I	S	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S
200														
AAG	GGC	CGA	T ^{TC} C	ACC	A ^{TC} C	TCC	AGA	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	C ^{TC} G
K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	1.
250														
CTG	CAA	A ^{TC} G	AAC	C ^{TC} G	A ^{TC} A	G ^{TC} T	GAA	GAC	GAC	G ^{TC} T	G ^{TC} T	TAT	TAT	
L	Q	M	N	S	I.	R	A	E	D	T	A	V	Y	C>
300														
GCG	AAA	ACT	GGG	GAA	TAT	AGT	GGC	TAC	GAT	TCT	AGT	GGT	G ^{TC} G	GTC
A	K	T	G	E	Y	S	G	Y	D	S	S	G	V	D
340														
TCG	GGC	AAA	GGG	ACC	ACG	G ^{TC} C	ACC	G ^{TC} C	TCC	TCC	TCA	TCA		
W	G	K	G	T	T	V	T	V	S	S	S			
350														
360														

~~Handwritten signature~~

Figura 1(a) (ii)

Figura 1(a) (iii)

Figura 1(b) (i)

86 300
EP 0 945 464/PT

4/38

GAC ATC GAG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTC GCT GAG TCT CTC GGC
D I V M T Q S P D S L A V S L G>
50 60 70 80 90
GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG TCC AGC CAG AGT CTP TTA TAC AGC
E R A T I N C K S S Q S L L Y S>
100 110 120 130 140
TAC AAC AAG ATG AAC TAC TTA GCT TGG TAC CAG CAA CGA CGA CAG
Y N K M N Y I A W Y Q Q K P G Q>
150 160 170 180 190
CCT CCT AAG CTG CTC ATT AAC TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC GGG GTC
P P K I I N W A S T K E S G V>
200 210 220 230 240
CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC CGG TCT GGG ACA GAT TPC ACT CTC ACC
P D R F S G S G T D F T I T>
250 260 270 280
ATC AGC AGC CTC CAG GCT GAA GAT GTG GCA GTP TAT TAC TGT CAG CAA
I S I Q A E D V A V Y Y C Q Q>
290 300 310 320 330
TAT TAT GCA ACT CCT CTG ACG TTC GGC CAC GGG ACC AAC GTG GAA ATC
Y Y A T P I T F G H G T K V E I>
340
AAA CGT
K R

[Handwritten signature]

Figura 1(b) (iii)

CAC GTT A^TA C^TG ACT CAG GAC CCT GCT GTC GCG GCC T^TG GGA CAG
H V I. T Q D P A V S V A L G Q>
50 ACA G^TC AGG A^TC ACG T^GC CAA GGA GAC AGC CTC AAA AGC TAC TAT GCA
T V R I T C Q G D S L K S Y Y A>
100 AGT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT G^TA C^TT GTC A^TC TAT
S W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y>
150 GGT GAA AAC AGC CGG CCC TCC GGG ATC CCA GAC GCA T^TC T^TC GGC TCC
G E N S R P S G I P D R F S G S>
200 AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC T^TG ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA
S S G N T A S L T P I T G A Q A E>
250 GAT GAA GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC AGC AGT GGT ACC CAT
D E A D Y C N S R D S G G T H>
300 C^TA GAA GTG T^TC GGC GGA GGG ACC AAG C^TG ACC G^TC C^TA GGT
I. E V F G G T K L T V L G

~~signature~~

Figura 1(c) (i)

10 CAG GTG CAA CTG G^rGC GAG T^rCT GGG CGA GGC GTC GTC CAG CCA GGG AGG
Q V L V E S G G V V Q P G R>
50 TCC C^rGC AGA C^rCC T^rCC T^rGT GCA GCG T^rCT GGA C^rTC ACC T^rTC AGT AGC TAT
S L R I, S C A A S G L T F S S Y>
100 GAC ATG CAC TGG G^rGC CGC C^rAG C^rCT CCA GCC AAG GGG C^rGC GAG T^rGG G^rGC
D M H W V R Q P P A K G L E W V>
150 GCA G^rTT ATA TCA T^rAT G^rAT GGA AGT AGT AAA TAC TAT GCA GAC T^rCC GTG
A V I S Y D G S S K Y Y A D S V>
200 AAG GGC CGA T^rTC ACC A^rTC T^rCC AGA GAC AAT T^rCC AAG AAC ACG C^rTC TAT
K G R F T I S R D N S K N T I, Y>
250 CTG CAA ATG AAC AGC C^rGC AGA GCT GAG GAC ACG GCT G^rTC TAT TAC T^rGT
I, Q M N S I, R A E D T A V Y Y C>
290 GCG CGA ACT GGT GAA T^rAT AGT GGC TAC GAC ACG AGT GTG GAG C^rTC
A R T G E Y S G Y D T S G V E L>
340 TGG GGG CAA GGG ACC ACG G^rTC ACC G^rTC T^rCC TCA
W G Q G T T V T S S

~~Handwritten signature~~

Figura 2(a)(i)

Figura 2(a) (ii)

GAG ATT CAG CTC GTC GAC TCT	GGG GGA GGC GTC	CAG CCA GGG AGA	
E I Q L V E S G G G V V Q P G R>			
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG	TCT GGA TTC ACC TTC AGC TAT		
S L R I S C A A S G F T F S S Y>			
GCT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT	CCA GCC AAG GGG CTC GAG TGG GTG		
A M H W V R Q A P A K G I E W V>			
GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA	TAC TAC GCA GAC TCC GTC		
A V I S Y D G S N K Y Y A D S V>			
AAC GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT	TCC AAC AAC ACG CTG TAT		
K G R F T I S R D N S K N T I L Y>			
CTG CAA ATG AAC AGC CTC AGA GCT GAG GAC ACG GCC GTC TAC TGT			
L Q M N S I R A E D T A V Y Y C>			
GCA AGA GCG GCG TTG GAA ACG TGG GGC CAA GGA ACC CTC ACC			
A R A G I E T W G Q G T L V T>			
GTC TCC TCA AGT GG			
V S S S G			

[Handwritten signature]

Figura 2(b) (i)

	10	20	30	40
GAT	GTT	GTC	TCC	CAG
D	V	M	T	Q
			S	P
			S	S
			L	S
			A	A
			S	V
				G>
50	60	70	80	90
GAC	AGA	GTC	ACC	ATC
D	R	V	T	I
			C	T
			R	A
			S	Q
			G	I
			N	S
				Y>
100	110	120	130	140
TTA	GCC	TGG	TAT	CAG
L,	A	W	Y	Q
			K	K
			P	G
			S	V
			A	P
			K	K
				I>
150	160	170	180	190
TAT	AAG	GCA	TCT	ACT
Y	K	A	S	T
			E	L,
			S	S
			G	G
			V	P
			C	S
			G	R
				F>
200	210	220	230	240
AGT	GGA	TCT	GGC	ACA
S	G	S	G	T
			E	F
			T	T
				I,
				T
				I
				S
				S
				I,
				Q
				P>
250	260	270	280	
GAA	GAT	TTC	GCA	ACT
E	D	F	A	T
				Y
				Y
				C
				Q
				Q
				S
				Y
				S
				T
				P
				R>
290	300	310	320	330
ACG	TTC	GGC	CAA	GGG
T	F	G	Q	G
				T
				K
				V
				D
				I
				K
				R

~~Handwritten signature~~

Figura 2(b) (iii)

	10	20	30	40	
TCG TCT GAG CTC ACT CGC CCT GCT GTC GTC TCG GGC TCG GGA CAG	S S E L T Q D P A V S V A L G Q >				
	50	60	70	80	90
ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA	T V R I T C Q G D S L R S Y Y A >				
	100	110	120	130	140
AGC TGG TAC CAG CAG MAG CCA GGA CAG GCC CCP GTC ATC TAT	S W Y Q K P G Q A P V I V I Y >				
	150	160	170	180	190
GCT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC GCT GGC TCC	G K N N R P S G I P D R F A G S >				
	200	210	220	230	240
AAC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TAC ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAG	N S G N T A S I T P G A Q A E >				
	250	260	270	280	
GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AGC TCC CGG GAC AGC AGT GGT AAC CAT	D E A D Y C S S R D S S G N H >				
	290	300	310	320	
GTC GTR TTC GGC GGA GGG ACC ARG CTC ACC GTC CTA GGT	V V F G G T K L T V L G >				

Figura 2(b)(iii)

Figura 2 (b) (iv)

E	V	I	T	Q	S	P	S	I.	S	A	S	V	G>	
50	60	70	80	90										
GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	ACT	CAG	GGC	ATP	GAA	GAT
D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	G	D
100	110	120	130	140										
TTG	GGC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAG	CCA	GGG	AAA	GCC	CCT	ATC	C ^r C	A ^r C
I.	G	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	I	I.	I>
150	160	170	180	190										
TAT	GGT	ACA	TCC	ACT	TTA	CAA	AGT	GGG	GTC	CCG	TCA	AGG	T ^r C	AGC
Y	G	T	S	T	I.	Q	S	G	V	P	S	R	F	S
200	210	220	230	240										
AGT	GGA	TCT	GGC	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	AAC	C ^r G	CAG	CCT
S	G	G	G	T	D	F	T	I.	T	I	N	.S	L	Q
250	260	270	280	290										
GAA	GAT	T ^r T	GCA	ACT	TAT	TAC	TGT	CTA	CAA	GAT	TCC	AAT	TAC	CCG
E	D	F	A	T	V	Y	C	I.	Q	D	S	N	Y	P
300	310	320												
ACT	TTC	GGC	GGG	ACA	CGA	C ^r G	GAC	ATP	AAA					
T	F	G	G	G	T	R	I.	E	T	K	R			

Figura 2(b) (v)

86 300
EP 0 945 464/PT

13/38

[Handwritten signature]

TCG TCT GAG CTC ACT CAG GAC CCT GTC	20	30	40		
S S E I. T Q D P A V S V A L G Q>					
ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AAC TAT TAT GCA	60	70	80	90	
T V R I T C Q G D S I. R N Y Y A>					
AAC TGG TAC CAG CAG AAC CCA GGA CAG GCC CCA GTPA CTTP GTC ATC TAT	110	120	130	140	
N W Y Q K P G Q A P V I. V I Y>					
GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TCT GGC TCC	150	160	170	180	190
G K N N R P S G I P D R F S G S>					
AGC TCA GGG AAC ACA GCT TCC TPG ACC ATC ACT GGG GCT CGG GCG GAA	200	210	220	230	240
S S G N T A S I. T P G A R A E>					
GAT GAG GGT GTC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC AGC ACT GGT GCG GTP	250	260	270	280	290
D E G V Y C N S R D S S G A V>					
TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT	300	310	320		
F G G T K I. T V L G					

[Handwritten signature]

Progenitor (1-B2)	A R T G E Y S G Y D S S S G V D V W
27-C1	A R T G E Y S G Y D T S G V E L W
27-D7	A R T R E Y S G H D S S S G V D D W
27-E10	A R T G P F S G Y D S S S G E D V R
27-H1	A R T E E Y S G Y D S S S G V D V W
27-E2	A Q T R E Y T G Y D S S S G V D V W
28-A11	A R T E E Y S G F D S T G E D V W
28-E12	A R T E E F S G Y D S S S G V D V W
28-H10	A R T G E Y S G Y H S S S G V D V R
31-G2	A R T E E F S G Y D S S S G V D V W
30-B6	A R A G P F S G Y D S S S G E D V R
30-E9	A R T G P F S G Y D S S S G E D V W
30-F6	A R T E E F S G Y D S S S G V D V W
30-D2	A R T G E Y S G Y D S S S G E L V W
31-A2	A R T E E F S G Y D S T G E E V W
31-E11	A R T E E F S G Y D S S S G V D V W
31-F1	A R T G E Y S G Y D S S S G E D V W

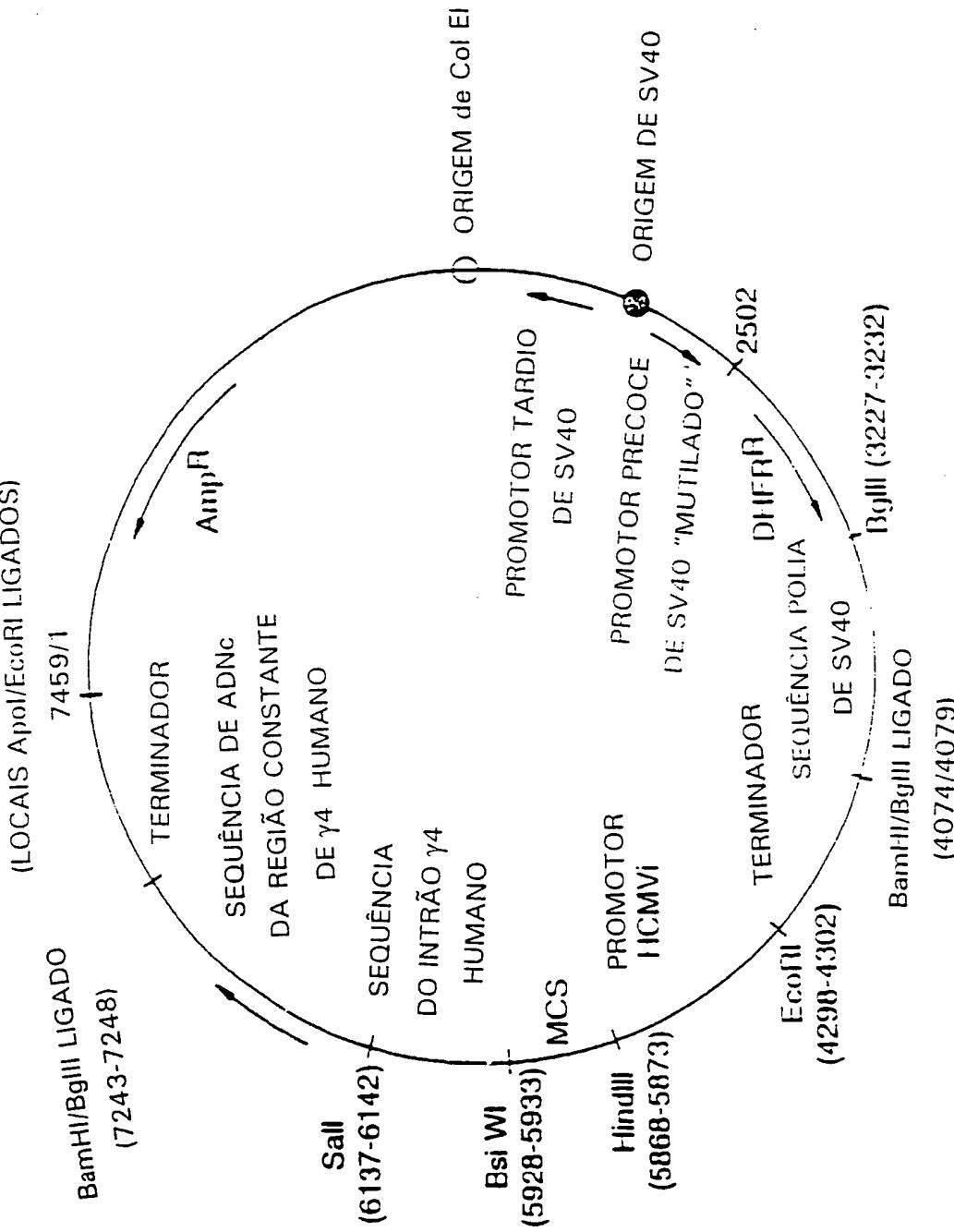
Figura 4

TCG TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTC GTC GCC TTC GGA CAG
S S E L T P D P A V S V A L G Q>
50 60 70 80 90
ACA GTT AGG ATC ACT TCC CAA GGA GAC ACT CTC AGA AGC TAT TAC ACA
T V R I T S Q G D S L R S Y Y T>
100 110 120 130 140
AAC TGG TTT CAG CAG AAC CCA GGA CAG CCC CCT CTP CTP GTC GTC TAT
N W F Q Q K P G Q P P L I V V Y>
150 160 170 180 190
GCT AAA ATT AAG CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTP GGC TCC
A K N K R P S G I P H R F S G S>
200 210 220 230 240
AGC TCA GGA AAC ACA GCT TGC TGC ACC ATC ACT GGG GCT CAG CCC GAA
S G H T R S L T P G A Q A E>
250 260 270 280 290
GTT GAG GCT GTC TAT TAC TGT CCT TCC CGG CGC AGC AGC TAT TAT
D E H P Y Y C H S R D S S G H H H>
290 300 310 320
GTC CTT TGC GGC GGA GGU ACC AAC CGG ACC GTC CGC CGA CGP
V L F G G G T K L T V L G

[Signature]

~~1~~

Fig. 6.



86 300
EP 0 945 464/PT

18/38

[Signature]

卷之三

----- 50

.....
61

הנני

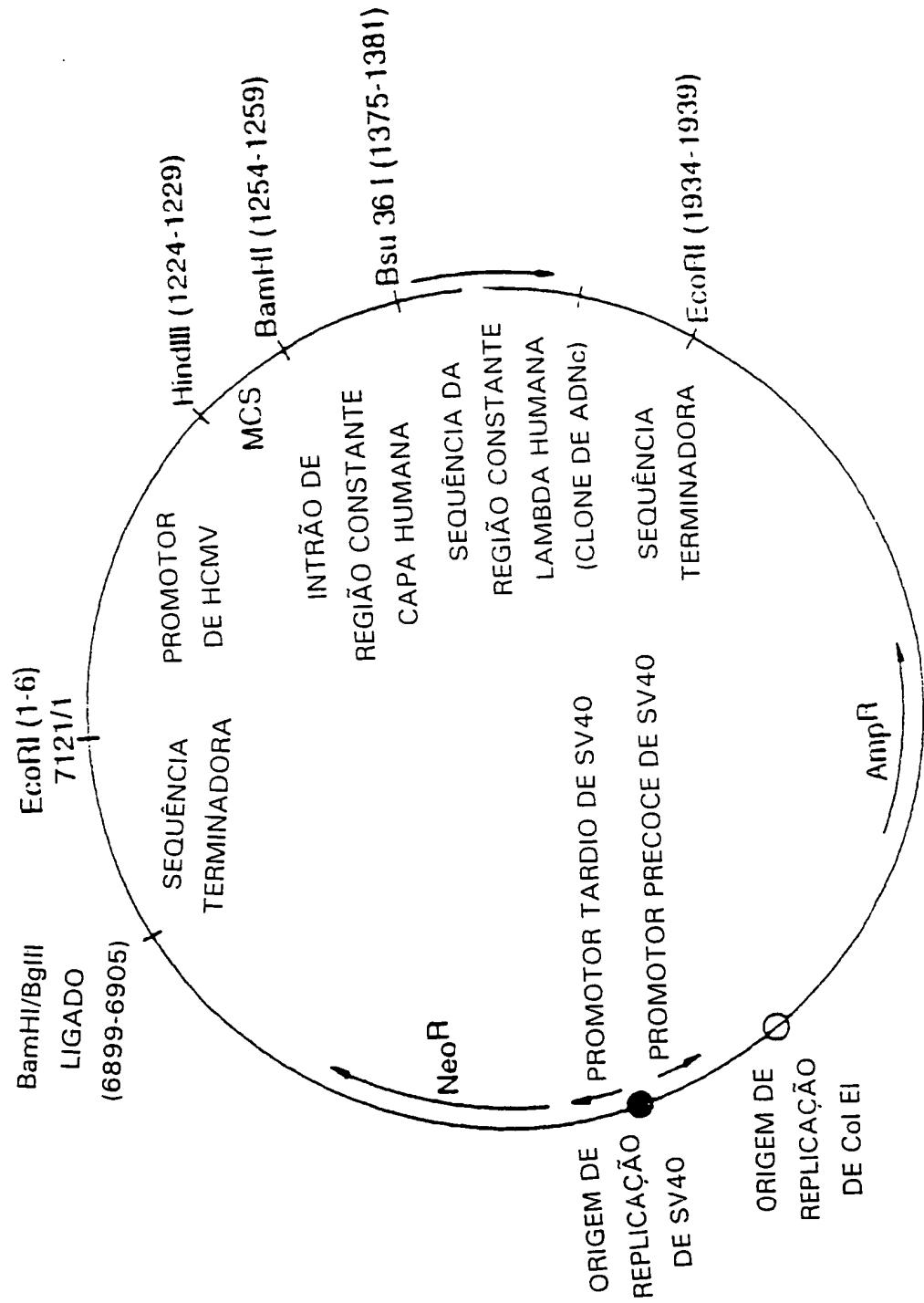
5

6 4 x n m h e

三三

۱۰۷

Fig.8.



[Handwritten signature]

Fig.9.

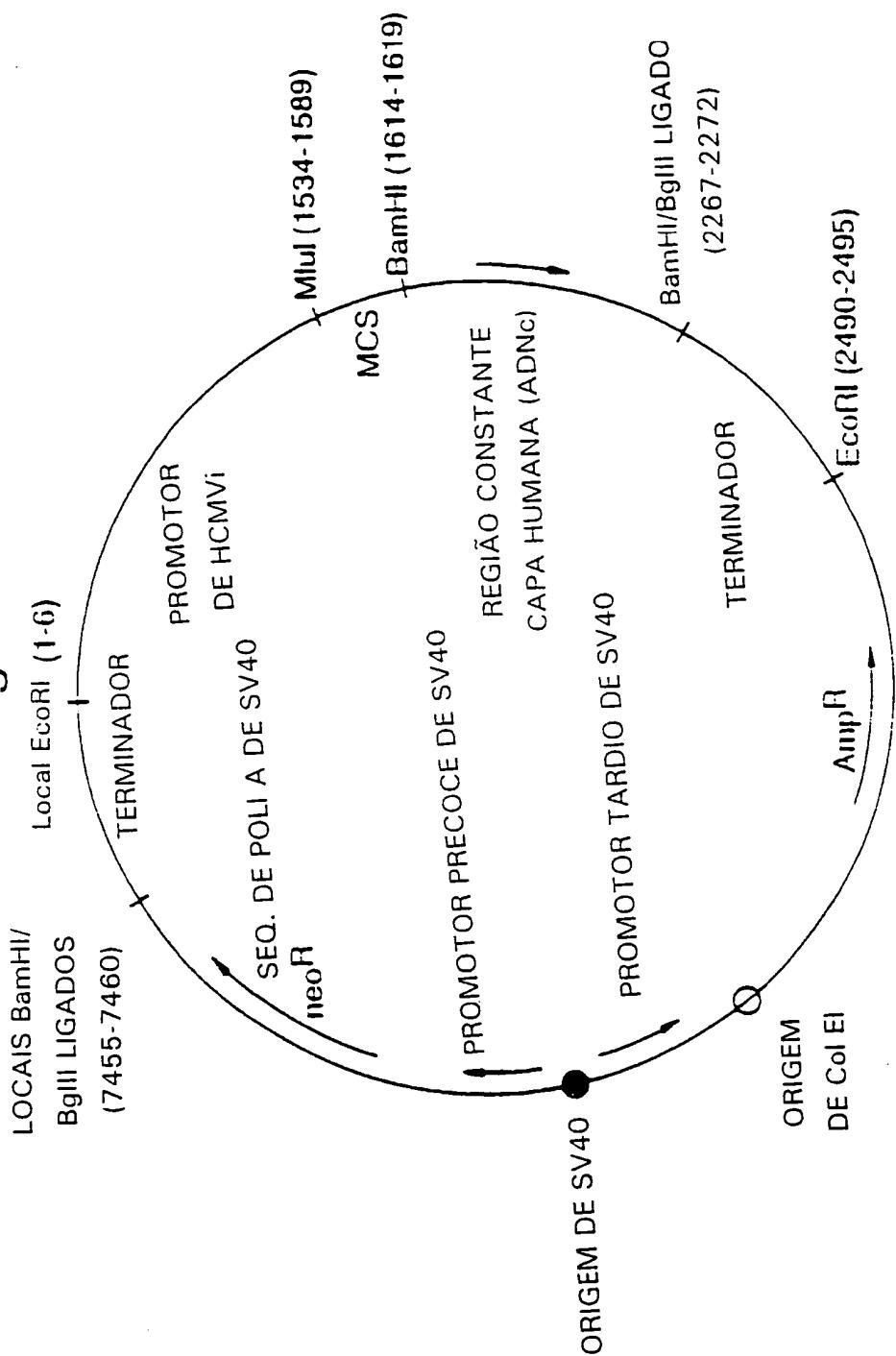
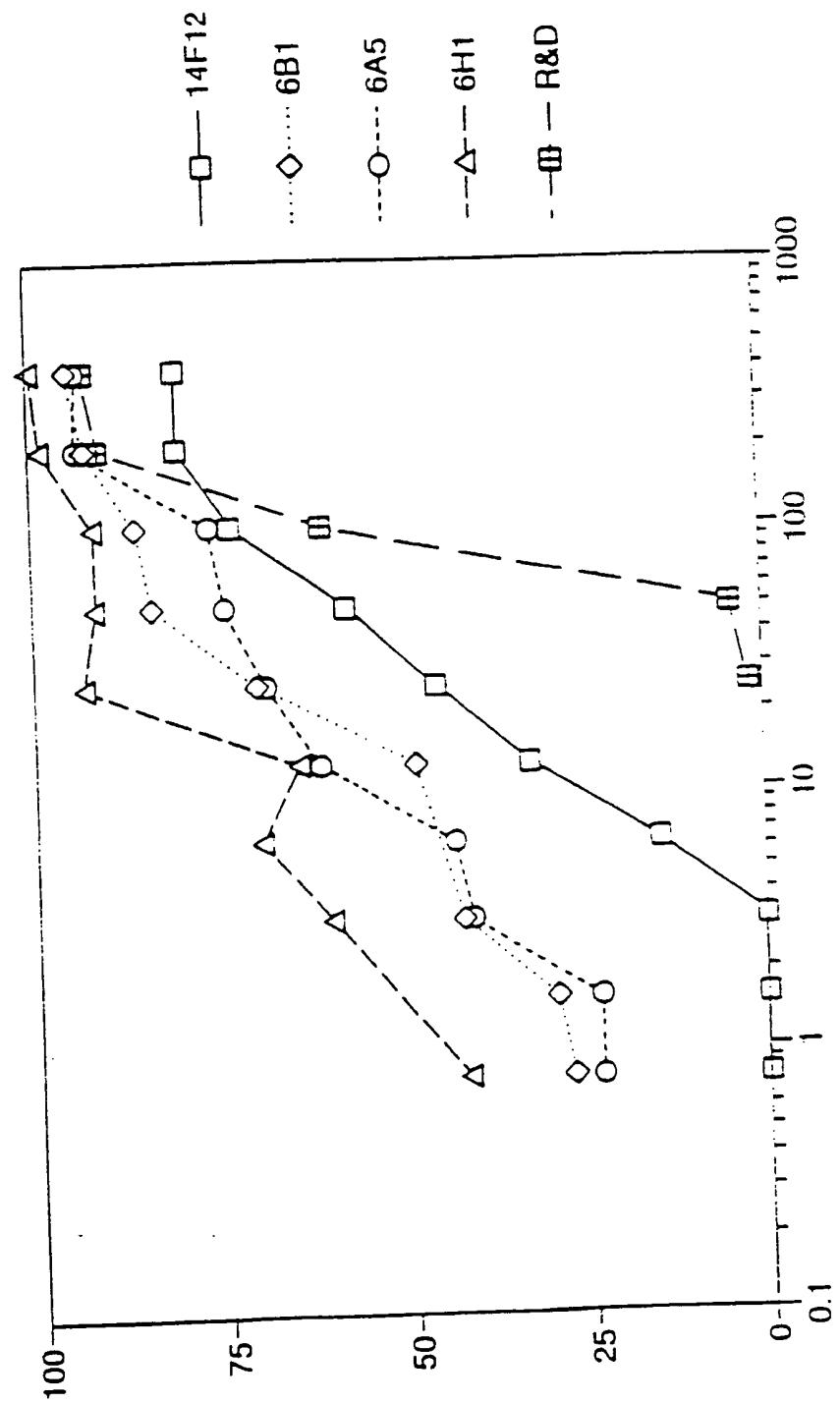
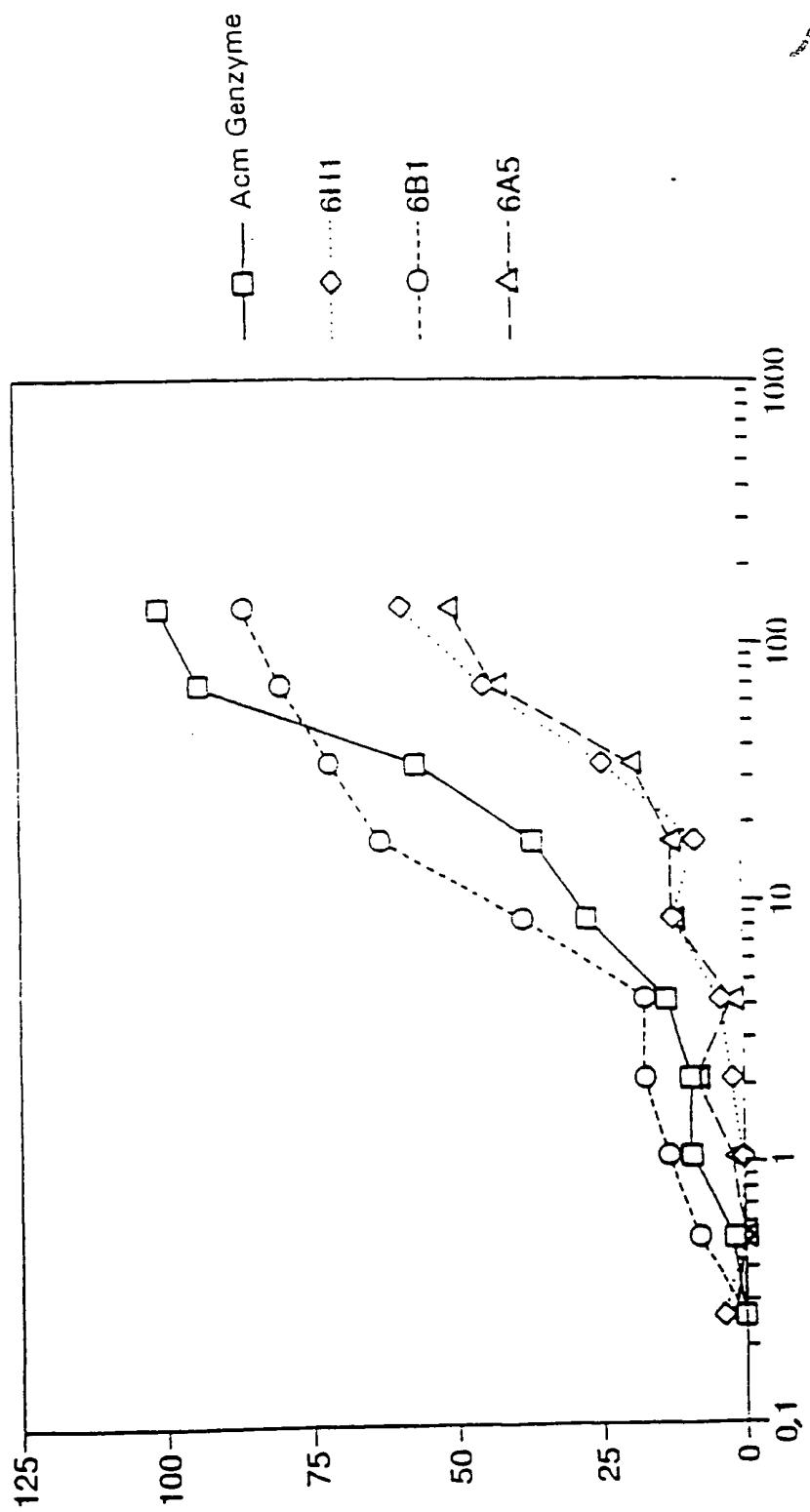


Fig. 10.



[Handwritten signature]

Fig. 11.



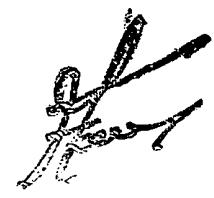
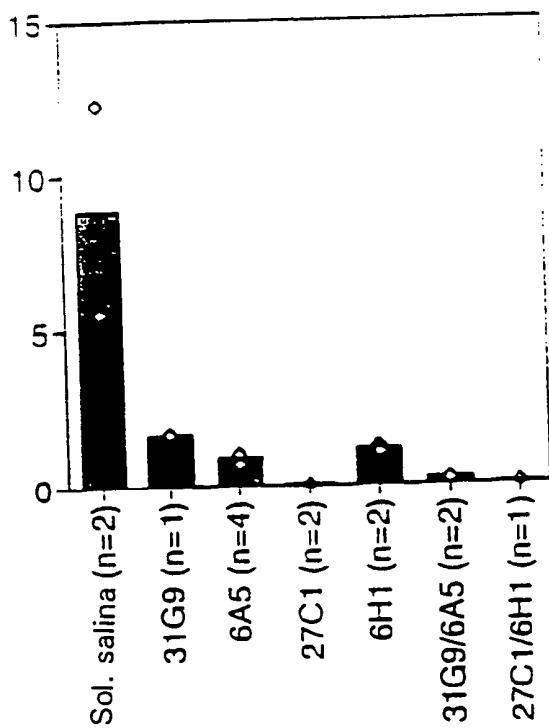
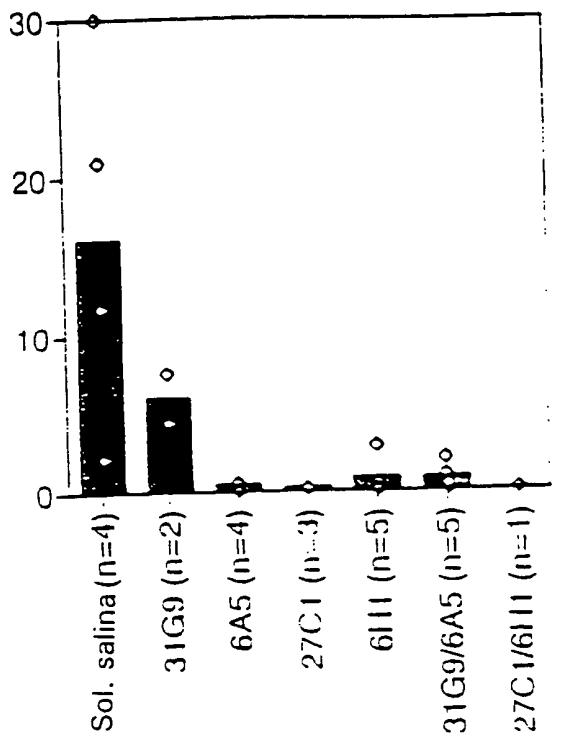
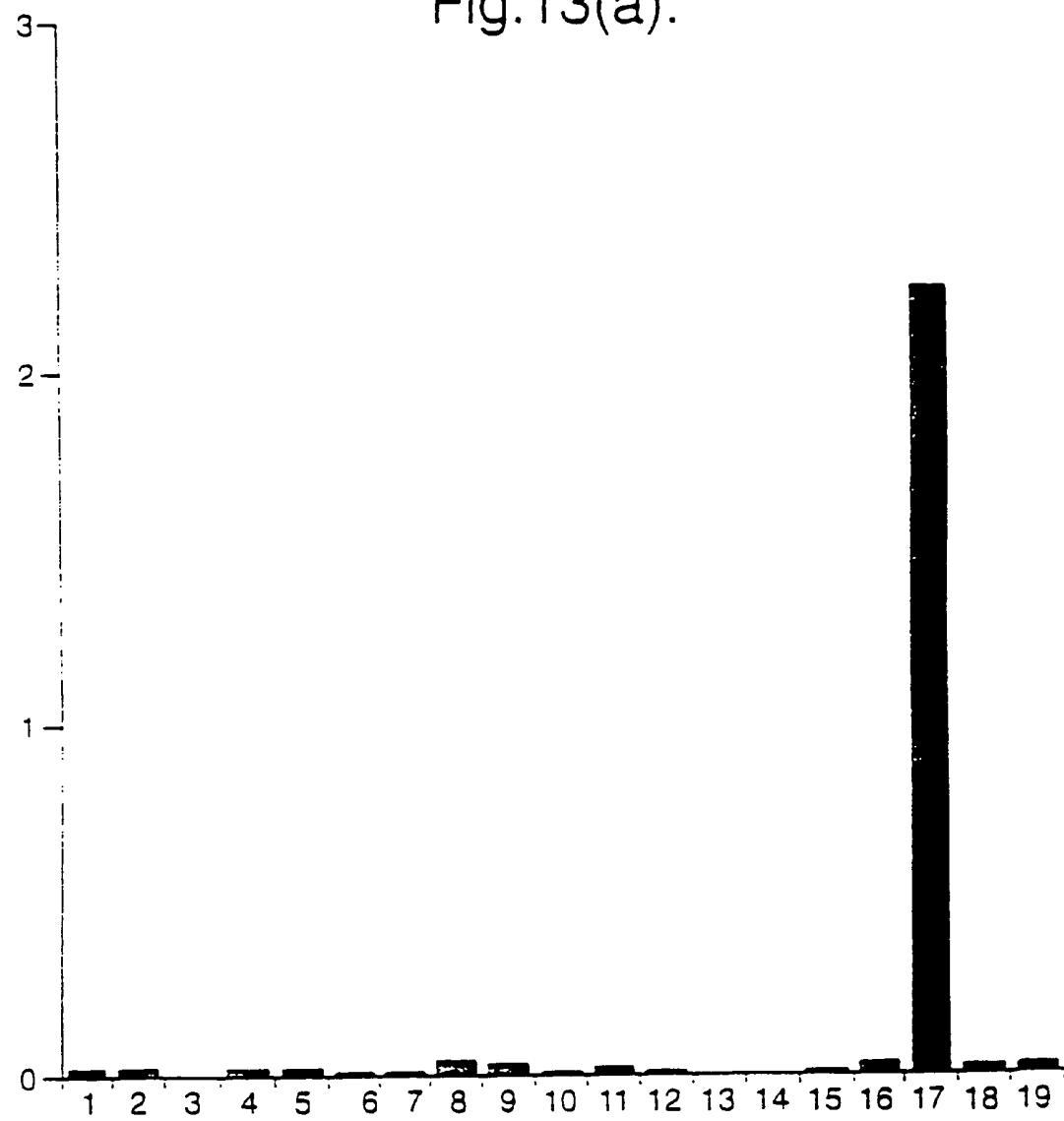


Fig. 12.



[Handwritten signature]

Fig.13(a).



[Handwritten signature]

Fig.13(b).

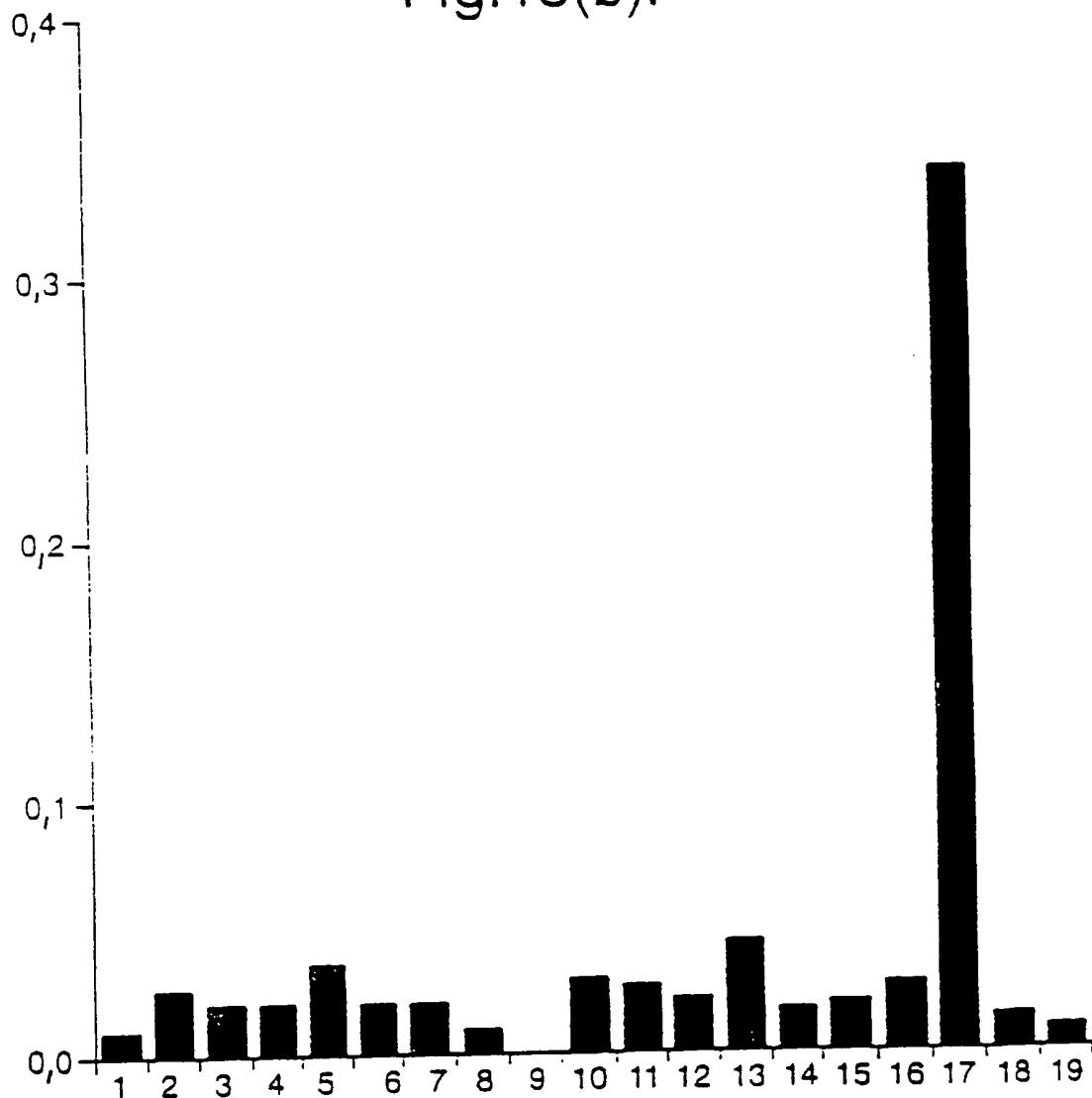


Figura 14

GAA	ATT	GTC	C ^{TG}	ACT	CAG	TCT	CCA	TCC	C ^{TG}	TCT	GCA	TCT	GTA	CGA
E	I	V	L	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G>
10	20	30	40											
50	60	70	80	90										
GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	AGT	CAG	GGC	ATT	GGA	GAT
D	R	V	T	I	P	C	R	A	S	Q	G	I	G	D>
100	110	120	130	140										
T ^{TG}	GGC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAG	CCA	GGG	AAA	GCC	CCP	ATC	C ^{TG}	ATC
L	G	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	I	I,	L>
150	160	170	180	190										
TAT	GGT	ACA	TCC	ACT	T ^{TG}	CAA	AGT	GTC	GTC	CCG	TCA	AGG	T ^{TG}	AGC
Y	G	T	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	GGC
200	210	220	230	240										
AGT	GGA	TCT	GGC	ACA	GAT	T ^{TG}	ACT	C ^{TG}	ACC	AAC	AGC	C ^{TG}	CAG	CCT
S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	N	S	L	P>
250	260	270	280											
GAA	GAT	T ^{TG}	GCA	ACT	TAT	IAC	T ^{TG}	CTA	C ^{TG}	GAT	TCC	AAT	TAC	CCG
E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	D	S	N	Y	P>L>
300	310	320												
ACT	T ^{TG}	GGC	GGA	GGG	ACA	C ^{TG}	GAG	AT ^{TG}	AAA	C ^{TG}				
T	F	G	G	G	T	R	L	E	I	K	R>			

[Handwritten signature]

Fig.15.

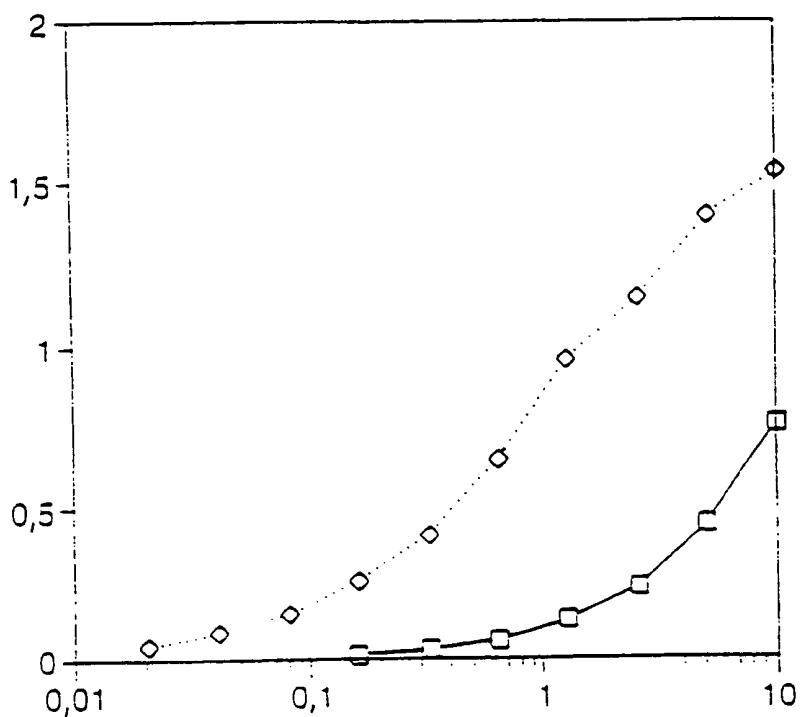
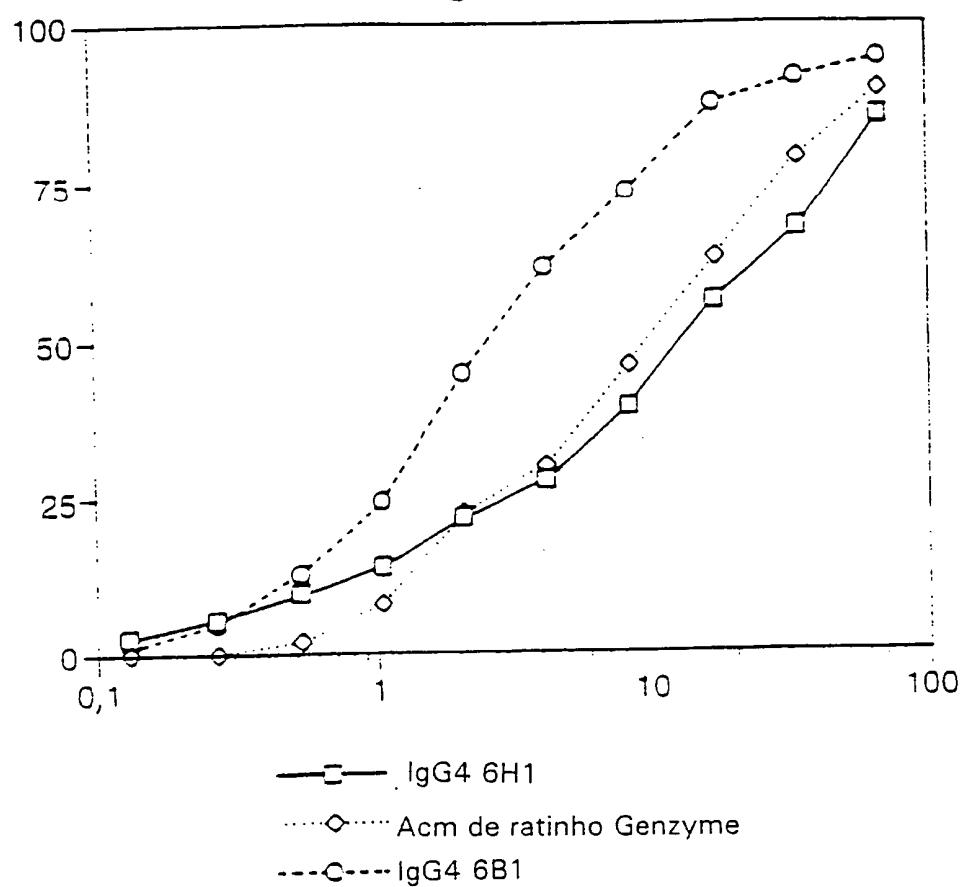
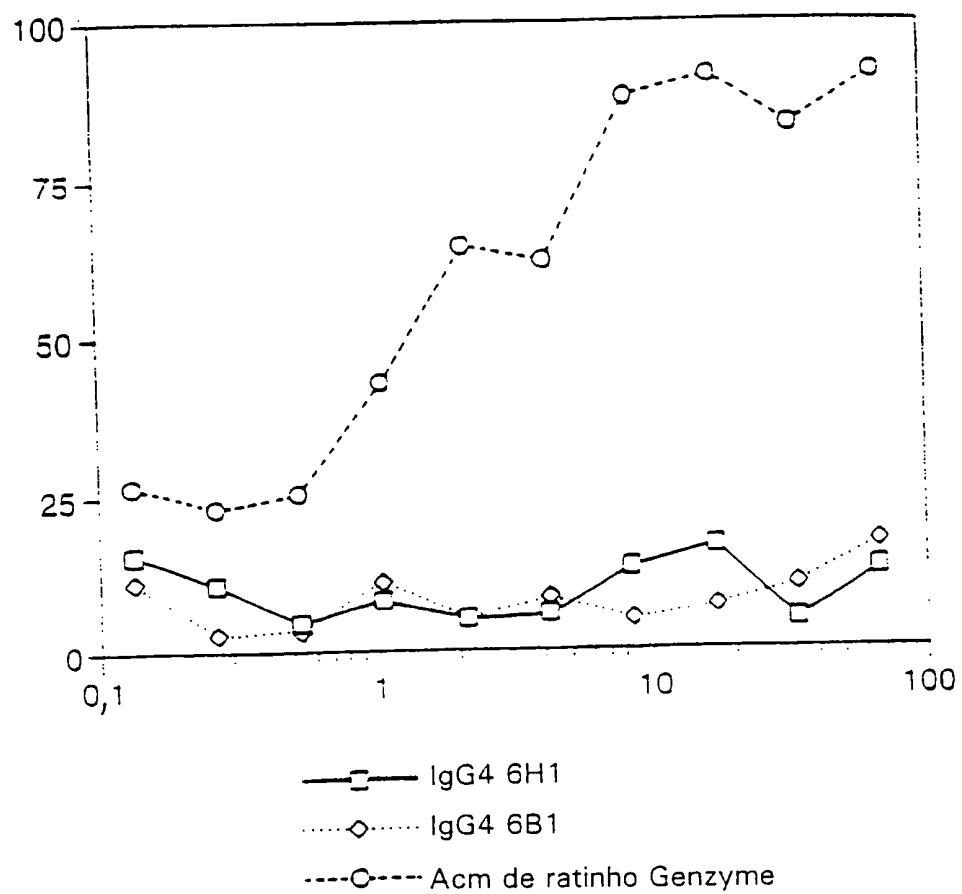


Fig.16.



[Handwritten signature]

Fig.17.



~~SECRET~~

Fig.18.

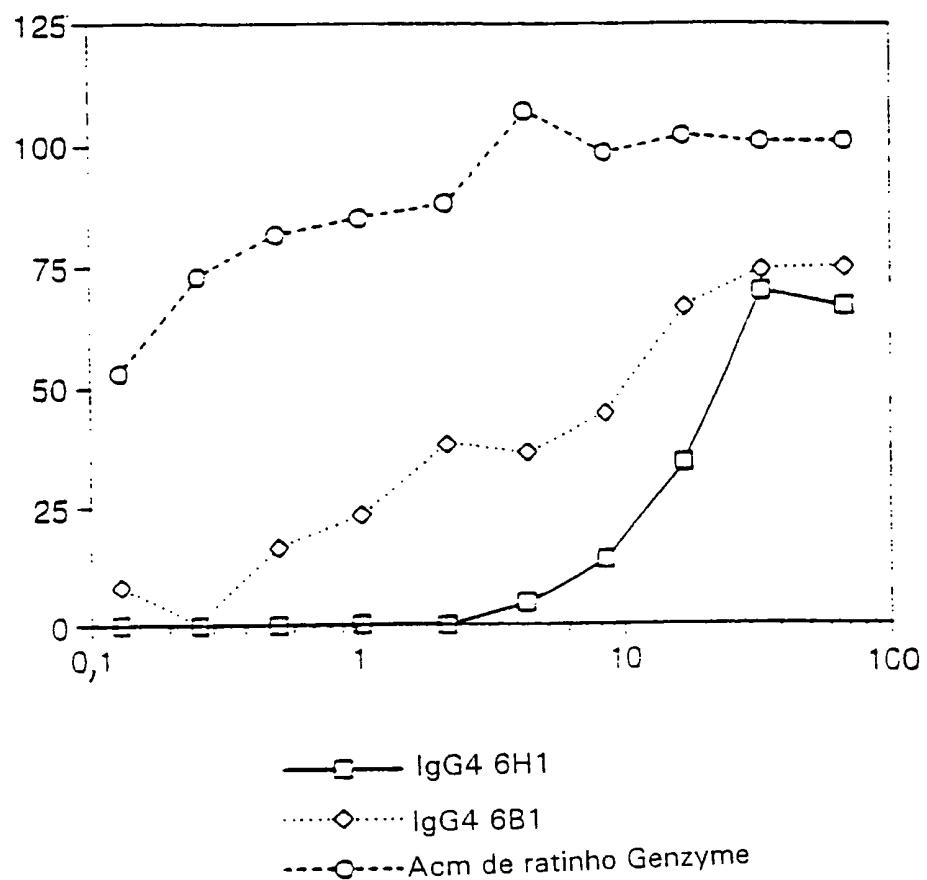


Figura 19

(i)

GAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	CGA	GAC	GTG	GTC	CAG	CCP	GGG	AGG
E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	V	V	Q	P	G	R>
50	60	70	80	90											
TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GGG	TCT	GAA	TTC	ACC	TTC	AGT	AGC	TAT
S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y>
100	110	120	130	140											
GGC	ATG	CAC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GCC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTG
G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	I	E	W	V>
150	160	170	180	190											
GCA	GTG	ATA	TGG	TAT	GAT	CGA	ACT	AAT	AAA	TAC	TAT	GCA	CAC	TCC	GTG
A	V	T	W	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V>
200	210	220	230	240											
AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AOA	GAC	ATC	TCC	AAG	AAC	AGG	CTG	TAT
K	G	R	F	T	J	G	H	D	N	S	R	H	T	I.	Y>
250	260	270	280	290											
CTG	CAA	ATG	GAC	AGC	CAG	GCC	GAG	GAC	AGC	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	
L,	Q	M	D	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C>	
300	310	320	330	340											
GTR	AGA	ACG	CTG	GAG	TCT	AGT	TTC	TGG	GGC	CAA	GGC	ACC	CTC	GTC	ACC
G	R	T	L	E	S	S	L	W	G	Q	G	T	I.	V	T>
V	S	S													

~~Handwritten signature~~

Figura 19 (ii)

10 TCG TCT GAG CTG ACT CGC CCA GCT GTC TCT GTG GCC TGT GGA CAG
S S E I, T Q D P A V S V N I, G Q>
50 AGA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT' GCA
T V R I T C Q D S L H S Y Y A,
100 AGC TGG TAC CAG CAG TAG CCA GGA CAG GCC CCT GTC CTT GTC ATC TAT
S W Y Q K P G Q A P V I, V I Y,
G K N N R P S G T P D H F S G S>
150 GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC TCC
200 AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC ACC ATC ACU GGG GCT CAG GCG GAA
S G N T A S L T P I T G A Q A E>
250 GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC AGC AGT AGT ACC CAT
D E A D Y Y C N S R D S S T I>
290 CGA GGG GTG TGC GGC GGA GGG ACC AAG CTC ACC GTC CTA GGT
R G V F G G G T K I, T V L, G

300 310 320 330

~~32/38~~

~~SECRET~~

Figura 19 (iii)

10 TCG TCT GAG CTG ACT GAC CCA GCT GTC GTC GTC GCA GAA CAG
S S E L T Q D P A V S V A I, G Q>
50 ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA
T V R I T C Q G D S I, R S Y Y A>
100 AGC TGG TAC CAG CAG ARG CCA CGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT
S W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y>
150 CGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC GCT GGC TCC
G K N N R P S G I P D R F A G S>
200 AAC TCA GGA AAC AAC GCT TCC TCC ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAG
N S G N T A S L T P I P O A Q A E>
250 GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AGC TCC CGG GAC AGC AGT GGT AAC CAT
D E A D Y Y C S S R D S S G N H>
290 GTC GTP TPC GGC GGA GGA ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT
V V F G G G T K I, T V I, G

30 70 80 90
33/38

120 130 140
33/38

170 180 190
33/38

210 220 230 240
33/38

260 270 280
33/38

310 320
33/38

86 300
EP 0 945 464/PT

34/38

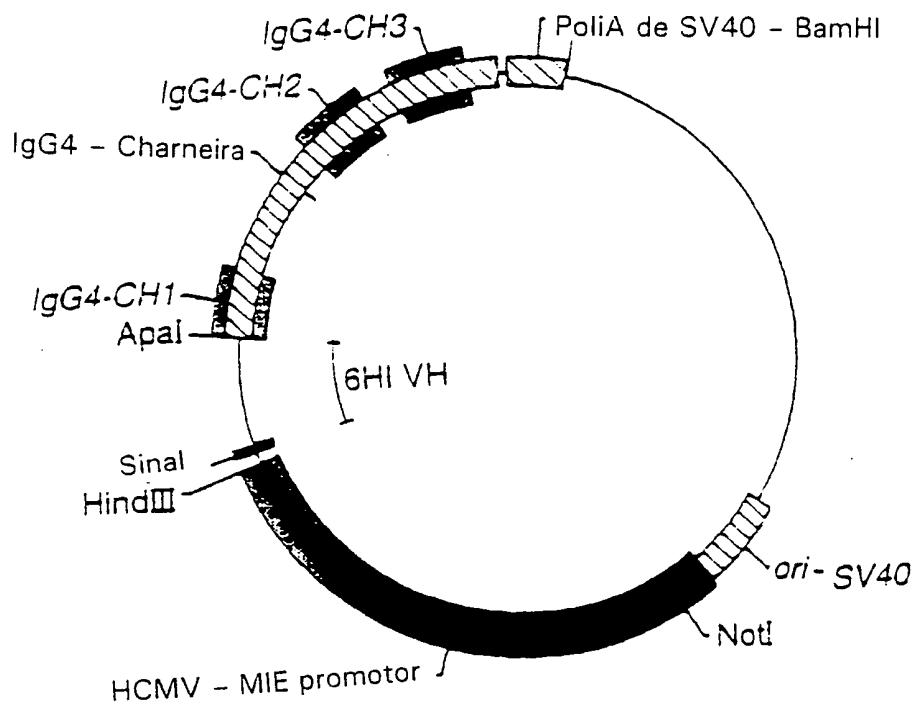
~~SECRET~~

Figura 19(iv)

10 GAT GT^T GTC ATG ACT CAG T^CT CCA T^CC TCC CTG T^CT GCA T^CT GTA CGA
D V M T Q S P S L S A S V G>
50 GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCC AGT CAG GGC ATT AGC AAT TAT
D R V T I T C R A S Q G I S N Y>
100 TTA GCC TGG TAT CAG CAA AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC
L A W Y Q K P G K A P K L L I>
150 TAT AGG GCA TCT ACT TTA GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC
Y K A S T L E S G V P S R P S G>
200 AGT GGA TCT GGG ACA GAA T^TC ACT CTC ACA ATC AGC AGT CTG CAA CCT
S C S G T E P T I T S S I Q P>
250 GAA GAT TTT GCA ACT TAC TGT CAA CAQ AGT TAC AGT ACC CCT CGA
E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P R>
300 ACG T^TC GGC CAA GGG ACC AAA GAT ATC AAA CGT
T F G Q G T K V D I K R
310
320

Hart

Fig.20.



[Handwritten signature]

Fig.21.

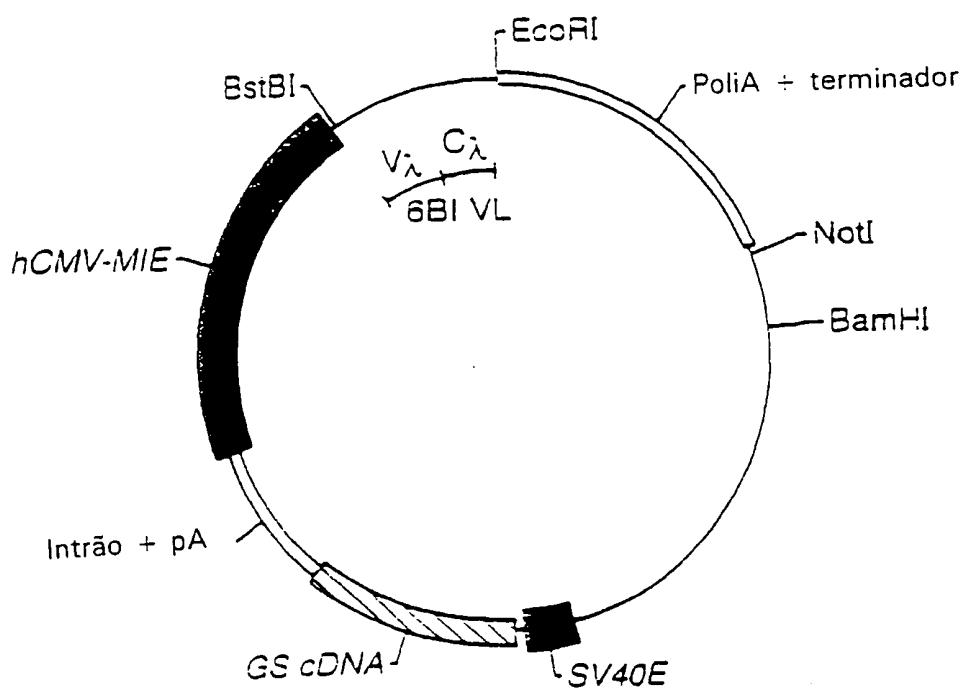
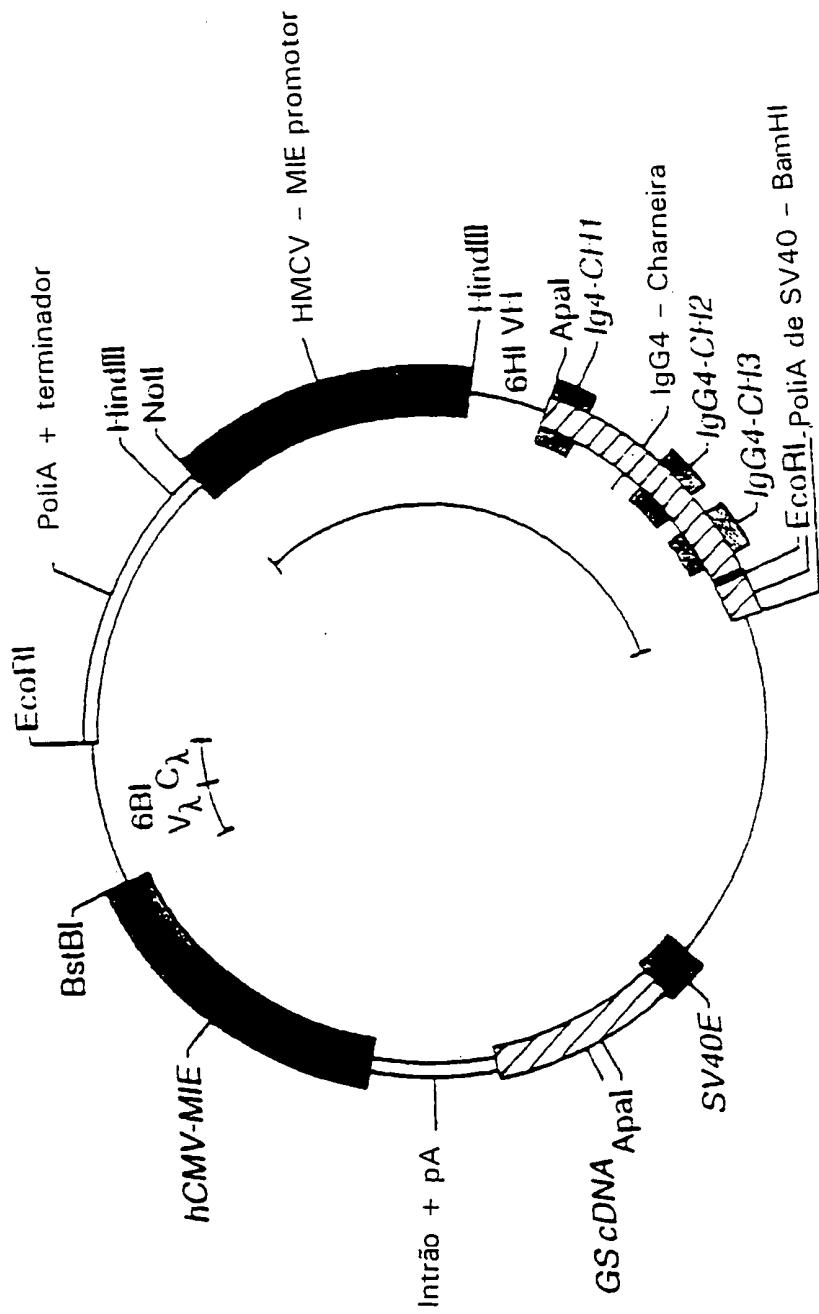


Fig. 22.



~~SECRET~~

Fig.23.

