



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

(21) **PI0613164-6 A2**

(22) Data de Depósito: 19/05/2006  
(43) Data da Publicação: 21/12/2010  
(RPI 2085)



(51) *Int.Cl.:*  
A61K 39/395

(54) Título: **ANTICORPOS ANTI MCP-1, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS**

(30) Prioridade Unionista: 19/05/2005 US 60/682,620,  
19/05/2005 US 60/682,654

(73) Titular(es): CENTOCOR, INC.

(72) Inventor(es): ANUK DAS, MICHAEL BAEDROFF, PING TSUI,  
RAYMOND SWEET

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler &  
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006019627 de 19/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/125202 de 23/11/2006

(57) Resumo: ANTICORPOS ANTI MCP-1, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS. A presente invenção se refere à pelo menos um novo anticorpo anti-MCP-1, incluindo ácidos nucléicos isolados que codificam pelo menos um anticorpo anti MCP-1, MCP-1, vetores, células hospedeiras, animais ou plantas transgênicas, e métodos para a fabricação e utilização do mesmo, incluindo composições terapêuticas, métodos e dispositivos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTICORPOS ANTI MCP-1, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS**".

Antecedentes da Invenção

Referência cruzada à Pedidos de Patente Relacionados.

- 5 A presente invenção reivindica prioridade com relação aos pedidos de patente provisórios U.S. Série de Nº 60/682654 e 60/682620, o teor dos quais fica incorporado em sua totalidade por referência.

Campo da Invenção

- 10 A presente invenção refere-se a anticorpos, incluindo partes ou variantes, específicos para pelo menos uma proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) ou a um fragmento da mesma, bem como a anticorpos antiidiotipo, e a ácidos nucleicos que codificam tais anticorpos anti-MCP-1, ácidos nucleicos complementares, vetores, células hospedeiras, e a métodos para a fabricação e o uso dos mesmos, incluindo formulações terapêuticas, administração e dispositivos.
- 15

Técnica Relacionada

- A Proteína Quimioatrativa de Monócitos-1 (MCP-1) humana (também denominada de CCL-2) uma proteína de 8,6 kDa contendo 76 resíduos de aminoácidos, é um membro da família da quimiocina-beta (ou C-C) das citocinas. As quimiocinas são proteínas quimotáticas, de baixo peso molecular (8 a 10 kDa), induzíveis, pró-inflamatórias que tem mostrado atuar em um papel central na transmigração perivascular e na acumulação de subconjuntos específicos de leucócitos em locais de lesões de tecido. Foram definidas duas famílias principais que dependem do posicionamento de quatro cisteínas conservadas. As CXC ou  $\alpha$ -quimiocinas atraem predominantemente os neutrófilos, enquanto que as CC ou  $\beta$ -quimiocinas atraem predominantemente os monócitos e outros leucócitos, porém não os neutrófilos (Leonard e Yoshimura et al., 1990). Membros da família da Proteína Quimioatrativa de Monócitos-1 (MCP-1) formam um componente principal da família C-C de quimiocinas e são consideradas as quimiocinas principais envolvidas no recrutamento de monócitos, macrófagos, e linfócitos ativados. Observando a homologia das MCP-1 a partir de espécies diferentes, a MCP-1 humana
- 20
- 25
- 30

e do macaco são diferentes somente em 2 aminoácidos revelando uma sequência de identidade de 97%, enquanto que a MCP-1 murina, uma proteína de 13,8 kDa, contendo 125 resíduos de aminoácidos, é diferente da MCP-1 humana em tamanho molecular e no grau de glicosilação.

5 Os receptores da quimiocina pertencem a grande família dos receptores do domínio de sete transmembranas (7 TM) acoplados a proteína G (os GPCR também denominados como receptores serpentinicos). Com base na nomenclatura dos receptores estabelecida na Gordon Research Conference de 1996 com relação às citocinas quimotáticas, os receptores de  
10 quimiocina que se ligam as quimiocinas CXC são designados como os CXCR e os receptores que se ligam as quimiocinas CC são designados como os CCR.

A MCP-1 é conhecida como se ligando e sinalizando através do receptor de quimiocina CCR2. O CCR2 é um receptor acoplado a proteína G  
15 atravessando sete transmembranas expresso em muitas células incluindo monócitos, células T, células B, e basófilos. Dois receptores específicos para a MCP-1, CCR2A e CCR2B, foram clonados e que sinalizam em resposta a concentração nano molares (nM) de MCP-1. Os CCR2A (CC-CKR2A) e CCR2B, (CC-CKR2A) representam dois cDNA que codificam dois receptores  
20 específicos de MCP-1, com caudas de carboxila divididas de forma alternativa. A MCP-1 se liga a ambas as isoformas com alta afinidade, a MCP-1 induz o fluxo de cálcio nas células expressando o CCR2B, porém, não nas células que expressam CCR2A. % vezes menos do MCP-1 induz a quimiotaxia em células que expressam o CCRB2 quando comparadas com as células  
25 que expressam o CCR2A.

São conhecidas outras proteínas com determinadas homologia funcionais e de sequência a MCP-1 humana. Especialmente similares a MCP-1 (GenBank NP\_002973) são a MCP-2 (GenBank NP\_005614) e a eotaxina (GenBank P\_51671); a MCP-2 que tem 61,8 por cento e a eotaxina-1 que tem 63,2 por cento de identidade de sequência com a MCP-1. A  
30 faixa de atividades e o espectro do envolvimento dessas proteínas no mecanismo homeostático e a patologia humanas não é tão bem compreendido

com relação aos homólogos da MCP-1. Por exemplo, a MCP-2 (renomeada como CCL8) é relacionada intimamente a MCP-1 e a MCP-3 (renomeada como CCL7, Genbank NP\_006264) e usa ambos os CCR1 e o CCR2B como os seus receptores funcionais. A MCP-3 se liga a um receptor denominado D6. A MCP-3 também se liga aos CCR10 e CCR1. A sequência da proteína MCP-3 (97 aminoácidos) exibe 74 por cento de identidade com a MCP-1 e 58 por cento de homologia com a MCP-2. A MCP-3 secretada é diferente da MCP-1 em sendo N-glicosilada. A MCP-4 (renomeada como CCL13, Genbank NP\_005399) compartilha em 56 a 61 por cento de identidade de sequência com as três proteínas quimotáticas de monócitos e é 60 por cento idêntica com a Eotaxina-1. As funções da MCP-4 parecem ser altamente similares com aquelas da MCP-3 e a Eotaxina. Tal como a MCP-3, a MCP-4 é um potente atrativo químico para monócitos e linfócitos T. Ela é inativa sobre os neutrófilos. Nos monócitos o MCP-4 se liga aos receptores que reconhecem os receptores de MCP-1, MCP-3, RANTES (CCL5), e eotaxina (os receptores CCR1 e CCR3) e exibem uma desensibilização cruzada total com a eotaxina-1. A MCP-5 é quimiocina CC murina e é relacionada mais proximamente a MCP-1 humana (66% de identidade de aminoácidos). O símbolo do gene para a MCP-5 é SCYA12 (renomeada CCL12). As células transfectadas com o receptor da quimiocina CCR2 foram mostradas como respondendo a MCP-5. Para informação geral sobre as citocinas e as quimiocinas vide <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>, e para o sistema de classificação atual, Zlotnik A., Yoshie O. 2000 Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121 - 127.

25 A 125I-MCP-1 se liga a monócitos e análise de gráfico de Scatchard indicou que os monócitos têm um mínimo de ~ 1700 sítios de ligação por célula com um Kd de ~ 2 nM (Yoshimura e Leonard, 1990). Experimentos posteriores de equilíbrio de ligação com monócitos humanos revelaram a presença de aproximadamente 3000 sítios de ligação por célula com um Kd de 0,77 nM (Ernst et al., 1994). A 125I-MCP-1 também demonstrou uma ligação de alta afinidade a células dEoL-3 expressando o receptor CCR2 um valor de Kd de 0,4 nM (Sarau et al., 1997) confirmando a afinidade sub na-

nomolar da MCP-1 ao seu receptor. Para a identificação das regiões da MCP-1 que entram em contato com o seu receptor CCR2, todos os resíduos com superfícies expostas foram substituídos com alanina. Alguns resíduos também sofreram mutação para outros aminoácidos para a identificação da importância da carga, capacidade hidrófoba, ou aromática em posições específicas. Dois aglomerados de resíduos básicos primários (R24, K35, K38, K49, e Y13), separados por um sulco hidrófobo 35 Å, reduziram o nível de ligação por de 15 a 100 vezes. Os dados sugerem um modelo no qual uma grande área de superfície da MCP-1 entra em contato com o receptor, e o cúmulo de uma quantidade de interações fracas resulta na afinidade 35 pM observada com relação à proteína do tipo natural (WT) (Hemmerich et al., 1999). A faixa de afinidades a partir de 2 nM para baixo até 35 mM na literatura pode ser devido às análises usadas e as respectivas limitações das análises.

São conhecidas outras proteínas com determinada homologia funcional e de sequência com relação à MCP-1 humana. Especialmente similares a MCP-1 (GenBank NP\_002973) são a MCP-2 (GenBank NP\_005614) e a eotaxina (GenBank P\_51671); a MCP-2 que tem 61,8 por cento e a eotaxina-1 que tem 63,2 por cento de identidade de sequência com a MCP-1. A faixa de atividades e o espectro do envolvimento dessas proteínas no mecanismo homeostático e a patologia humanas não é tão bem compreendido com relação aos homólogos da MCP-1. Por exemplo, a MCP-2 é relacionada intimamente a MCP-1 e a MCP-3 (Genbank NP\_006264) e usa ambos os CCR1 e o CCR2B como os seus receptores funcionais. A MCP-3 se liga a um receptor denominado D6. A MCP-3 também se liga ao CCR10. A proteína MCP-3 (97 aminoácidos) exibe 74 por cento de identidade com a MCP-1 e 58 por cento de homologia com a MCP-2. A MCP-3 secretada é diferente da MCP-1 em sendo N-glicosilada. A MCP-4 (Genbank NP\_005399) compartilha em 56 a 61 por cento de identidade de sequência com as três proteínas quimotáticas de monócitos e é 60 por cento idêntica com a Eotaxina-1. As funções da MCP-4 parecem ser altamente similares com aquelas da MCP-3 e a Eotaxina. Tal como a MCP-3, a MCP-4 é um po-

tente atrativo químico para monócitos e linfócitos T. Ela é inativa sobre os neutrófilos. Nos monócitos o MCP-4 se liga aos receptores que reconhecem MCP-1, MCP-3, RANTES (CCR2). Nos esinófilos o MCP-4 tem uma eficácia e potencia similar como o MCP-3, RANTES e Eotaxina. O MCP-4 comparti-  
5 lha receptores com a eotaxina (CCR1 e CCR3) uma desensibilização cruzada total com a eotaxina-1.

Outros anticorpos capazes de se ligar a MCP-1 tem sido informados: a JP JP9067399 descreve um anticorpo obtido a partir de células de sangue isoladas e a JP05276986 descreve um hibridoma que secreta um  
10 MCP-1 IgG anti-humano. Mais recentemente, anticorpos capazes de se ligar a uma pluralidade de beta-quimiocinas incluindo a MCP-1 foram descritos (WO 03048083) e um anticorpo se ligando a MCP-1 que também se liga a eotaxina (US 20040047860).

Por consequência, existe uma necessidade de prover anticorpos  
15 específicos para a MCP-1 humana para uso em terapia para a diminuição ou a eliminação dos sintomas de doenças dependentes da MCP-1, bem como aperfeiçoamento com relação a anticorpos conhecidos ou fragmentos dos mesmos.

#### Sumário da Invenção

20 A presente invenção proporciona anticorpos isolados anti MCP-1 humanos, de primatas, roedores, mamíferos, quiméricos humanizados e/ou enxertados CDR, e outras proteínas derivadas da imunoglobulina, fragmentos, produtos de clivagem e outras partes específicas de variantes das mesmas, bem como composições de anticorpos anti MCP-1, ácidos nucleicos  
25 codificando ou complementares, vetores, células hospedeiras, composições, formulações, dispositivos, animais transgênicos, plantas transgênicas e métodos para a fabricação e utilização dos mesmos, como descritos e possibilitados aqui, neste pedido de patente, em combinação com o que é conhecido na técnica. Além das composições de anticorpos da invenção como descritas aqui, neste pedido de patente, o anticorpo da presente invenção é definido  
30 através da sua afinidade com relação à MCP-1 humana, especificidade com a MCP-1 humana, e a capacidade de bloquear a bioatividade da à

## MCP-1.

A presente invenção também proporciona pelo menos um anticorpo anti MCP-1, tal como, porém não limitados a pelo menos um anticorpo, proteína de fusão ou fragmentos de anticorpo, como descritos aqui, neste pedido de patente. Um anticorpo de acordo com a presente invenção inclui qualquer proteína ou peptídeo que contenha uma molécula que compreenda pelo menos uma parte de uma molécula de imunoglobulina, tal como, porém não limitadas a, pelo menos um domínio de ligação com ligante, tal como, porém não limitado a, uma região variável de cadeia leve ou de cadeia pesada, uma região determinante complementar (CDR) de uma cadeia leve ou pesada ou uma parte de um ligante da mesma como provida na Tabela 4A, B, D e E (SEQ ID NO: 6 a 26); e opcionalmente associada funcionalmente com uma região de estrutura (como por exemplo, FR1, FR2, FR3, FR4 ou um fragmento da mesma como descrito na Tabela 4C (SEQ ID NO: 2 a 5), também compreendendo opcionalmente pelo menos uma CH1, dobradiça, CH2 ou CH3 de uma imunoglobulina humana. A pelo menos uma seqüência de aminoácido de um anticorpo podem também compreender opcionalmente pelo menos uma substituição, inserção ou anulação especificada como descrito aqui, neste pedido de patente ou como conhecido na técnica.

Em uma modalidade, as partes de ligação ao ligante do anticorpo compreendem as SEQ ID NO: 27 ou 28. Em um aspecto, a presente invenção proporciona pelo menos um anticorpo anti MCP-1 isolado de mamífero, que compreende pelo menos uma região variável compreendendo as SEQ ID NO: 27 ou 28.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona pelo menos um anticorpo anti MCP-1 isolado de mamífero, compreendendo tanto (i) todas as regiões determinantes complementares da cadeia pesada (CDR) das seqüências de aminoácido das ID NOS: 6, 7 e 9; ou (ii) todas as seqüências CDR de aminoácido da cadeia leve das SEQ ID NOS: 13, 14 e 16.

A presente invenção proporciona, em um aspecto, moléculas isoladas de ácido nucléico compreendendo, complementares ou se hibridi-

zando a, um polinucleotídeo que codifica anticorpos específicos anti MCP-1, que compreendem pelo menos uma seqüência especificada, parte de domínio ou variante da mesma. A presente invenção também proporciona vetores recombinantes que compreendes as referidas moléculas do ácido nucléico do anticorpo anti MCP-1, bem como os métodos para a fabricação e/ou a  
5 utilização de tais ácidos nucléicos, vetores e/ou células hospedeiras do anticorpo.

Pelo menos um anticorpo da invenção se liga a pelo menos um epítopo especificado, específico para pelo menos uma proteína MCP-1 ou variante ou derivado, tais como aqueles providos na SEQ ID NO: 1. Pelo  
10 menos um epítopo pode compreender pelo menos uma região de ligação com o anticorpo que compreende pelo menos uma parte da referida proteína, cujo epítopo é composto de preferência de pelo menos de 1 a 5 aminoácidos de pelo menos uma parte da mesma, tal como, porém não limitado a  
15 um domínio citoplasmático ou externo funcional, extracelular, solúvel, hidrófilo da referida proteína, ou de qualquer parte da mesma.

Pelo menos um anticorpo pode compreender, opcionalmente pelo menos uma parte especificada de pelo menos uma região determinante complementar (CDR),(como por exemplo, CDR1, CDR2 ou CDR3 da região  
20 variável da cadeia pesada ou leve providas como as SEQ ID NOS: 27 e 28, respectivamente) provida como as SEQ ID NOS: 6, 7, 9, 13, 14 e 16; e opcionalmente ainda compreendendo pelo menos uma região de estrutura constante ou variável ou qualquer parte da mesma, em que o anticorpo bloqueia, inibe ou impede pelo menos uma atividade, tal como, porém não limitada a ligação da MCP-1 ao receptor sobre as superfícies das células, inter-  
25 nalização do receptor CCR2, mobilização de  $Ca^{2+}$  estimulada pela MCP-1, ou qualquer outro ensaio conhecido adequado da MCP-1. Um anticorpo anti MCP-1 pode dessa forma ser varrido com relação a uma atividade correspondente de acordo com métodos conhecidos, tais como, porém não limita-  
30 dos a, pelo menos uma atividade biológica direcionada a uma proteína MCP-1.

A presente invenção também proporciona pelo menos um anti-

corpo antiidiotipo de MCP-1 com relação à pelo menos um anticorpo MCP-1 da presente invenção. O anticorpo antiidiotipo inclui qualquer proteína ou peptídeo que contenha uma molécula que compreenda pelo menos uma parte de uma molécula de imunoglobulina, tal como, porém não limitada a pelo menos uma parte de um ligante (LBP), tal como, porém não limitada a uma região determinante complementar (CFR) de uma cadeia pesada ou leve, ou um ligante de ligando a uma parte da mesma, uma região variável de uma cadeia pesada ou leve, uma região constante de uma cadeia pesada ou leve, uma região de estrutura, ou qualquer parte das mesmas que possa ser incorporada dentro o anticorpo antiidiotipo da presente invenção. Um anticorpo antiidiotipo da invenção pode incluir ou ser derivado a partir de qualquer mamífero, tal como, porém não limitado a um ser humano, um camundongo, um coelho, um rato, um roedor, um primata e os similares.

A presente invenção proporciona, em um aspecto, moléculas de ácido nucléico isoladas compreendendo complementares, ou se hibridizando a um polinucleotídeo codificando pelo menos um anticorpo MCP-1 antiidiotipo, compreendendo pelo menos uma sequência, domínio, parte ou variante especificada do mesmo. A presente invenção ainda proporciona vetores recombinantes compreendendo os referidos anticorpos MCP-1 antiidiotipo, codificando moléculas de ácido nucléico, células hospedeiras que contêm esses ácidos nucléicos e/ou vetores recombinantes, bem como métodos para a fabricação e/ou utilização de tais ácidos nucléicos, vetores e/ou células hospedeiras de anticorpos antiidiotipo.

A presente invenção também provê pelo menos um método para expressar pelo menos um anticorpo anti MCP-1 ou um anticorpo MCP-1 antiidiotipo, em uma célula hospedeira, compreendendo cultivar uma célula hospedeira como descrito aqui, neste pedido de patente sob condições nas quais pelo menos um anticorpo anti MCP-1 seja expresso em quantidades detectáveis e/ou recuperáveis.

A presente invenção também provê pelo menos uma composição compreendendo (a) um anticorpo anti MCP-1 isolado codificando ácido nucléico e/ou um anticorpo como descrito aqui, neste pedido de patente; e

(b) um veículo ou diluente adequado. O veículo ou diluente pode ser opcionalmente farmacologicamente aceitável, de acordo com veículos ou diluentes conhecidos. A composição pode opcionalmente compreender também pelo menos um outro composto, proteína ou composição.

5                   A presente invenção também proporciona pelo menos um método ou composição de anticorpo anti MCP-1, para administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz para a modulação ou o tratamento de pelo menos uma condição relacionada com a MCP-1 em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente e/ou, antes de, em seguida a, ou durante uma  
10                   condição relacionada, como conhecido na técnica, e/ou como descrito aqui, neste pedido de patente.

                  A presente invenção também proporciona pelo menos uma composição, dispositivo e/ou método para o suprimento de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti  
15                   MCP-1, de acordo com a presente invenção.

                  A presente invenção também proporciona pelo menos um método ou composição de anticorpo anti MCP-1, para diagnosticar pelo menos uma condição relacionada com a MCP-1 em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente e/ou, antes de, em seguida a, ou durante uma condição relacionada, como conhecida na técnica e/ou como descrita aqui, neste pedido  
20                   de patente.

                  A presente invenção também proporciona pelo menos uma composição, dispositivo e/ou método de suprimento para o diagnóstico de pelo menos um anticorpo anti MCP-1, de acordo com a presente invenção.

25                   Em um aspecto a presente invenção proporciona pelo menos um anticorpo anti MCP-1 isolado de mamífero, compreendendo pelo menos uma região variável compreendendo as SEQ ID NOS: 27 ou 28.

                  Em um aspecto, a presente invenção proporciona pelo menos um anticorpo anti MCP-1 isolado de mamífero, compreendendo tanto  
30                   (i) todas as seqüências de aminoácido das regiões determinantes complementares da cadeia pesada (CDR) das SEQ ID NOS: 6, 7 e 8 ou 9; com o (ii) todas as seqüências de aminoácido CDR da cadeia leve das SEQ ID NOS:

13, 14 e 15 ou 16.

Em outro, aspecto a presente invenção proporciona pelo menos um anticorpo anti MCP-1 isolado de mamífero, compreendendo pelo menos uma de (i) todas as seqüências de aminoácido das regiões determinantes complementares da cadeia pesada (CDR) das SEQ ID NOS: 6, 7 e 8 ou 9; 5 como (ii) todas as seqüências de aminoácido CDR da cadeia leve das SEQ ID NOS: 13, 14 e 15 ou 16.

Pelo menos um anticorpo pode opcionalmente adicionar pelo menos um de: ligar a MCP-1 com uma afinidade de pelo menos uma selecionada a partir de pelo menos  $10^{-10}$  M, pelo menos  $10^{-11}$  M, ou pelo menos  $10^{-12}$  M; neutralizar substancialmente pelo menos uma atividade de pelo menos uma proteína MCP-1. Também é provido um ácido nucléico isolado que codifica pelo menos um anticorpo isolado MCP-1 de mamífero; um vetor isolado de ácido nucléico compreendendo o ácido nucléico isolado, e/ou uma 15 célula hospedeira procariótica ou eucariótica que compreenda o ácido nucléico isolado. A célula hospedeira pode opcionalmente ser pelo menos uma selecionada a partir de NSO, COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, YB2/0, SP2/0, HeLa, células de mieloma ou de linfoma, ou qualquer célula derivada, imortalizada das mesmas. Também é provido um método para a produção de pelo menos um anticorpo anti MCP-1 compreendendo a translação do ácido nucléico codificando o anticorpo sob condições in vitro, in vivo ou in situ, de tal forma que o anticorpo MCP-1 seja expresso 20 em quantidades detectáveis e recuperáveis.

Também é provida uma composição compreendendo pelo menos um anticorpo anti MCP-1 isolado de mamífero e pelo menos um veículo 25 ou diluente farmacêuticamente aceitável.

Também é provido um método para o diagnóstico ou o tratamento de uma condição relacionada com a MCP-1 em uma célula, tecido, órgão ou animal, compreendendo (a) por em contato ou administrar uma composição 30 que compreendendo uma quantidade eficaz de pelo menos anticorpo anti MCP-1 isolado de mamífero da invenção, com ou para a célula, tecido, órgão ou animal.

Também é provido um dispositivo médico, compreendendo pelo menos um anticorpo anti MCP-1 isolado de mamífero da invenção, em que o dispositivo é adequado para por em contato ou administrar pelo menos um anticorpo MCP-1 através de pelo menos um modo selecionado a partir de

5 parenteral, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intra-articular, intrabrônquica, intra-abdominal, intracapsular, intracartilagenosa, intracavitária, intracélica, intra-cerebelar, intracérebro-ventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intra-hepática, intra miocárdica, intra-óssea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitônia, intrapleuial, intraprostática, intrapulmonar, intra-

10 retal, intra-renal, intra-retina, intra-espinhal, intra-sinovial, intratorácica, intra-uterina, intravesical, intralesional, bolus, vaginal, retal, bucal, sublingual, intranasal ou transdérmica.

Também é provido um artigo de fabricação para uso farmacêutico ou diagnóstico humano, compreendendo material de embalagem e um

15 recipiente compreendendo uma solução, particulada ou uma forma liofilizada de pelo menos um anticorpo anti MCP isolado de mamífero da presente invenção.

Também é provido um método para a produção de pelo menos um anticorpo anti MCP isolado de mamífero da presente invenção, compre-

20 endendo prover uma célula hospedeira ou um animal transgênico ou planta ou célula de planta transgênica capaz de expressar o anticorpo em quantidades recuperáveis. Também é provido na presente invenção pelo menos um anticorpo anti MCP-1 produzido através do método acima.

A presente invenção provê ainda qualquer invenção descrita a-

25 qui, neste pedido de patente.

#### Breve Descrição da Relação de Seqüências

SEQ ID NO:	Descrição
1	MCP-1 humano (CCL2) e variantes usadas para selecionar os ligantes anti-MCP-1
2	VH1A seqüência variável de cadeia pesada: FR1, CDR1, FR2, variantes DR2, FR3, CDR3, FR4
3	VH3 seqüência variável de cadeia pesada: FR1, CDR1, FR2, variantes CDR2, FR3, CDR3, FR4

SEQ ID NO:	Descrição
4	Kappa3 seqüência variável de cadeia leve: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, variantes CDR3, FR4
5	Lambda3 seqüência variável de cadeia leve: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, variantes CDR3, FR4
6	VH1A CDR1 Todo MOR03471
7	VH1A CDR2 3781, 3790, CDR2 888
8	VH1A CDR2 3899
9	VH1A CDR3 Todo MOR03471
10	VH3 CDR1 Toda MOR03548
11	VH3 CDR2 3744, 3747
12	VH3 CDR3 Todo MOR03548
13	Kappa3 CDR1 Todo MOR03471
14	Kappa3 CDR2 Todo MOR03471
15	Kappa3 CDR3 3781
16	Kappa3 CDR3 3790, CDR3 888
17	Kappa3 CDR3 3899
18	Lambda3 CDR1 Todo MOR03548
19	Lambda3 CDR2 Todo MOR03548
20	Lambda3 CDR3 3744
21	Lambda3 CDR3 3747
22	VH1A Variantes CDR2
23	VH3 Variantes CDR2
24	Lk Variantes CDR3
25	LA Variantes CDR3
26	HC Variantes CDR1
27	CNT0888 Região Variável de Cadeia Pesada
28	CNT0888 Região Variável de Cadeia Leve

#### Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção proporciona pelo menos um anticorpo purificado, isolado, recombinante e/ou sintético anti MCP-1 humana, primata, roedor, mamífero, quimérica, humanizada, manipulada ou enxertada CDR, anticorpos e anticorpos MCP-1 antiidiotipo dos mesmos, bem como composições e codificando moléculas de ácido nucléico, compreendendo pelo me-

nos um polinucleotídio codificando pelo menos um anticorpo anti MCP-1 ou um anticorpo antiidiotipo. A presente invenção também inclui, porém não está limitada a, métodos para a fabricação e a utilização de tais ácidos nucleicos e anticorpos e anticorpos antiidiotipos, incluindo composições, métodos e dispositivos diagnósticos e terapêuticos.

Citações: Todas as publicações ou patentes citadas aqui, neste pedido de patente estão inteiramente incorporadas por referência aqui, neste pedido de patente na medida em que elas mostrem o estado da técnica no tempo da presente invenção e/ou para prover descrições e modalidades da presente invenção. As publicações referentes a quaisquer publicações científicas ou de patentes, ou qualquer outra informação disponível em qualquer formato de mídia, incluindo todos os formatos gravados, eletrônicos ou impressos. As referências que se seguem ficam inteiramente incorporadas aqui, neste pedido de patente por referência: Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2004); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2004); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2004).

#### Abreviaturas:

aa: aminoácido; BSA: albumina de soro bovino; CDR: regiões complementares-determinantes; ECL: luminescência química-elétrica; HuCAL®: Human Combinatorial Antibody Library; HSA: albumina do soro humano; MCP-1: proteína quimioatrativa de monócitos-1; Ig: Imunoglobulina; IPTG: isopropil β-D-tiogalactosídeo; mAb: anticorpo monoclonal; PBS: solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4; SET: titulação de equilíbrio de solução; VH: região variável de cadeia pesada da imunoglobulina; VL: região variável de cadeia leve da imunoglobulina.

#### Definições

Na forma usada aqui, neste pedido de patente, um "anticorpo anti MCP-1", "parte de um anticorpo anti MCP-1", ou "fragmento de um anti-

corpo anti MCP-1", e/ou "variante de um anticorpo anti MCP-1", e os similares incluem qualquer proteína ou peptídeo contendo uma molécula que compreenda pelo menos uma parte de uma molécula de imunoglobulina, tal como, porém não limitadas a uma região determinante complementar (CDR) de uma cadeia pesada ou leve ou um ligante ligando partes das mesmas, uma região variável de uma cadeia pesada ou leve, uma região constante de uma cadeia pesada ou leve, uma região de estrutura, ou qualquer parte das mesmas, ou pelo menos uma parte de um receptor ou proteína de ligação de MCP-1, que possa ser incorporada dentro de um anticorpo da presente invenção. Esse anticorpo opcionalmente também efetua um ligante específico, tal como, porém não limitado a quando esse anticorpo modula, diminui, aumenta, antagoniza, migra, alivia, bloqueia, inibe, anula e/ou interfere com pelo menos uma atividade ou ligação de MCP-1, ou com a atividade ou ligação do receptor MCP-1, *in vitro*, *in situ* e/ou *in vivo*. Como um exemplo não limitativo, um anticorpo anti MCP-1 adequado, parte especificada ou variante da presente invenção pode se ligar a pelo menos uma MCP-1 ou partes especificadas, variantes ou domínios da mesma.

Na forma usada aqui, neste pedido de patente "epítopo" significa um segmento ou uma característica de uma proteína capaz de ligação específica a um anticorpo. Os epítopos consistem usualmente em agrupamentos de moléculas de superfície quimicamente ativa tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e usualmente tem características estruturais de três dimensões, bem como características específicas de carga. Os epítopos de conformação e de não conformação são distinguidos em que a ligação ao anterior porém não o anterior, é perdida na presença de solventes de desnaturação. Os epítopos de proteínas que resultam a partir da dobragem de conformação da molécula do MCP-1 que aparecem quando aminoácidos a partir de partes que diferem da sequência linear da molécula de MCP-1 ficam juntas em proximidade íntima em espaço tridimensional são incluídas.

Por "MCP-1" é significada uma sequência de 76 aminoácidos, referenciada no número de acesso NP\_002973 registrado no NCBI e de modo variado conhecida como MCP (proteína quimiotática de monócito), SMC-

CF (fator quimiotático de células da musculatura lisa), LDCF (fator quimiotático derivado de linfócito), GDCF (fator quimiotático de monócito derivado de glioma), TDCF (fatores quimiotáticos derivados de tumor), HC11 (citocina 11 humana), MCAF (monócito quimiotático e fator de ativação). O símbolo do gene é SCYA2, O gene JE no cromossomo humano 17, e a nova designação é CCL2 (Zlotnik, Yoshie 2000, *Immunity* 12: 121 a 127). O JE é o homólogo de camundongo de MCP-1/CCL2 humano.

Na forma usada aqui, neste pedido de patente, a expressão "anticorpo humano" se refere a um anticorpo no qual substancialmente cada parte da proteína (como por exemplo, CDR, estrutura, domínios C<sub>L</sub>, C<sub>H</sub> (como por exemplo, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3,), dobradiça (V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>), é derivado a partir de eventos de recombinação de seqüências de gene da linha de germe da imunoglobulina humana ou a partir de seqüências maduras de anticorpo humano. Além dos anticorpos humanos isolados, esses anticorpos podem ser obtidos através da imunização de camundongos transgênicos capazes de montar uma resposta de imunização com os genes da linha de germe da imunoglobulina humana (Lonberg *et al.*, *Int Rev Immunol* 13(1):65-93 (1995) e Fishwald *et al.*, *Nat Biotechnol* 14(7):845-851 (1996)) ou podem ser selecionados a partir de uma coleção de repertório de anticorpos humanos tais como descritas aqui, neste pedido de patente. Uma fonte dessas seqüências de gene humano pode ser encontrada em qualquer coleção adequada tal como a VBASE, uma base de dados de genes de anticorpos humanos (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc>) ou produtos traduzidos da mesma ou em <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/> que dá anticorpos humanos classificados em bases de agrupamento em suas similaridades de seqüência de aminoácido. Com o âmbito desta definição também são os anticorpos compostos ou fragmentos funcionais de um anticorpo composto humano que inclua regiões de estrutura a partir de uma ou mais seqüências de anticorpos humanos e regiões CDR a partir de duas fontes humanas ou não humanas.

Dentro da definição de "anticorpo humano" está um anticorpo composto ou fragmento funcional de um anticorpo composto humano que contenha regiões de estrutura a partir da linha de germes e das seqüências de anticorpo

humano rearranjadas e regiões CDR de duas fontes diferentes de anticorpos. Um anticorpo humano compósito ou um fragmento funcional de um anticorpo humano compósito de acordo com esta descrição inclui regiões de estrutura a partir de um ou mais seqüências de anticorpos humanos, e regiões CDR derivadas a partir de seqüências de anticorpos humanos ou não humanos ou pode ser totalmente sintética. Desse modo, um anticorpo humano é diferente de um anticorpo quimérico ou humanizado. É mostrado que um anticorpo humano pode ser produzido a partir de um animal não humano ou de célula procariótica ou eucariótica que seja capaz de expressar genes de imunoglobulina humana funcionalmente rearranjada (como por exemplo, de cadeia pesada e/ou cadeia leve). Além disso, quando um anticorpo humano é um anticorpo de cadeia única, ele pode compreender um peptídio de ligação que não seja encontrado em anticorpos humanos naturais. Por exemplo, um Fv pode compreender um peptídio de ligação, tal como de dois até cerca de oito resíduos de glicina ou de outro aminoácido, que se conecta a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve. Esses peptídios de ligação são considerados como sendo de origem humana.

Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (como por exemplo, murinos) são anticorpos quiméricos que tiveram partes da seqüência, que foram derivadas a partir de imunoglobulina não humana substancialmente substituídas. Em sua maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulina humana (anticorpo receptor) na qual os resíduos da CDR (regiões determinantes complementares que também são conhecidas como as regiões hipervariáveis) do receptor são substituídos por resíduos CDR de uma espécie não humana (anticorpo doador), tais como camundongo, rato, coelho ou primata não humano que tenham a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos pelos resíduos não humanos correspondentes. Além desses, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais o

desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões hipervariáveis correspondem aquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas das FR são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também irá compreender pelo menos uma parte de uma região constante da imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina IgG humana. Para maiores detalhes, vide Jones et al., Nature 321: 522 a 525 (1986); Reichmann et al., Nature 332: 323 a 329 (1988); e Presta, Curr. Op. StrStruct. Biol. 2: 593 a 596 (1992).

Na forma usada aqui, neste pedido de patente, o  $K_D$  de um anticorpo se refere a constante de dissociação,  $K_D$  do anticorpo com relação a um antígeno predeterminado e é uma medida da afinidade do anticorpo com relação a um alvo específico. Os anticorpos de alta afinidade tem um  $K_D$  de  $10^{-8}$  M ou menos, de mais preferência de  $10^{-9}$  M ou mesmo e ainda de mais preferência de  $10^{-10}$  M ou menos, com relação a um antígeno predeterminado. O termo " $K_{dis}$ " ou " $K_D$ " ou " $K_d$ " na forma usada aqui, neste pedido de patente é destinado a se referir a taxa de dissociação específica de um anticorpo-antígeno. O " $K_p$ ", é a proporção de dissociação ( $k_2$ ), também chamada de " $(K_{off})$  fora de taxa, com relação à taxa de associação  $K_1$ ). Desse modo a  $K_D$  se iguala a  $k_2/k_1$  ou  $k_{off}/k_{on}$  e é expressa como uma concentração molar (M). Se segue que quanto menor a  $K_D$  mais forte a ligação. Desse modo uma  $K_D$  de  $10^{-6}$  M (ou 1 micro M) indica uma ligação fraca quando comparada a  $10^{-9}$  M (ou 1 nM).

Na forma usada aqui, neste pedido de patente, as expressões "especificidade para" e "ligação específica" e "se liga especificamente" se refere a um anticorpo se ligando a um antígeno predeterminado com uma afinidade maior do que a outros antígenos ou proteínas. Tipicamente, o anticorpo se liga a uma constante de dissociação ( $K_D$ ) de  $10^{-7}$  M ou menos, e se liga ao antígeno predeterminado com uma  $K_D$  que é de pelo menos duas vezes menos do que o seu  $K_D$  para a ligação a um antígeno não específico

(como por exemplo, BSA, caseína, ou qualquer outro polipeptídio especificado) que não o antígeno predeterminado. As frases "um anticorpo reconhecendo um antígeno" e "um anticorpo específico com relação a um antígeno" são usadas de forma intercambiável aqui, neste pedido de patente com a

5 frase "um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno" ou "um anticorpo específico para um antígeno", como por exemplo, um anticorpo específico para MCP-1.

#### 1. Preparação de Anticorpos da Invenção.

A preparação de anticorpos humanos que sejam específicos

10 com relação à proteína humana MCP-1 ou fragmentos da mesma (incluindo moléculas sintéticas, tais como peptídios sintéticos) pode ser realizada com a utilização de qualquer técnica adequada conhecida na área. Os anticorpos humanos podem ser produzidos com a utilização de diversas técnicas conhecidas na área. Em uma modalidade, o anticorpo humano é selecionado a

15 partir de uma coleção de fagos, em que a coleção de fagos expressa anticorpos humanos (Vaughan et al. Nature Biotechnology 14: 309 a 314 (1996); Sheets et al. PITAS (USA) 95: 6157 a 6162 (1998)); Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227 :381 (1991); Marks et al. J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)).

20 Os anticorpos humanos também podem ser feitos através da introdução de locais da imunoglobulina humana dentro de animais transgênicos, como por exemplo, camundongos nos quais os genes endógenos da imunoglobulina tenham sido parcialmente inativados. Por exemplo, um camundongo transgênico, compreendendo um transgene de cadeia pesada de

25 imunoglobulina humana rearranjada de forma funcional e um transgene compreendendo DNA a partir de um locus de uma cadeia leve de imunoglobulina humana que possa ser submetido a um rearranjo funcional, pode ser imunizado com uma MCP-1 humana ou um fragmento da mesma para provocar a produção dos anticorpos. Se desejado, as células produtoras de

30 anticorpo podem ser isoladas e hibridomas ou outras células de produção de anticorpo imortalizadas podem ser preparadas como descrito aqui, neste pedido de patente na forma conhecida na técnica. Alternativamente, o anti-

corpo, parte especificada ou variante pode ser expresso com a utilização de ácido nucléico codificante ou uma parte do mesmo em uma célula hospedeira adequada.

Quando confrontada com um antígeno apropriado, a produção de anticorpo humano é observada, que se parece intimamente com aquela observada em seres humanos em todos os sentidos, incluindo o rearranjo dos genes, montagem e repertório de anticorpos. Essa abordagem está descrita, por exemplo, nas Patentes U. S. N°s 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, e nas seguintes publicações científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779 a 783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856 a 859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812 a 3 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845 a 51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg and Huezar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65 a 93 (1995).

Alternativamente, o anticorpo humano pode ser preparado através da imortalização de linfócitos B humanos produzindo um anticorpo direcionado contra um antígeno-alvo (tais linfócitos B podem ser recuperados a partir de um indivíduo ou podem ter sido imunizados *in vitro*). Vide, por exemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1): 86 a 95 (1991); e a Patente U.S. N° 5.750.373. As células que produzem anticorpo também podem ser obtidas a partir do sangue periférico ou, de preferência no baço os nos nodos linfáticos de seres humanos ou de animais adequados que tenham sido imunizados com o antígeno de interesse. Qualquer outra célula hospedeira adequada também pode ser usada para a expressão de um ácido nucléico heterólogo ou endógeno que codifica um anticorpo, fragmento ou variante especificado do mesmo, da presente invenção. As células fundidas (hibridomas) ou células recombinantes podem ser isoladas com a utilização de condições de cultura seletiva ou outros métodos adequados conhecidos e clonadas diluição limitativa ou escolha de células, ou outros métodos conhecidos. As células que produzem anticorpos com a especificidade desejada podem ser selecionadas através de uma análise adequada (por

exemplo, ELISA).

Em uma abordagem, é produzido um hibridoma através da fusão de uma linha de células imortais (por exemplo, uma linha de células de mieloma tal como, porém não limitadas a Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIIWA, NEURO 2A), ou similares, ou heteromielomas ou produtos de fusão das mesmas, ou qualquer célula ou célula de fusão derivada das mesmas, ou de qualquer outra linha de células conhecidas na técnica. Vide, por exemplo, [www.atcc.org](http://www.atcc.org); [www.lifetech.com](http://www.lifetech.com); e os similares, com células de produção de anticorpos tais como, porém não limitadas a células isoladas ou clonadas do baço, sangue periférico, linfa, amídalas ou outras células inumes ou células B que contenham células ou outras células expressando seqüências de cadeia pesada ou leve, constantes ou variáveis ou de estrutura ou de CDR, tanto os ácidos nucléicos endógenos ou heterólogos como recombinantes ou endógenos, viróticas, bacterianas, de algas, procarióticas, de anfíbios, insetos, répteis, peixes, de mamíferos, roedores, eqüinas, ovinas, de cabras, ovelhas, primatas, eucarióticas, DNA genômico, cDNA, rDNA, DNA ou RNA mitocondico, DNA ou RNA clo-  
roplástico, hRNA, mRNA, tRNA, de filamento único, duplo ou triplo, hibridizada e os similares ou quaisquer combinações das mesmas. Vide, por exemplo, Ausubel, supra e Colligan Immunology, supra, capítulo 2, inteiramente incorporados aqui, neste pedido de patente por referência.

Os anticorpos humanos que se ligam a COM-1 humana e que compreendem uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve podem ser preparados com a utilização de métodos adequados, tais como exibição de fase (Katsube, Y., *et al.*, *Int J Mol. Med*, 1(5): 863 a 868 (1998)). Outros métodos adequados para a produção ou isolamento de anticorpos da especificidade exigida podem ser usados, incluindo, porém não limitados a, métodos que selecionam um anticorpo recombinante a partir de uma coleção de peptídeo ou de proteínas (como por exemplo, porém não limitados a, um bacteriófago, ribossomo, oligonucleotídeo, RNA, cDNA ou similares, coleção

de exibição; por exemplo, como as disponíveis a partir de Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, Suécia; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys. Vide, por exemplo as EP 368.684. PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260(5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO 90/14443; WO 90/14424; WO 90/14430; PCT/US94/1234; WO 92/18619; WO 96/07754; (Scripps); WO 96/13583. WO 97/08320 (MorphoSys); WO 95/16027 (BioInvent); WO 88/06630; WO 90/3809 (Dyax); US 4.704.692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO 89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); ou peptídios ou proteínas gerados "estocasticamente" - U. S. 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689 (Ixsys, adora Applied Molecular Evolution (AME), cada uma incorporada em sua totalidade aqui, neste pedido de patente por referência) ou que se apóia sobre a imunização de animais transgênicos (vide, por exemplo, SCID mice, Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41: 901a 907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16: 95 a 118 (1996); Eren et al., Immunol. 93:154 a 161 (1998), cada uma das quais é incorporada em sua totalidade aqui, neste pedido de patente por referência.

#### Modalidade Específica.

As requerentes exemplificaram um método para selecionar e fabricar anticorpos humanos com as desejadas afinidade, especificidade e bioatividade direcionadas a MCP-1 humana iniciando a partir de uma coleção Fab de fago de exibição humano. Em resumo, a partir de todas as 10 seleções ("pannings") iniciais foram examinados 17.856 clones que levaram a 1104 achados primários e finalmente a 46 Fabs únicos.

Com a finalidade de prover um ligante único que exemplificasse uma capacidade de retenção do antígeno de se ligar a receptores MCP-1 de ocorrência natural, o MCP-1 humano e seus análogos ou "miteínas" foram quimicamente sintetizados e modificados para usos específicos em ensaios

de seleção, afinidade e biológicos. O MCP-1-Ile<sup>41</sup> e o MCP-1 Tyr<sup>43</sup> humano foram usados na seleção de fase sólida inicial bem como em outros aspectos das análises de seleção do anticorpo e afinidade de maturação e descritos aqui, neste pedido de patente, como foram as versões biotiniladas a mu-  
5 teína MCP-1: Ile41, Lys(Biotin-PEG<sub>4</sub>)<sup>69</sup>) e (Ile41, Lys(Biotin-PEG<sub>4</sub>)<sup>75</sup> (SEQ ID NO: 1).

Devido a que nenhum dos 26 Fabs únicos tinha uma afinidade medida como  $K_D < 0,5$  nM ou os valores  $IC_{50}$  desejados nas bioanálises específicas, a maturação foi essencial. Os candidatos com relação a matura-  
10 ção da afinidade foram selecionados e as respectivas IgG foram analisadas em paralelo ao processo de maturação. Os critérios de seleção foram: 1) a atividade na análise de ligação do receptor em célula inteira, 2) a atividade na análise de mobilização do cálcio, 3) a afinidade ao MCP-1 humano, 4) a especificidade com relação ao MCP-1 humano, e 5) a afinidade com relação  
15 ao MCP-1 "cyno" e a ligação ao MCP-1 natural.

As medições de afinidade "Biacore" no modo de captura da Fab com o MCP-1 em solução funcionou bem com relação a classificação dos candidatos a maturação e as afinidades ficaram na faixa de 49 a 406 nM. O melhor Fab de origem mostrou uma afinidade de 50 nM, indicando que a  
20 afinidade tinha de ser otimizada pelo menos 100 vezes para alcançar o critério de sucesso da afinidade. Além disso, a ligação com o MCP-1 de macacos cynomolgus e ao MCP-1 humano natural pode ser detectada no modo de captura do Fab, que foi um pré-requisito adicional para a maturação. As afinidades com o MCP-1 do macaco cynomolgus estiveram na mesma faixa  
25 como para o MCP-1 humano. Devido as modificações potenciais, como por exemplo, a glicosilação, teve que ser mostrado que os anticorpos não somente reconhecem o COM-1 recombinante ou sintético porém também o MCP-1 original que foi expresso de forma endógena e purificado a partir do sobrenadante de células PANC-1 humanas.

30 A especificidade com relação ao MCP-1 humano foi medida no modo de captura do anticorpo em Biacore com a adição de 100 nM de cada cimocina e detectando o sinal de ligação, A maioria dos candidatos Fab à

maturação foram específicos, enquanto que uma dupla mostrou um pouco de reatividade cruzada a quimiocinas homólogas.

Uma característica muito importante do Fab foi a atividade de neutralização e diversos ensaios diferentes foram feitos para a análise desta  
5 atividade. O ensaio e análise de células  $^{125}\text{I}$  MCP-1 THP-1 foi a análise mais sensível, o que foi especialmente importante depois da otimização. Os Fabs de origem mostraram valores de  $\text{IC}_{50}$  a partir de 10 a 650 nM. Além da análise de ligação através de radioligante, outras análises biológicas secundárias foram planejadas para provar a atividade de neutralização em níveis diferen-  
10 tes do trajeto de sinalização a jusante do MCP-1.

A atração de monócitos é uma das funções principais do MCP-1, porém mais provavelmente devido a falta de atividade, os fatores co-purificados ou endotoxinas, os Fabs de origem não funcionam na análise de quimiotaxia e por esse motivo foi concordado testar somente a respectiva  
15 IgG1, no lugar de tentar fazer com que os Fabs funcionassem nessa análise. Outro evento de sinalização á jusante é a liberação do cálcio para dentro do citoplasma. Com certeza todos os Fabs, que exibiram atividade de neutralização na análise de ligação do ligante radio, inibiram a mobilização do cálcio induzida pelo MCP-1 nas células THP-1 com uma faixa de  $\text{IC}_{50}$  a partir de  
20 0,1 até 3  $\mu\text{M}$ . Teve que ser mostrado que a atividade biológica das Fabs de origem foi completamente retida depois da conversão para dentro do formato IgG. Como esperado toda a respectiva IgG exibiu atividade na análise de ligação do radioligante, na análise de mobilização do cálcio e mesmo na análise de quimiotaxia, provando finalmente que todas as IgG retêm a ativi-  
25 dade observada no formato Fab e mesmo inibiram a quimiotaxia induzida pelo MCP-1.

Para maturação por afinidade, sete Fabs diferentes com um  $K_D$  na faixa de 10 - 400 nM e valores de  $\text{IC}_{50}$  na faixa de 10 - 650 nM na análise de ligação por ligante de radiação, foram selecionados de acordo com as  
30 suas características. Em seguida eles foram agrupados em 3 grupos para a clonagem da coleção e a subsequente seleção. As otimizações das L-CDR3 e H-CDR2 foram realizadas em paralelo. Bibliotecas de alta qualidade foram

geradas. A seleção, por solução foi usada para o processo de seleção e o rigor da seleção foi aumentado através da redução do antígeno, seleção fora de qualidade e etapas muito longas de lavagem. Para o processo de triagem que se segue uma triagem BioVeris foi usada permitindo uma classificação de alto resultado dos ligantes otimizados. A triagem funcionou de forma muito eficiente para a identificação de ligantes melhorados. Além disso as Fabs otimizadas em L-CDR3 e H-CDR2 puderam ser identificadas tornando possível a clonagem cruzada com relação aos derivados MOR03471 e MOR03548. Especialmente a clonagem cruzada dos derivados MOR03471 foi feita com bastante sucesso levando a uma afinidade adicional melhorada 100 vezes quando comparada com os dois Fabs otimizados de partida. Dos 17 Fabs otimizados, 16 foram selecionados para caracterização detalhada e finalmente 4 ligantes, que satisfazem todos os critérios de sucesso, derivados a partir do MOR03471 de origem, dois foram otimizados somente em L-CDR3 e dois vieram da clonagem cruzada. A análise de candidatos a maturação por afinidade e as seqüências estão detalhados nos Exemplos 3 e 4, Tabelas 4 - 6 e nas SEQ ID NOS: 2 - 28.

Depois da maturação, a afinidade dos ligantes otimizados não pode ser analisada e, Biacore principalmente na medida em que os limites de detecção foram alcançados. Em MorphoSys, foi usado um método de determinação de  $K_D$  muito sensível, sendo uma titulação de equilíbrio de solução \*SET combinado com tecnologia BioVeris. As constantes de dissociação monovalentes puderam ser calculadas por meio de modelos ajustados para Fab e IgG. Além da medição da afinidade, este método foi usado para os estudos de reatividade cruzada. As afinidades dos candidatos finais estavam na faixa de 10 até 320 pM para MCP-1 humanos e cynomolgus, medidas em BioVeris e confirmadas por KinezA em Centocor. O teste de especificidade com a utilização de BioVeris não mostrou reatividade cruzada para o MCP-1 humano com relação a todos os 16 Fabs e IgG testados. Vários Fabs e IgG também não mostraram reatividade cruzada significativa com relação a Eotaxina humana. De acordo com os critérios de sucesso, os critério de especificidade foi fixado como não ligando à 100 mM aos homólogos huma-

nos MCP-2, 3, 4 e 100 nM á Eotaxina humana 2, 2 e 3 no modo de captura de anticorpos Biacore. Na captura de Fab no modo Biacore todos os Fabs selecionados exibiram graus diferentes de reatividade cruzada com o MCP-2 e Eotaxina. A instabilidade putativa ligeiramente aumentada dos Fabs comparados com os IgG e a capacidade geral não específica de ligação das quimiocinas podem ter contribuído para a ligação não específica. Várias das IgG selecionadas não exibiram um sinal de ligação significativo com relação as quimiocinas homólogas e satisfizeram os critérios de sucesso de especificidade no modo de captura de IgG Biacore. Nos experimentos de titulação de solução em equilíbrio com a utilização de BioVeris mesmo vários Fabs não exibiram reatividade cruzada. Para analisar se a atividade de ligação do Fab ao MCP-2 detectado em Biacore se traduz em atividade de neutralização, foram desenvolvidas análises de ligação de radioligante em célula total em Centocor. Os Fabs testados nessa análise não mostraram uma inibição significativa de ligação de MCP-2 marcados com  $^{125}\text{I}$  do receptor CCR2 em células Thp-1 ( $\text{IC}_{50} \geq 2 \mu\text{M}$ ).

Devido a baixa quantidade de 1 ng/ml de MCP-1 necessária, a análise de ligação por radioligante foi a análise mais sensível neste projeto com um limite de  $\text{IC}_{50}$  de análise de cerca de 100 pM para o Fab e mesmo de 10 pM para a IgG. Além da afinidade, a atividade nesta análise foi usada para a classificação e seleção de ligantes otimizados com relação a caracterização detalhada. O melhoramento total na atividade durante a otimização foi até um fator de 1000 x e finalmente um derivado de Fab MOR03471, MOR03878 exibiu a afinidade mais alta a 110 pM. Todas as IgG testadas conservaram a atividade na análise de ligação por radioligante. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  dos 4 candidatos finais de IgG, MOR03781, MOR03790, MOR03750 e MOR033878, estavam na faixa de 20 a 50 pM, sendo mesmo ligeiramente melhores, quando comparados com a respectiva atividade dos Fab. Uma razão para a atividade melhorada é que a IgG bivalente neutraliza dois MCP-1 por molécula (fator 2 x). As iGg vem de uma produção pura de alta escala e por esse motivo uma outra razão pode ser a pureza, estabilidade ou a atividade dos anticorpos. Como uma bioanálise secundária uma análise com

base em FACS, medindo a inibição da internalização do receptor CCR2 induzida pelo MCP-1, foi desenvolvida com sucesso. Finalmente a análise ainda permitiu a determinação e a classificação dos IC<sub>50</sub>. Os 4 candidatos finais Fabs MOR03790, MOR03850, MOR03781 e MOR03878 exibiram valores de IC<sub>50</sub> na faixa de 3 até 5 nM.

O MCP-1 natural foi necessário para a confirmação das atividades dos anticorpos MCP-1 isolados contra os MCP-1 sintéticos ou recombinantes. O MCP-1 natural foi purificado a partir do sobrenadante de PANC1 e usado para a indução da liberação de cálcio. Os Fabs otimizados mostraram a inibição da mobilização de cálcio induzida pelo MCP-1 natural com uma atividade mais elevada se comparados aos anticorpo de referência C775. Todos os Fabs pré-selecionados derivados de MOR03548 inibiram completamente a ligação do C775 ao MCP-1 em um ELISA de competição. Todos os Fabs pré-selecionados derivados de MOR03471 mostraram uma competição parcial (-60%) em ELISA indicando que os epítomos estão pelo menos se sobrepondo. Finalmente os quatro anticorpos MOR03781, MOR03790, MOR03850 e MOR03878 preencheram todos os critérios de sucesso incluindo o critério de especificidade e a neutralização do MCP-1 natural.

#### Outros métodos adequados de produzir anticorpos.

Outros métodos para a produção de anticorpos da invenção que sejam capazes de produzir um repertório de anticorpos humanos, como conhecidos na técnica e/ou como descritos aqui, neste pedido de patente. Essas técnicas incluem, porém não estão limitadas a exibição de ribossomo Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 4937 a 4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 14130 a 14135 (Nov. 1998)); tecnologias de produção de anticorpos de célula única (por exemplo, método selecionado de linfócito de anticorpo ("SLAM") (Patente U.S. Nº 5,627,052, Wen et al., J. Immunol. 17: 887 a 892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843 a 7848 (1996)); micro gotícula de gel e citometria de fluxo (Powell et al., Biotechnol. 8: 333 a 337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray et al., J. Imm. Meth. 182: 155 a 163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13: 787 a 790 (1995)); seleção de célula B (Steenbakkers et al.,

Mlec. Biol. Reports 19: 125 a 134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda (1988)).

Os métodos para a manipulação ou a humanização de anticorpos não humanos ou humanos também podem ser usados e são bem-conhecidos na técnica. Geralmente, um anticorpo humanizado ou manipulado tem um ou mais resíduos de aminoácido a partir de uma fonte que seja não humana, como por exemplo, porém não limitadas a, camundongo, rato, coelho, primata não humano ou outro mamífero. Os resíduos de aminoácidos humanos são quase sempre referidos como resíduos "importados", que são tipicamente tomados a partir de um domínio de "importação" variável ou outro domínio de uma sequência humana conhecida. As seqüências de IgG humana são bem-conhecidas na técnica e podem ser qualquer uma das seqüências conhecidas. Diversas estratégias para a otimização da ligação, conformação e capacidade de geração de imunização de anticorpos humanos manipulados têm sido descritas em, vide, por exemplo, Presta et al. J Immunol. 151: 2623 a 2632, 1993; WO 2003/02019, e WO 2005/080432.

Essas seqüências importadas podem ser usadas para a redução da capacidade de geração de imunização ou reduzir, aumentar ou modificar a ligação, afinidade, fora de qualidade, dentro de qualidade, voracidade, especificidade, meia-vida ou qualquer uma outra característica adequada, como conhecidas na técnica. Geralmente parte ou todas as seqüências não humanas ou humanas de CDR são mantidas enquanto que as seqüências não humanas de regiões variáveis e constantes são substituídas com aminoácidos humanos ou outros aminoácidos. Os anticorpos podem ser opcionalmente humanizados com a conservação da alta afinidade com relação ao antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para alcançar esse objetivo, os anticorpos humanizados podem ser opcionalmente preparados através de um processo de análise das seqüências de origem e diversos produtos conceituais humanizados com a utilização de modelos tridimensionais das seqüências de origem e humanizadas. Os modelos tridimensionais de imunoglobulina estão comumente disponíveis e são familiares aquelas

pessoas versadas na técnica. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e exibem estruturas de conformação tridimensionais prováveis de seqüências candidatas selecionadas de imunoglobulina. A inspeção dessas exibições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da seqüência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de se ligar seu antígeno. Desse modo, os resíduos FR podem ser selecionados e combinados a partir do seqüências de consenso e de importação de tal forma que as características desejadas do anticorpo, tais como afinidade aumentada com relação aos antígenos-alvo, seja conseguida. Em geral, os resíduos CDR estão envolvidos diretamente e mais substancialmente em influenciar a ligação do antígeno. A humanização e a manipulação de anticorpos da presente invenção podem ser realizadas com a utilização de qualquer método conhecido, tal como, porém não limitados aqueles descritos em Winter (Jones et al., Nature 321: 522 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 (1993), Patentes U.S. Nos: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, PCT/US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO 90/14443, WO 90/14424, WO 90/14430, EP 229246, cada uma inteiramente incorporada aqui, neste pedido de patente por referência, incluindo as referências citadas nas mesmas.

Os camundongos transgênicos que podem produzir um repertório de anticorpos humanos que se ligam a antígenos humanos podem ser produzidos através de métodos conhecidos (como por exemplo, porém não limitados a Patentes U.S. N°s 5.770.428. 5.569.825. 5.545.806. 5.625.126. 5.625.825. 5.633.425. 5.661.016 e 5.789.650 concedidas para Lonberg et al.; Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO

94/25585, Kucherlapate *et al.* WO 96/34096, Kucherlapate *et al.* EP 0463 151 B1, Kucherlapate *et al.* EP 0710 719 A1, Surani *et al.* Patente U.S. Nº 5.545.807, Bruggemann *et al.* WO 90/04036, Bruggemann *et al.* EP 0438 474 B1, Lonberg *et al.* EP 0814 259 A2, Lonberg *et al.* GB 2 272 440 A, Lonberg *et al.* *Nature* 368: 856 a 859 (1994), Taylor *et al.*, *Int. Immunol.* 6(4) 579 a 591 (1994), Green *et al.*, *Nature Genetics* 7: 13 a 21 (1994), Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15: 146 a 156 (1997), Taylor *et al.*, *Nucleic Acids Research* 20(23): 6287 a 6295 (1992), Tuailon *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 90(8) 3720 a 3724 (1993), Lonberg *et al.*, *Int Rev Immunol* 13(1): 65 a 93 (1995) e Fishwald *et al.*, *Nat Biotechnol* 14(7): 845 a 851 (1996), as quais são cada uma inteiramente incorporadas aqui, neste pedido de patente, por referência). Em geral, esses camundongos compreendem pelo menos um transgene compreendendo DNA a partir de pelo menos um local de imunoglobulina humana que é rearranjado de forma funcional, ou que possa ser submetido a um rearranjo funcional. Os locais da imunoglobulina endógena nesses camundongos podem ser rompidos ou cancelados para eliminar a capacidade do animal para a produção de anticorpos codificados pelos genes endógenos.

A triagem de anticorpos para a ligação específica a proteínas ou fragmentos similares pode ser conseguida convenientemente com a utilização de bibliotecas de exibição de peptídios. Este método envolve a triagem de grandes bibliotecas de peptídios com relação a membros individuais que tenham as funções ou a estrutura desejada. A triagem de anticorpos de bibliotecas de exibição de peptídios é bastante conhecida na técnica. As seqüências de peptídios exibidas podem ser a partir de 3 até 5000 ou mais aminoácidos de comprimento, freqüentemente a partir de 5 a 100 aminoácidos de comprimento, e quase sempre a partir de cerca de 8 até 25 aminoácidos de comprimento. Além dos métodos químicos sintéticos para a geração de bibliotecas de peptídios, vários métodos de DNA recombinante têm sido descritos. Um tipo envolve a exibição de uma seqüência de peptídios sobre a superfície de um bacteriófago ou célula. Cada bacteriófago ou célula contém a seqüência de nucleotídeo que codifica a seqüência de peptídio

específica exibida. Esses métodos estão descritos nas Publicações de Patentes PCT N<sup>os</sup> 91/17271, 91/18980, 91/19818, e 93/08278. Outros sistemas para a geração de bibliotecas de peptídeos têm aspectos ambos os métodos de síntese química *in vitro* e recombinantes. Vide as Publicações de Patentes PCT N<sup>os</sup> 92/05258, 92/14843, e 96/19256. Vide também, as Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5.658.754; e 5.643.768. As bibliotecas de exibição de peptídeos, e os kits para a triagem estão comercialmente disponíveis a partir de tais fornecedores como a Invitrogen (Carlsbad, CA), e Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK). Vide, por exemplo, as Patentes U.S. N<sup>os</sup> 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, concedidas para Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, concedidas para Dyax, 5427908, 5580717, concedidas para Affymax; 5885793, concedida para Cambridge antibody Technologies; 5750373, concedida para, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, concedidas para Xoma, Colligan, *supra*; Ausubel, *supra*; ou Sambrook, *supra*, cada uma das patentes ou pedidos de patente acima são incorporadas em sua totalidade aqui, neste pedido de patente, por referência.

## 2. Ácidos Nucléicos da Invenção.

Usando a informação provida aqui, neste pedido de patente, tal como as seqüências de nucleotídeos que codificam pelo menos de 70 a 100% dos aminoácidos contínuos de pelo menos uma das SEQ ID NOS: 2 a 5 e 27 e 28, fragmentos especificados, variantes ou seqüências de consenso das mesmas, uma molécula de ácido nucléico da presente invenção codificando pelo menos um anticorpo anti MCP-1 pode ser obtida com a utilização de métodos descritos aqui, neste pedido de patente ou como conhecidos na técnica. As moléculas isoladas de ácido nucléicos da presente invenção podem incluir moléculas de ácido nucléico que compreendem uma estrutura de leitura aberta (ORF), opcionalmente com um ou mais íntrons, como por exemplo, porém não limitados a, pelo menos uma parte especificada de pelo menos uma CDR, como CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de pelo menos uma corrente pesada (por exemplo das SEQ ID NOS: 6-12, 22 e 23) ou corrente le-

ve(por exemplo, das SEQ ID NOS: 13-21 e 24-26); moléculas de ácido nucléico compreendendo a seqüência de codificação para um anticorpo anti MCP-1 ou região variável (por exemplo, das SEQ ID NOS:2-5, 27 e 28); e moléculas de ácido nucléico que compreendem uma seqüência de nucleotí-  
5 dios substancialmente diferente a partir daquelas descritas acima, porém que, devido a degenerescência do código genético ainda codificam, pelo menos um anticorpo anti MCP-1 como descrito aqui, neste pedido de patente e/ou como conhecido na técnica. Por certo, o código genético é bastante conhecido na técnica. Desse modo, seria de rotina para uma pessoa versa-  
10 da na técnica a geração dessas variantes de ácido nucléico degeneradas que codificam para os anticorpos específicos anti MCP-1 da presente invenção. Vide, por exemplo, Ausubel, et al., *supra*, e essas variantes de ácido nucléico estão incluídas na presente invenção.

Na forma indicada aqui, neste pedido de patente, as moléculas  
15 de ácido nucléico da presente invenção que compreendem um ácido nucléico codificando um anticorpo anti MCP-1 podem incluir, porém não estão limitadas aquelas que codificam a seqüência de aminoácido de um fragmento de anticorpo, por ela própria; a seqüência que codifica para todo o anticorpo ou para uma parte do mesmo; a seqüência que codifica para um anticorpo,  
20 fragmento ou parte, bem como seqüências adicionais, tais como as seqüências que codificam pelo menos um peptídio líder de sinal ou de fusão, com ou sem as seqüências de codificação adicionais antes mencionadas, tal como pelo menos um intron, junto com seqüências adicionais, não codificantes, incluindo, porém não limitadas a seqüências 5' e 3' não codificantes, tais  
25 como as seqüências transcritas não traduzidas que têm um papel na transcrição, processamento do mRNA, incluindo os sinais de divisão e de poliadenuilação (por exemplo, a ligação de ribossomo e estabilidade do mRNA); uma seqüência adicional de codificação que codifique para aminoácidos adicionais, tais como aquelas que proporcionam funcionalidades adicionais.  
30 Desse modo, a seqüência que codifica um anticorpo pode ser fundida a uma seqüência marcadora, tal como uma seqüência que codifica um peptídio que facilita a purificação do anticorpo fundido que compreenda um fragmento ou

parte de um anticorpo.

Polinucleotídios que se Hibridizam Seletivamente a um Polinucleotídio como

Descrito Aqui, neste Pedido de Patente: A presente invenção proporciona

ácidos nucleicos isolados que se hibridizam sob condições seletivas de hi-  
bridização a um polinucleotídio descrito aqui, neste pedido de patente. Des-  
se modo, o polinucleotídio desta modalidade pode ser usado para isolar, de-  
tectar e ou quantificar ácidos nucleicos que compreendam esses polinucleo-  
tídios. Por exemplo, os polinucleotídios da presente invenção podem ser u-  
sados para a identificação, isolamento ou amplificação de clones parciais ou  
de comprimento total em uma coleção depositada. Em algumas modalida-  
des, os polinucleotídios são seqüências de cDNA genômico isoladas, ou de  
outra forma complementares a, um cDNA de uma coleção de ácidos nucleí-  
cos humanos ou de mamífero.

De preferência, a coleção de cDNA compreende pelo menos  
80% de seqüências de comprimento total, de preferência pelo menos 85%  
ou 90% de seqüências de comprimento total, e de mais preferência pelo  
menos de 95% de seqüências de comprimento total. As bibliotecas de cDNA  
podem se normalizadas para o aumento da representação de seqüências  
raras. Condições de hibridização de rigorosidade moderada ou baixa são  
tipicamente, porém não exclusivamente, empregadas com seqüências que  
tenham uma identidade de seqüência reduzida com relação a seqüências  
complementares. Condições de rigorosidade moderadas e altas podem op-  
cionalmente ser empregadas com relação a seqüências de maior identidade.  
Condições de rigorosidade baixas permitem a hibridização seletiva de se-  
qüências que tenham menos do que cerca de 70% de identidade de se-  
qüência e podem ser empregadas para a identificação de seqüências ortólo-  
gas ou paralogas.

Opcionalmente, os polinucleotídios da invenção irão codificar  
pelo menos uma parte de um anticorpo codificado pelos polinucleotídios  
descritos aqui, neste pedido de patente.

Construção de Ácidos Nucleicos: Ao ácidos nucleicos isolados da presente  
invenção podem ser preparados com a utilização de (a) métodos recombi-

nantes, (b) técnicas sintéticas, (c) técnicas de purificação, ou combinações das mesmas, como bem-conhecidas na técnica.

Métodos Recombinantes para Construir Ácidos Nucléicos: As composições de ácidos nucleicos isolados desta invenção, tais como RNA, cDNA, DNA genômico, ou qualquer combinação dos mesmos podem ser obtidas a partir de fontes biológicas com a utilização de qualquer número de metodologias de clonagem conhecidas daquelas pessoas versadas na técnica. Em algumas modalidades, sondas de oligonucleotídio que se hibridizam seletivamente sob condições rigorosas, aos polinucleotídeos da presente invenção são usadas para a identificação da seqüência desejada em uma coleção de cDNA ou de DNA genômico. O isolamento de RNA, e a construção das bibliotecas de cDNA ou de DNA genômico, é bem-conhecida aquelas pessoas de habilidade comum na técnica (vide, por exemplo, Ausubel *supra*; ou Sambrook, *supra*).

Métodos de Triagem e de Isolamento de Ácidos Nucléicos: Uma coleção de cDNA ou de DNA genômico pode ser submetida a triagem com a utilização de uma sonda baseada na seqüência de um polinucleotídio da presente invenção, de tais como aquelas descritas aqui, neste pedido de patente. As sondas podem ser usadas para se hibridizarem com as seqüências de DNA genômico ou de cDNA para o isolamento de genes homólogos nos mesmos organismos ou em organismos diferentes. Aquelas pessoas versadas na técnica poderão observar que diversos graus de rigorosidade de hibridização podem ser empregados na análise; e tanto a hibridização como o meio de lavagem podem ser rigorosos. Na medida em que as condições de hibridização se tornam mais rigorosas, deve existir um grau maior de capacidade de complementação entre a sonda e o alvo para que ocorra a formação de dúplex. O grau de rigorosidade pode ser controlado através de uma ou mais de temperatura, resistência iônica, pH e a presença de um solvente de desnaturação parcial tal como a formamida. Por exemplo, a rigorosidade da hibridização é variada de forma conveniente através da mudança da polaridade da solução reagente através de, por exemplo, a manipulação da concentração de formamida dentro da faixa de 0% até 50%. O grau da capacidade de

complementação (identidade de seqüência) necessário para a ligação detectável irá variar de acordo com a rigorosidade do meio de hibridização e/ou o meio de lavagem. O grau da capacidade de complementação irá ser otimamente de 100%; ou de 70 a 100%, ou qualquer faixa ou valor dentro das mesmas. No entanto, deve ser entendido que as variações menores de seqüência nas sondas e iniciadores podem ser compensadas através da redução da rigorosidade da hibridização e/ou do meio de lavagem.

Os métodos para a amplificação de RNA ou de DNA são bem-conhecidos na técnica e podem ser usados de acordo com a presente invenção sem experimentação não necessária, com base nas informações e a orientações apresentadas aqui, neste pedido e patente. Os métodos conhecidos de amplificação de RNA ou de DNA incluem, porém não estão limitados a, reação em cadeia de polimerase (PCR), e processos de amplificação relacionados (Mullis, et al., Patente U.S. Nº 4.683.202 (1987); e Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990).

Métodos Sintéticos para a Construção de Ácidos Nucléicos: Os ácidos nucleicos isolados da presente invenção também podem ser preparados através da síntese química direta através de métodos conhecidos (vide, por exemplo, Ausubel et al., *supra*). A síntese química produz, em geral um oligonucleotídeo de um único filamento, que pode ser convertido em DNA de filamento duplo através de hibridização com uma seqüência complementar, ou através de polimerização com uma DNA polimerase usando o filamento unido como um padrão. Uma pessoa de habilidade na técnica irá reconhecer que embora a síntese química do DNA possa ser limitada as seqüências de cerca de 100 ou mais bases, seqüências mais longas podem ser obtidas através da ligação de seqüências mais curtas. Um método de preferência específica para codificar seqüências é mostrado nas Patentes U. S. Nºs 6.521.427 e 6.670.127.

### 30 3. Vetores e Sistemas de Expressão

A invenção proporciona vetores, de preferência vetores de expressão contendo um ácido nucleico que codifica um anticorpo anti MCP-1,

ou que pode ser usado para obter plasmídios que contenham vários anticorpos HC ou genes LC ou partes dos mesmos. Na forma usada aqui, neste pedido de patente, o termo "vetor" se refere a uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar outro ácido nucléico ao qual ele tenha sido ligado.

- 5 Um tipo de vetor é um "plasmídio", que se refere a uma alça circular de DNA de filamento duplo dentro do qual segmentos adicionais de DNA podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, no qual segmentos adicionais de DNA podem ser ligados dentro do genoma viral. A presente invenção também se refere a vetores que incluem as moléculas isoladas de ácido nucléico da presente invenção, células hospedeiras que são manipuladas geneticamente com os vetores recombinantes, e a produção de pelo menos um anticorpo anti MCP-1 através de técnicas recombinantes, como é bem-
- 10 conhecido na técnica. Vide, por exemplo, Sambrook, et al., *supra*; Ausubel et al., *supra*, cada incorporado em sua totalidade aqui, neste pedido de patente.
- 15

Para a expressão de anticorpos ou de fragmentos de anticorpos do mesmo, os DNA codificando cadeias parciais ou de comprimento total leves ou pesadas, podem ser inseridos em cassetes ou vetores de expressão de tal forma que os genes estejam ligados de forma operacional a seqüências de controle de transcrição e de translação. Um cassete que codifique um anticorpo, pode ser montado como um constructo. Um constructo poder ser preparado com a utilização de métodos conhecidos na técnica. O constructo pode ser preparado como parte de um plasmídio maior. Essa preparação permite a clonagem e a seleção das construções corretas de

20 uma maneira eficiente. O constructo pode ficar localizado entre sítios de restrição convenientes no plasmídio ou em outro vetor de tal forma que eles possam ser isolados com facilidade a partir das seqüências restantes do plasmídio,

25

Em geral, um vetor de plasmídio é introduzido em um precipitado, tal como um precipitado de fosfato de cálcio, ou em um complexo com um lipídio carregado de DEAE-dextrano. Se o vetor for um vírus, ele pode ser embalado in vitro com a utilização de uma linha de células de embala-

30

gem apropriada e em seguida introduzido dentro de células hospedeiras. A introdução de um constructo de vetor dentro de uma célula hospedeira também pode ser efetuada através de eletroporação ou outros métodos conhecidos. Esses métodos estão descritos na técnica, tais como em Sambrook, supra, Capítulos de 1 a 4 e de 16 a 18; Ausubel, supra, capítulos 1, 9, 13, 15, 16.

Neste contexto, a expressão "ligado operacionalmente" é destinada a significar que um gene de anticorpo é ligado dentro de um vetor de tal forma de as seqüências de controle de transcrição e de translação no interior do vetor servem em sua função pretendida de regular a transcrição e a translação do gene do anticorpo. O vetor de expressão e as seqüências de controle do vetor de expressão são escolhidas para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene da cadeia leve do anticorpo e o gene da cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos dentro de vetores separados ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos dentro do mesmo vetor de expressão. Os genes do anticorpo são inseridos dentro do vetor de expressão através de métodos padronizados (como por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares no fragmento do gene do anticorpo e no vetor, ou ligação de final rombudo se não estiverem presentes os sítios de restrição).

As regiões variáveis de cadeia leve ou de cadeia pesada dos anticorpos descritos aqui, neste pedido de patente, podem ser usados para a criação de gene de anticorpo de comprimento total de qualquer isotipo de anticorpo através da inserção dos mesmos dentro de vetores de expressão que já codifiquem regiões constantes de cadeia pesada e regiões constantes de cadeia leve do isotipo desejado de tal forma que o segmento VH esteja ligado de modo operativo ao segmento ou segmentos CH no interior do vetor e o segmento VL esteja ligado de modo operativo ao segmento CL no interior do vetor. Adicionalmente ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídio de sinal que facilite a secreção da cadeia do anticorpo a partir de uma célula hospedeira. O gene da cadeia do anticorpo pode ser clonado no interior do vetor de tal forma que o peptídio de

sinal esteja ligado na estrutura do terminal amino da cadeia do gene do anticorpo. O peptídeo de sinal pode ser um peptídeo de sinal de imunoglobulina ou um peptídeo de sinal heterólogo (isto é, um peptídeo de sinal a partir de uma proteína que não a imunoglobulina).

- 5                   Embora seja possível teoricamente a expressão dos anticorpos da invenção tanto em células hospedeiras procarióticas como eucarióticas, a expressão de anticorpos em células eucarióticas, e de mais preferência em células hospedeiras de mamífero, é a de maior preferência devido a que essa células eucarióticas, e especificamente células de mamíferos, são mais
- 10                   prováveis do que as células procarióticas com relação a montagem e a secreção de um anticorpo propriamente dobrado e imunologicamente ativo.

- Em geral um vetor de expressão de mamífero irá conter (1) elementos reguladores, usualmente na forma de seqüências virais promotoras ou aumentadoras e caracterizados por uma ampla faixa de hospedeiro e de
- 15                   tecido; (2) uma seqüência de "poliligante", facilitando a inserção de um fragmento de DNA que compreenda a seqüência codificando o anticorpo dentro do vetor plasmídeo; e (3) a seqüência responsável pela divisão do intron a poliadenilação dos transcritos de mRNA. Essa região contígua do sítio de
- 20                   promotor-poliligante-poliadenilação é comumente referido como a unidade de transcrição. O vetor irá também conter provavelmente (4) um gene ou genes marcador selecionável (como por exemplo, o gene beta-lactamase), quase sempre conferindo resistência a um antibiótico (tal como a ampicilina), permitindo a seleção de transformantes iniciais positivos em *E. coli*; e (5)
- 25                   seqüências facilitando a replicação do vetor em ambos os hospedeiros bacterianos e de mamífero. Um plasmídeo de origem de replicação é incluso para a propagação do constructo de expressão em *E. coli* e para a expressão transitória em células Cós, a origem SV40 de replicação é inclusa no plasmídeo de expressão.

- Um promotor pode ser selecionado a partir de um promotor
- 30                   SV40 (como por exemplo, promotores SV40 finais ou prematuros, o promotor CVM (Patentes U.S. 5.168.062; 5.385.839), um promotor HSV, um promotor pgk (fosfoglicerase quinase), um promotor EF-1 alfa (Patente U. S.

5.266.491), pelo menos um promotor de imunoglobulina humana.

Os vetores de expressão irão incluir de preferência, porém opcionalmente pelo menos um marcador selecionável. Esses marcadores incluem, por exemplo, porém não estão limitados a metotrexato (MTX), diidrofolato redutase (DHFR, Patentes U. S. N<sup>o</sup>s 4.399.216; 4.634.665; 4.656.134; 4.956.288; 5.149.636; 5.179.017), ampicilina, neomicina (G418), ácido mico-fenólico, ou sintetase glutamina (Patentes U. S. N<sup>o</sup>s 5.122.464; 5.770.359; 5.827.739) resistência para cultura de células eucarióticas, e genes de resistência a tetraciclina ou ampicilina para cultivo em *E. coli* e outras bactérias ou procarióticas (as patentes acima firam inteiramente incorporadas aqui, neste pedido de patente, por referência) Os meios de cultura e as condições apropriadas para as células hospedeiras acima escritas são conhecidos na técnica. Os vetores adequados se tornarão aparentes com facilidade ao artesão habilitado.

Quando forem empregadas células hospedeiras eucarióticas, seqüências finalizadoras e de transcrição e de poliadenilação são tipicamente incorporadas ao vetor. Um exemplo de uma seqüência de finalização é a seqüência de poliadenilação a partir do gene do hormônio de crescimento bovino. As seqüências para uma divisão acurada do transcrito também podem ser inclusas. Um exemplo de uma seqüência de divisão é o intron VPI da SV40 (Sprague, et al., J. Virol. 45: 773- a 781 (1983)). Além disso, seqüências de gene para o controle da replicação na célula hospedeira podem ser incorporadas dentro do vetor, como conhecido na técnica. Também, para evitar uma alta superfície de expressão de moléculas de cadeia pesada, pode ser necessário o uso de um vetor de expressão que elimine as variantes de divisões do domínio da transmembrana.

Os elementos adicionais incluem aumentadores, seqüências Kozak e seqüências intervenientes flanqueadas por sítios doadores e aceitadores da divisão do RNA. Uma transcrição de alta eficácia pode ser alcançada com os promotores precedentes e tardios de SV40, as repetições de terminal longas (LTRS) a partir de retrovírus, como por exemplo RSV, HTLV, HIV e o promotor precedente de citomegalovírus (CVM). No entanto, elemen-

tos celulares também podem ser usados (como por exemplo, o promotor de actina humana). Os vetores de expressão adequados para uso na prática da presente invenção incluem, por exemplo, vetores tais como pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN, ou pLNCX (Clontech Labs, Palo Alto, CA),  
 5 pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) ou pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PS-VL e PMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) e pBC12MI (ATCC 67109).

Alternativamente, os ácidos nucléicos que codificam uma sequência de anticorpo podem ser expressos em linhas de células estáveis que co-obtenham o gene integrado em um cromossomo. A co-transfecção com um marcador selecionável tal como dhfr, gtp, neomicina ou hidromicina permite a identificação e o isolamento das células transfectadas que expressem grandes quantidades do anticorpo codificado. O marcador DHFR (dihidrofolato redutase) é útil para desenvolver linhas de células que contenham  
 10 numerosas centenas ou mesmo milhares de cópias do gene de interesse. Um outro marcador de seleção útil é a enzima glutamina sintase (GS) (Murphy, et al., Biochem. J. 227: 277- a 279 (1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10: 169 a 175 (1992)). Com a utilização desses marcadores, as células de mamíferos são cultivadas em meio seletivo e as células com a  
 15 maior resistência são selecionadas. Essas linhas de células contêm o gene ou os genes amplificados integrados dentro de um cromossomo. As células do ovário do hamster chinês (CHO) e as células NOS são freqüentemente usadas para a produção de anticorpos.

Os constructos de DNA usados na produção de anticorpos da  
 25 invenção podem opcionalmente incluir pelo menos uma sequência de isolamento. O termo "isolamento" ou as expressões "sequência de isolamento" e "elemento de isolamento" são usados aqui, neste pedido de patente de forma intercambiável. Um elemento de isolamento é um elemento de controle que isola a transcrição de genes colocados dentro de seu campo de ação  
 30 porém que não perturba a expressão do gene, tanto de forma negativa como de forma positiva. De preferência, uma sequência de isolamento é inserida em ambos os lados da sequência de DNA a ser transcrita. Por exemplo, o

isolador pode estar posicionado a partir de 200 pb até cerca de 1 kb, 5' a partir do promotor, e pelo menos a cerca de 1 kb até 5 kb a partir do promotor, no final 3' do gene de interesse. A distância da sequência de isolamento a partir do promotor e do final 3' do gene de interesse pode ser determinada  
5 pos aquelas pessoas versadas da técnica, dependendo dos tamanhos relativos do gene de interesse, do promotor e do aumentador usados no construto. Além disso, mais do que uma sequência de isolamento pode ser posicionada a 5' a partir do promotor ou no final 3' do transgene. Por exemplo, duas ou mais sequências de isolamento podem ser posicionadas a 5' a partir do  
10 promotor. O isolante ou isolantes no final 3' do transgene podem ser posicionados no final 3' do gene de interesse, ou no final 3' de uma sequência reguladora 3', como por exemplo, na região 3' não traduzida (UTR) de uma sequência flanqueadora 3'.

Os exemplos de vetores de expressão de *E. coli* adequados que  
15 podem ser induzidos e de não fusão incluem pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69: 301 a 315) e pET 11d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89). A expressão do gene-alvo a partir do vetor pTrc se apóia na transcrição da polimerase do RNA do hospedeiro a partir de um promotor de fusão híbrido  
20 do trp-lac. A expressão do gene-alvo a partir do vetor pET 11 se apóia sobre a transcrição a partir de um promotor de fusão T7 gn10-lac mediada por uma polimerase de RNA viral co-expressa (T7 ga1). Essa polimerase viral é suprida pelas cepas hospedeiras BL21(DE3) ou HMS174(DE3) a partir de um pró-fago  $\lambda$  residente acolhendo um gene T7 ga1 sob o controle de transcri-  
25 ção do promotor lacUV 5.

Em outra modalidade, o vetor de expressão é um vetor de expressão de levedura. Os exemplos de vetores para expressão em levedura *S.cerevisiae* incluem pYepSec1 (Baldari et al. (1987) *EMBO J.* 6: 229 a 234), pMFa (Kurjan e Herskowitz, (1982) *Cell* 30: 933 a 943), pJRY88 (Schultz et  
30 al. (1987) *Gene* 54: 113 a 123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), e pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Alternativamente, o vetor de expressão é um vetor de expressão

e baculovírus. Os vetores de baculovírus disponíveis para a expressão de proteínas em células cultivadas de insetos (por exemplo, as células Sf 9) inclui a serie pAc (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3: 2156 a 2165) e a serie pVL (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170: 31 a 39).

5                   Em ainda outra modalidade, um ácido nucléico da invenção é expresso em células de mamífero com a utilização de um vetor de expressão de mamífero. Os exemplos de vetores de expressão em mamíferos incluem o pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329: 840) e pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6: 187 a 195). Quando usados em células de mamíferos, as  
10                   funções de controle do vetor de expressão são quase sempre providas através de elementos de regulação virais. Por exemplo, os promotores comumente usados são derivados a partir de polioma, Adenovirus 2, citomegalovírus e Simian VÍRUS 40. Para outros sistemas adequados de expressão para ambas as células procarióticas e eucarióticas, vide os capítulos 16 e 17 de  
15                   Sambrook et al., supra.

                  Em outra modalidade, o vetor de expressão recombinante de mamífero é capaz de direcionar a expressão do ácido nucléico, de preferência em um tipo específico de célula, tal como células de linfoma (como por exemplo, células de mieloma de camundongo). Em tipos específicos de células,  
20                   elementos de regulação específicos para o tecido são usados para a expressão do ácido nucléico. Os elementos de regulação específicos para o tecido são conhecidos na técnica. Os exemplos não limitativos de promotores específicos para tecido adequados incluem o promotor de albumina (específico para o fígado: Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1: 268 a 277), promotores específicos para linfóides (Calame and Eaton (1988) *Adv. Immunol.*  
25                   43: 235 a 275), especificamente, promotores de receptores de células T (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8: 729 a 733) e imunoglobulinas (Banerji et al. (1983) *Cell* 33: 729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33: 741-748), promotores neuro específicos (por exemplo, o promoter do neuro filamento; Byrne and Ruddell (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473 a  
30                   5477), promotor específico para o pâncreas (Edlund et al. (1985) *Science* 230: 912 a 916), e promotores específicos para as glandulas mamárias (co-

mo por exemplo, promotore do soro de leite; Patente U.S. Nº 4.873.316 e Publicação de Pedido de Patente Européia Nº 264.166).

Os promotores regulados com relação ao desenvolvimento também estão englobados, por exemplo, pelos promotores hox murinos (Kessel and Gruss  
5 (1990) Science 249: 374 a 379) e o promotor de  $\alpha$ -fetoproteína (Campes and Tilghman (1989) Genes Dev. 3: 537 a 546).

A invenção também proporciona um vetor de expressão recombinante que compreende uma molécula de DNA clonada dentro do vetor de expressão em uma orientação anti-sentido. Isto é, a molécula de DNA está  
10 ligada operacionalmente a uma seqüência reguladora de uma maneira de permite a expressão (através de transcrição da molécula do DNA) de uma molécula de RNA que está anti-sentido ao mRNA que codifica um polipeptí-  
dio. As seqüências reguladoras ligadas de modo operacional a um ácido nu-  
cléico clonado na orientação anti-sentido podem ser escolhidas de forma  
15 que direcionem a expressão continua da molécula de RNA anti-sentido em uma variedade de tipos de células. Por exemplo, os promotores virais e/ou os aumentadores, ou as seqüências reguladoras podem ser escolhidos de tal forma que direcionem a expressão anti-sentido do RNA constitutivo, es-  
pecífico para tecido ou específico para tipo de célula. O vetor de expressão  
20 anti-sentido pode estar na forma de um plasmídeo recombinante, "fagemido", ou vírus atenuado nos quais os ácidos nucléicos anti-sentido são produzidos sob o controle de uma região reguladora de alta eficácia, a atividade da qual pode ser determinada pelo tipo de célula dentro do qual o vetor é introduzi-  
do. Para uma discursão da regulação da expressão do gene com a utilização  
25 de genes anti-sentido, vide Weintraub et al. (Reviews--Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986).

#### Clonagem e Expressão em Células de Mieloma.

Um anticorpo monoclonico IgG1K quimérico camundongo/humano contra o CD4 humano, conhecido como cM-T412 (EP 0511308  
30 inteiramente incorporada por referência), foi observado para ser expresso em níveis elevados em células de mieloma de camundongo transfectadas (Looney et al. 1992. Hum Antibodies Hybridomas 3(4):191 a 200). Sem um

grande esforço em otimizar as condições de cultura, níveis de produção de > 500 mg/ml (produtividade específica em uma base de pg/célula/dia não conhecida), foram facilmente obtidas em Centocor, Inc, Malvern, PA em 1990. Com base nos componentes desses vetores de expressão, vetores de clonagem de anticorpos foram desenvolvidos com relação a clonagem úteis para HC e LC que incluem a sequência de ácido nucléico de iniciação promotora e transcrição do gene, as seqüências 5' não transladas e as seqüências de ácido nucléico de iniciação da translação, as seqüências de ácido nucléico codificando a sequência de sinal, as seqüências doadoras de divisão intron/exon para o intron de sinal e o intron J-C, e as seqüências de ácido nucléico aumentadoras do intron J-C. O plasmídio p139, um plasmídio pUC19, contém um fragmento genômico EcoRI-EcoRI de 5,8 kb clonado de células de hibridoma C123 secretando o M-T412 Ab total de camundongo; o fragmento contém o promotor de parte de região V do gene cM-T412 HC. O material de partida para a manipulação da região V do vetor LC foi o plasmídio p39, um plasmídio pUC que continha um fragmento genômico HindIII-HindIII de 3 kb clonado a partir de células de hibridoma C123; este fragmento contém o promotor e parte da região V do gene cM-T412 LC. Os vetores manipulados derivados a partir dos p139 e p39 foram projetados para permitir a montagem conveniente dos genes HC ou LC adequados para a expressão em uma célula hospedeira de mamífero em um processo de duas etapas que vincula 1) clonagem do DNA que codifica uma sequência de interesse entre sítios de restrição especialmente preparados em um vetor da região V, por meio do que a sequência que codifica a região V é posicionada imediatamente a jusante da sequência de sinal codificando o vetor, bem como á jusante de parte ou de todo o promotor do gene; e 2) transferindo um fragmento que transpõe a sequência inserida a partir do vetor da região V para o vetor da região C na orientação apropriada por meio do que o plasmídio resultante constitui o plasmídio de expressão final adequado para a expressão em células (Scallon et al. 1995 Cytokine 7(8):759-769).

#### Clonagem e expressão em células CHO.

O plasmídio pC4 é um derivado do plasmídio pSV2-dhfr (Número-

ro de acesso ATCC 37146). O plasmídio contém o gene DHFR do camundongo sob o controle do promotor antecipado SV40. Células de ovário de hamster chinês ou outras células que não têm a atividade diidrofolato que são transfectadas com esses plasmídios podem ser selecionadas através do cultivo das células em um meio seletivo (como por exemplo, MEM alfa menos Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado com o agente químico terapêutico metotrexato. A amplificação dos genes DHFR em células resistentes ao metotrexato (MTX) tem sido bem documentada (vide, por exemplo, F. W. Alt, et al., J. Biol. Chem. 253: 1357 a 1370 (1978); J. L. Hamlin e C. Ma, Biochem. et Biophys. Acta 1097: 107 a 143 (1990); e M. J. Page e M. A. Sydenham, Biotechnology 9: 64 a 68 (1991)). O cultivo das células em concentrações crescentes de MTX desenvolve resistência ao fármaco através de superprodução da enzima-alvo, DHFR, como resultado da amplificação do gene DHFR. Se um segundo gene for ligado ao gene DHFR, ele é usualmente co-amplificado e expresso em excesso. É conhecido na técnica que essa abordagem pode ser usada para o desenvolvimento de linhas de células contendo mais do que 1.000 cópias do gene ou dos genes amplificados. Em seguida, quando o metotrexato é retirado, são obtidas linhas de células que contêm o gene amplificado integrado dentro de um ou mais cromossomo ou cromossomos da célula hospedeira.

O plasmídio pC4 contém, para a expressão do gene de interesse um promotor forte de longa repetição de terminal (LTR) do Vírus do sarcoma de Rouss (Cullen, et al., Molec. Cell. Biol. 5: 438-447 (1985)) mais um fragmento isolado a partir do aumentador do gene antecipado do citomegalovírus humano (CVM)(Boshart, et al., Cell 41: 521-530 (1985)). A jusante do promotor os sítios de clivagem das enzimas de restrição BamHI, XbaI, e Asp718 que permitem a integração dos genes. Por trás desses sítios de clonagem o plasmídio contém o intron 3' e o sítio de poliadenilação do gene da pré-pro-insulina do rato. Outros promotores de alta eficácia também podem ser usados para a expressão, por exemplo o promotor da b-actina humana, os promotores antecipados ou tardios SV40 ou as repetições de terminal longas de outros retrovírus, como por exemplo, HIV and HTLV. Os sistemas

de expressão de gene Clontech's Tet-Off e Tet-On e sistemas similares podem ser usados para a expressão do anticorpo MCP-1 de uma maneira regulada em células de mamíferos (M. Gossen, and H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)). Para a poliadenilação de outros sinais do mRNA, por exemplo, a partir dos genes do hormônio de crescimento humano ou da globina, também podem ser usados.

#### 4. Células Hospedeiras para a Produção de Anticorpos.

Pelo menos um anticorpo anti MCP-1 da presente invenção pode ser opcionalmente produzido por uma linha de células, uma linha de células mista, ou uma célula imortalizada ou uma população clonada de células imortalizadas, como bem-conhecido na técnica. Vide, por exemplo, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2004); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2004); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2004), cada um dos quais incorporado em sua totalidade aqui, neste pedido de patente por referência.

Com a finalidade de produzir produtos bio farmacêuticos, é necessária uma linha de células de produção capaz da expressão eficaz e reproduzível de um polipeptídeo ou de polipeptídios recombinantes. A linha de células é estável e bancável. Uma variedade de linhas de células pode ser empregada para essa finalidade. Na medida em que o entendimento das complexidades de como a maquinaria celular produz a quantidade final e a composição do produto bio terapêutico, a seleção de uma linha de células hospedeiras que irá conferir os atributos necessários para a produção e a composição do produto se torna mais evidente.

Ao contrario da maioria dos genes que são transcritos a partir de seqüências contínuas de DNA genômico, os genes de anticorpo são montados a partir de segmentos de gene que podem estar amplamente separados na linha de germes. Especificamente, os genes da cadeia pesada são

formados através da recombinação dos segmentos genômicos que codificam as regiões variável (V), de diversidade (D) e de junção (J)/constante (C) do anticorpo. Os genes funcionais da cadeia leve são formados pela junção de dois segmentos de gene: um codifica a região V e o outro codifica a região J/C. Ambos os locais de cadeia pesada e kapa da cadeia leve contém muitos segmentos de gene V (os cálculos variam entre centenas e milhares) calculados para se espalharem bem sobre 1000 kb. O local lambda é, em contraste, muito menor e tem mostrado se espalhar em aproximadamente 300 kp no cromossomo 16 no camundongo. Ele consiste em dois segmentos variáveis do gene e quatro segmentos de gene da região de junção/constante (J/C). A formação de um gene funcional requer a recombinação entre um elemento V e um elemento J/C.

Na célula B, na qual o anticorpo é produzido naturalmente, o controle da transcrição de ambos os genes kapa rearranjados da cadeia pesada e da cadeia leve dependem ambas da atividade de um promotor específico para o tecido a montante da região V e um estimulador específico para o tecido localizado no intron J/C. Esses elementos atuam de forma sinérgica. Também, um segundo estimulador específico para a célula B foi identificado no local kapa da cadeia leve. Esse aumentador adicional está localizado a 9 kp à jusante do  $C_{kapa}$ . Desse modo, o método de hibridoma para imortalizar os genes de expressão de anticorpos se baseia sobre as seqüências do promotor endógeno e do aumentados da linhagem de células B de origem. Alternativamente, os ácidos nucléicos da presente invenção podem ser expressos em uma célula hospedeira por tornar a mesma (através de manipulação) em uma célula hospedeira que contenha o DNA endógeno codificando um anticorpo da presente invenção. Esses métodos são bem-conhecidos na técnica, como por exemplo, descritos nas Patentes U. S. N°s 5.580.734, 5.641.670, 5.733.746, e 5.733.761, inteiramente incorporadas aqui, neste pedido de patente por referência.

A clonagem do DNA genômico do anticorpo dentro de um vetor artificial é um outro método para a criação de células hospedeiras capazes da expressão de anticorpos. No entanto, a expressão de anticorpos mono-

clônicos por trás de um promotor forte aumenta as possibilidades de identificação de linhas de células de alta produção e obtendo produções mais elevadas de anticorpos monoclonais. Os anticorpos da invenção também podem ser produzidos em um "transfectoma" de uma célula hospedeira, com a  
 5 utilização de, por exemplo, uma combinação de técnicas recombinantes de DNA e métodos de transfecção de genes como é bastante conhecido na técnica (como por exemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Os sistemas para a clonagem e a expressão de produtos biofarmacêuticos, incluindo anticorpos, em uma variedade de células hospedeiras diferentes são bem-conhecidos. As células hospedeiras adequadas incluem sistemas de bactérias, células de mamíferos, células de vegetais, levedura e baculovírus e plantas e animais transgênicos. As linhas de células de mamífero disponíveis na técnica para a expressão de uma proteína glicosilada de polipeptídio intacto heterólogo incluem as de ovário de hamster chinês (CHO), células HeLa, células do rim de filhotes de hamster (BHK),  
 10 células de melanoma de camundongo NOS e linhas de células derivadas, como por exemplo, células de mieloma de rato SP2/0, YB2/0 (ATC CRL-1662), células embrionárias do rim, humano (HEK), células embrionárias da retina humana, células PerC.6, células hep G2, BSC-1 (como por exemplo,  
 15 plo, ATCC CRL-26) e muitas outras disponíveis a partir de, por exemplo, American Type Culture Collection, Manassas, Va ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

As células de mamífero tais como as células CHO, células de mieloma, células HEK293, células BHK (BHK21, ATCC CRL-10), células Ltk de camundongo, e células NIH3T3 tem sido freqüentemente usadas para a  
 25 expressão estável de genes heterólogos. Em contraste, as linhas de células tais como Cos (COS-1 ATCC CRL 1650; COS-7, ATCC CRL-1651) e HEK293 são usadas de forma rotineira para a expressão transitória de proteínas recombinantes.

As células hospedeiras de mamífero de preferência para a expressão dos anticorpos recombinantes da invenção incluem as células de mieloma tais como as Sp2/0, YB2/0 (ATC CRL-1662), NSO, e P3X63.Ag8.653 (por exemplo, SP2/0-Ag14) devido à alta taxa de expressão  
 30

das mesmas. Especificamente, para uso com as células de mieloma NOS, outro sistema de expressão de preferência é o sistema de expressão de gene GS descrito no WO 87/04462 e na EP 338.841. Quando vetores de expressão recombinantes que codificam genes de anticorpos são introduzidos dentro de células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos através da cultura das células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras, ou, de mais preferência, a secreção do anticorpo dentro do meio de cultura no qual as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados a partir do meio de cultura com a utilização de métodos de purificação de proteínas padronizados.

As células de mamífero são ilustrativas das culturas de células úteis para a produção de anticorpos, partes especificadas ou variantes dos mesmos. Os sistemas de células de mamífero quase sempre estarão na forma de monocamadas de células embora as suspensões ou biorreatores de células de mamíferos ou possam também ser usadas.

Uma quantidade de linhas de células hospedeiras adequadas capazes de expressar proteínas glicosiladas intactas têm sido desenvolvidas na técnica, e incluem as linhas de células COS-1 (por exemplo, ATCC CRL 1650), COS-7 (por exemplo, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (por exemplo, ATCC CRL-10), CHO (por exemplo, ATCC CRL 1610) e BSC-1 (e.g., ATCC CRL-26), células Cos-7, células CHO, células hep G2, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, células 293, células HeLa e as similares, que estão disponíveis com facilidade a partir de, por exemplo, a American Type Culture Collection, Manassas, Va ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). As células hospedeiras de preferência incluem as células de origem linfóide tais como as células de mieloma e de linfoma. São de preferência específica as células hospedeiras P3X63Ag8. As células 653 (número de acesso ATCC CRL-1580) e células SP2/0-Ag14 (Número de acesso ATCC CRL-1851).

As células CHO-K1 e as células DHFR- CHO DG44 e DUK-B11 (G. Urlaub, L.A. Chasin, 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 4216-4220) são usadas para a produção de proteínas em nível elevado devido ao fato

de a amplificação dos genes de interesse é habilitada pela incorporação de um marcador selecionável que pode ser amplificado, DHFR, usando, por exemplo o fármaco metotrexato (MTX) (R.J. Kaufman, 1990. *Methods Enzymol.* 185: 537 a 566). As células CHO DHFR<sup>-</sup> podem ser usadas com

5 sucesso para a produção de mAbs recombinantes em um nível elevado. As CHO DHFR<sup>-</sup> podem produzir anticorpos abri MCP-1 em uma taxa de 80 a 110 mg 10<sup>6</sup> células<sup>-1</sup> por dia<sup>-1</sup> ou mais do que 200 mg de 10<sup>6</sup> células<sup>-1</sup> por dia<sup>-1</sup>. Uma variedade de promotores tem sido usada para obter a expressão de cadeias H e L nessas células CHO, por exemplo o promotor de b-actina,

10 o promotor CMV NIE humano, o promotor tardio principal do vírus Ad (MLP, o promotor RSV, e um LTR do vírus da leucemia murina. Uma quantidade de vetores para a expressão de mAb estão descritos na literatura, nos quais as duas cadeias de Ig estão contidas em dois plasmídios diferentes com um marcador independente selecionável e amplificável. Os vetores contendo

15 uma cadeia de anticorpo, como por exemplo a cadeia H, ligados a um marcador DHFR, e um cassete de expressão de uma cadeia L com o marcador Neo<sup>r</sup> ou vice-versa, podem ser usados para obter até 180 mg de um mAb<sup>-1</sup> 7 dias<sup>-1</sup> em frascos giratórios. Os métodos usados para a seleção inicial e a subsequente amplificação podem ser variados e são bastante conhecidos

20 das pessoas versadas na técnica. Em geral, a expressão de mAb em nível elevado pode ser obtida com a utilização das seguintes etapas: seleção inicial e amplificação em seguida dos clones candidatos (como por exemplo, em casos nos quais os vetores de expressão de ambas as cadeias H e L cont[em uma unidade de expressão de DHFR) e amplificação, co-

25 amplificação com a utilização de marcadores amplificáveis diferentes, e seleção inicial e amplificação em cultura de massa, seguida pela clonagem por diluição para a identificação dos clones individuais de expressão elevada. Devido a que os sítios de integração podem influenciar a eficiência da expressão da cadeia H e da cadeia L e a expressão total dos mAb, foram cria-

30 dos vetores individuais nos quais as unidades de expressão das duas cadeias de Ig são colocadas em tandem. Esses vetores também contêm um marcador selecionável dominante tal como Neo<sup>r</sup> e o cassete de expressão de

DHFR. Para uma revisão vide Ganguly, S. e A. Shatzman. Expression Systems, mammalian cells IN: Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. 1999 por John Wiley & Sons, Inc.

Cockett et al. (1990. Bio/Technology 8, 662-667) desenvolveram o sistema GS para a expressão em alto nível de genes heterólogos em células CHO. A transfecção de um vetor de expressão contendo um cDNA (sob o controle de transcrição do promotor hCMV) e um mini gene GS (sob o controle do promotor tardio SV40) dentro de células CHO-K1 (seguido pela seleção com 20 mM até 500 mM de MSX), pode ser usada para a produção de clones expressando os anticorpos da invenção em rendimentos comparáveis aqueles dos sistemas DHFR-CHO. O sistema GS é discutido em sua totalidade ou em parte em conexão com as Patentes Européias N°s 0 216 846, 0 256 055, e 0 323 997, e o Pedido de Patente Européia N° 89303964.4.

Como um exemplo não limitativo, folhas de tabaco transgênicas que expressam proteínas recombinantes têm sido usadas com sucesso para a provisão de grandes quantidades de proteínas recombinantes, como por exemplo, com a utilização de um promotor que pode ser induzido. Vide, por exemplo, Cramer et al., Curr. Top. Microbol. Immunol. 240: 95-118 (1999) e as referências citadas no mesmo. Também o milho transgênico tem sido usado para a expressão proteínas de mamíferos em níveis de produção comercial, com atividades biológicas equivalentes aquelas produzidas em outros sistemas recombinantes ou purificadas a partir de origens naturais. Vide, por exemplo, Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999) e as referências citadas no mesmo. Também têm sido produzidos anticorpos em grandes quantidades a partir de sementes de plantas transgênicas incluindo fragmentos de anticorpos, tais como anticorpos de cadeia única (os scFv), incluindo sementes de tabaco e tubérculos de batata. Vide, por exemplo, Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998) e as referências citadas no mesmo. Desse modo, os anticorpos da presente invenção também podem ser produzidos com a utilização de plantas transgênicas, de acordo com métodos conhecidos. Vide também, por exemplo, Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 99-108 (Oct., 1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13: 522-7

(1995); Ma et al., Plant Physiol. 109: 341-6 (1995); Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22: 940-944 (1994); e as referências citadas nos mesmos. Vide também em geral, com relação a expressão de anticorpos em plantas, porém não limitados a Patente U. S. Nº 5.959.177. Cada uma das referências  
5 acima fica inteiramente incorporada aqui, neste pedido de patente, por referência.

#### 5. Purificação de um Anticorpo.

Um anticorpo anti MCP-1 pode ser recuperado e purificado a partir de culturas de células recombinantes através de métodos bem-  
10 conhecidos, incluindo, porém não limitados a, purificação de proteína A precipitação pos sulfato de amônio ou por etanol, extração ácida, cromatografia de troca de ânion ou de cátion, cromatografia de fosfocelulose, cromatografia por interação hidrófoba, cromatografia por afinidade, cromatografia com hidróxi apatita e cromatografia com lecitina. A cromatografia líquida de alto  
15 desempenho ("HPCL") também pode ser empregada para a purificação. Vide, por exemplo, Colligan, Current Protocols in Immunology, ou Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), por exemplo, capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10, cada um inteiramente incorporado aqui, neste pedido de patente por referência.

20 Os anticorpos da presente invenção incluem produtos purificados naturalmente, produtos de procedimentos sintéticos químicos, e produtos produzidos através de técnicas recombinantes a partir de um hospedeiro eucariótico, incluindo, por exemplo, levedura, vegetais superiores, células de inseto ou de mamífero. Dependendo do hospedeiro empregado em um pro-  
25 cedimento de produção por recombinação, o anticorpo da presente invenção pode ser glicosilado ou pode ser não glicosilado, com os glicosilado sendo de preferência. Esses métodos estão descritos em muitos manuais padrão de laboratório, tais como Sambrook, supra, Seções 17.37 a 17.42; Ausubel, supra, capítulos 10, 12, 13, 16, 18 e 20, Colligan, Protein Science, supra,  
30 Capítulos 12 a 14, todos inteiramente incorporado aqui, neste pedido de patente por referência.

## 6. Anticorpos da Invenção.

Os anticorpos anti MCP-1 (também denominados de anticorpos antiOCCL2 ou anticorpos MCP-1) úteis para os métodos e as composições da presente invenção podem opcionalmente ser caracterizados através da  
5 alta afinidade de ligação com o MCP-1, capacidade para inibir uma ou mais das atividades biológicas associadas com o MCP-1, e opcionalmente e de preferência tendo baixa toxidez.

Os anticorpos da invenção podem se ligar ao MCP-1 humano com uma ampla faixa de afinidades ( $K_D$ ). Em uma modalidade de preferência,  
10 cia, pelo menos um mAb humano da presente invenção pode opcionalmente se ligar ao MCP-1 humano com uma alta afinidade. Por exemplo, um mAb humano pode se ligar um MCP-1 humano com um  $K_D$  igual ou menor do que cerca de  $10^{-7}$  M, tal como, porém não limitado a 0,1 - 9,9 (ou qualquer taxa ou valor dentro das mesmas)  $\times 10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$  ou  
15 qualquer taxa ou valor dentro das mesmas.

A afinidade ou a avidéz de um anticorpo com relação a um antígeno podem ser determinadas experimentalmente com a utilização de qualquer método adequado. (Vide, por exemplo, Berzofsky, *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," em *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven  
20 Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); e métodos descritos aqui, neste pedido de patente). A afinidade medida de uma interação de um anticorpo-antígeno específico pode variar se medida sob condições diferentes (como por exemplo, concentrações do sal, pH). Dessa forma, as medições de afinidade e de  
25 outros parâmetros de ligação com antígeno (por exemplo,  $K_D$ ,  $K_a$ ,  $K_d$ ) são feitas de preferência com soluções padronizadas de anticorpo e de antígeno, e um tampão de padronização, tal como as soluções e tampões padrão descritas aqui, neste pedido de patente.

Os anticorpos isolados da presente invenção compreende uma  
30 seqüência de aminoácidos do anticorpo descrita aqui codificada por qualquer polinucleotídeo adequado, ou qualquer anticorpo isolado ou preparado. De preferência, o anticorpo humano ou o fragmento que se liga ao antígeno se

liga à MCP-1 humano e, por meio disso neutraliza de forma parcial ou substancialmente pelo menos uma atividade biológica da proteína, um anticorpo, ou uma parte especificada ou variante do mesmo, que neutraliza parcialmente ou de preferência substancialmente pelo menos uma atividade biológica de pelo menos uma proteína ou fragmento MCP-1 pode se ligar a proteína ou ao fragmento e por meio disso inibir atividades mediadas através da ligação da MCP-1 a um receptor de MCP-1 ou através de outros mecanismos dependentes ou mediados pela MCP-1. Na forma usada aqui, neste pedido de patente, a expressão "anticorpo neutralizante" se refere a um anticorpo que pode inibir uma atividade dependente da MCP-1 por cerca de 20 a 120%, de preferência por pelo menos cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% ou mais dependendo da análise. A capacidade de um anticorpo anti MCP-1 de inibir uma atividade dependente da MCP-1 é avaliada de preferência através de pelo menos uma análise de proteína ou receptor de MCP-1 adequada, como descrita aqui, neste pedido de patente e/ou como conhecida na técnica. Um anticorpo humano da invenção pode ser de qualquer classe ou isótopo (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) ou pode compreender uma cadeia leve kappa ou lambda. Em uma modalidade, o anticorpo humano compreende uma cadeia pesada de IgG ou um fragmento definido, por exemplo, de pelo menos um dos isótipos IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Os anticorpos desse tipo podem ser preparados através do emprego de um camundongo transgênico ou outro mamífero transgênico não humano compreendendo pelo menos um transgene de cadeia leve humano (como por exemplo, IgG, IgA, e IgM (por exemplo,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ) como descritos aqui, neste pedido de patente ou como conhecidos na técnica. Em outra modalidade, o anticorpo humano MCP-1 anti-humano compreende uma cadeia pesada de IgG e uma cadeia leve de IgG.

Pelo menos um anticorpo da invenção se liga a pelo menos um anticorpo específico especificado para pelo menos uma proteína MCP-1, fragmento, parte ou qualquer combinação da mesma. Pelo menos um epítopo pode compreender pelo menos um região de ligação com o anticorpo que

compreenda pelo menos uma parte da proteína, cujo epítipo é de preferência composto por pelo menos de 1 a 3 aminoácidos com relação a parte específica total dos aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 1.

Em geral, o anticorpo humano ou o fragmento que se liga ao antígeno da presente invenção irá compreender uma região de ligação com o antígeno que compreende, pelo menos uma região determinante complementar humana (CDR1, CDR2 e CDR3) ou variante de pelo menos uma região variável de cadeia leve. Como um exemplo não limitativo, o anticorpo ou a parte que se liga ao antígeno ou a variante pode compreender pelo menos uma das CDR3 da cadeia pesada tendo a seqüência de aminoácidos das SEQ ID NO: 9 ou 12 e/ou uma CDR3 de cadeia leve que tenha a seqüência de aminoácidos das SEQ ID NOS: 15 a 17, 20 ou 21. Em uma modalidade específica, o anticorpo ou o fragmento que se liga ao antígeno pode ter uma região de ligação ao antígeno que compreenda pelo menos uma parte de pelo menos uma CDR de cadeia pesada (isto é, CDR1, CDR2 e/ou CDR3) que tenha a seqüência de aminoácidos das CDR 1, 2 e/ou 3 correspondentes (como por exemplo as SEQ ID NOS: 6 - 12 e/ou 22, 23, e 26). Em outra modalidade específica, o anticorpo ou a parte ou variante que se liga ao antígeno pode ter uma região de ligação com o antígeno que compreenda pelo menos uma parte de pelo menos uma CDR de cadeia leve (isto é, (isto é, CDR1, CDR2 e/ou CDR3) que tenha a seqüência de aminoácidos das CDR 1, 2 e/ou 3 correspondentes (como por exemplo as SEQ ID NOS: 13 - 21 e/ou 24 e 25). Em uma modalidade de preferência as três CDR de cadeia pesada e as três DCR de cadeia leve do anticorpo ou do fragmento que se liga ao antígeno de uma seqüência de aminoácido derivada a partir da CDR correspondente a pelo menos um dos Fab MOR0336, MOR03464, MOR03468, MOR03470, MOR03471, MOR03473, MOR03548, como descritos aqui, neste pedido de patente e as regiões de estrutura de cadeia pesada derivadas a partir de um anticorpo VH3 (SEQ ID NO: 2) e as regiões de estrutura de cadeia leve derivadas a partir de um anticorpo do tipo kapa (SEQ ID NO: 4.). Esses anticorpos podem ser preparados através da junção em conjunto das diversas partes (os CDR e as estruturas) do anticorpo com

a utilização de técnicas convencionais, através de preparando e expressando uma molécula de ácido nucléico que codifique o anticorpo com a utilização de técnicas convencionais de tecnologia de DNA recombinante ou através da utilização de qualquer outro método adequado.

- 5 O anticorpo anti MCP-1 pode compreender pelo menos uma de uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve que tenha uma sequência de aminoácidos definida nas regiões de estrutura. Por exemplo, em uma modalidade de preferência, o anticorpo anti-MCP-1 compreende, pelo menos uma região variável de cadeia pesada, tendo opcionalmente a sequência de aminoácidos da SEQ ID NOS: 2 ou 3 e/ou pelo menos uma região variável de cadeia leve, que tenha opcionalmente a sequência de aminoácidos das SEQ ID NOS: 4 ou 5.

- 15 A classe do anticorpo ou do isótopo (IgA, IgD, IgE, IgG, ou IgM) é conferida pelas regiões constantes que são codificadas pelos genes da região constante da cadeia pesada. Entre a classe de IgG humana, existem quatro subclasses ou sub tipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 nomeadas na ordem a sua abundancia natural no soro, se iniciando a partir da mais alta até a mais baixa. Os anticorpos IgA são encontrados como duas subclasses, IgA1 e IgA2. Na forma usada aqui, neste pedido de patente a "troca de isotipo" também se refere a uma troca entre as subclasses ou sub tipos de IgG.

- 20 A invenção também de refere a anticorpos, fragmentos que se ligam a antígeno, cadeias de imunoglobulina e CER que compreendem aminoácidos em uma sequência que seja substancialmente a mesma como a de uma sequência de aminoácido descrita aqui, neste pedido de patente. De preferência, esses anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos e os anticorpos que compreendem essas cadeia ou CDR podem se ligar a MCP-1 humana com alta afinidade (como por exemplo,  $K_d$  menos do que ou igual a cerca de  $10^{-9}$  M). As seqüências de aminoácido que são substancialmente as mesmas como as seqüências descritas aqui, neste pedido de patente
- 25 incluem seqüências que compreendem substituições conservadoras de aminoácidos, vem como cancelamentos e/ou inserções de aminoácidos. Uma substituição conservadora de aminoácido se refere a substituição de um
- 30

- primeiro aminoácido por um segundo aminoácido que tenha propriedades químicas e/ou físicas (por exemplo, carga, estrutura, polaridade, capacidade hidrófoba/capacidade hidrófila) que sejam similares aquelas do primeiro aminoácido. As substituições conservadoras incluem a substituição de um aminoácido por outro dentro dos grupos que se seguem: lisina (K), ), arginina (R) e histidina (H); aspartato (D) e glutamato (E); asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (I), K, R, H, D e E; alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), triptofan (W), metionina (M), cisteína (C) e glicina (G); F, W e I; C, S e T.
- Um anticorpo anti MCP-1 da presente invenção pode incluir uma ou mais substituições, cancelamentos ou adições de aminoácidos tanto a partir de mutações naturais como por manipulação humana, como especificadas aqui, neste pedido de patente ou como ilustradas em Knappik et al., U.S. 6828422 com relação a regiões variáveis derivadas a partir de seqüências de linhas de germe humano e categorizadas através de similaridades de seqüência dentro de famílias designadas como VH1A, VH1Bm VH2m etc., e pos cadeias leves tais como os subgrupos kapa ou lambda. Essas seqüências e outras seqüências que podem ser usadas na presente invenção incluem, podem não estão limitadas as configurações apresentadas da Tabela 1, como também escritas nas Figuras 1 a 42 da Publicação PCT WO 05/005604 e na U.S. 10/872.932, depositada em 21/06/2004, inteiramente incorporadas aqui, neste pedido de patente, por referência, nas quais as Figuras de 1 a 42 mostram exemplos de seqüências, estruturas, subdomínios, regiões, partes de domínios variáveis e constantes de cadeia leve e pesada de as quais podem ser usadas em proteínas derivadas de Ig da presente invenção, como mostradas aqui, neste pedido de patente.

Tabela 1. Configurações de Anticorpos Humanos.

		Regiões						
Região variável de cadeia pesada		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4

Região variável de cadeia leve		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IgA1, IgA2, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	Regiões constantes	CH1	Hinge1-4	CH2	CH3			
SIgA, IgM		CH1	Hinge1-4	CH2	CH3	Cadeia J		
IgE		CH1		CH2	CH3	CH4		

O número de substituições de aminoácidos que uma pessoa versada na técnica poderia fazer depende de muitos fatores, incluindo aqueles descritos acima. Falando de um modo geral, o número de substituições, inserções e cancelamentos de aminoácidos para um determinado anticorpo anti MCP-1, fragmento ou variante do mesmo não serão mais do que 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, tal como de 1 a 30 ou qualquer faixa ou valor dentro da mesma como especificado aqui, neste pedido de patente.

Os aminoácidos em um anticorpo anti MCP-1 da presente invenção que são essenciais para a função podem ser identificados através de métodos conhecidos na técnica, tais como mutagênese direcionada a sítio, ou mutagênese de triagem por alanina (como por exemplo, Ausubel, supra, Capítulos 8, 15; Cunningham and Wells, Science 244: 1081 a 1085 (1989)). O último processo introduz mutações isoladas de alanina a cada resíduo na molécula. As moléculas mutantes resultantes são em seguida testadas com relação a atividade biológica, tal como, porém não limitada a pelo menos uma atividade de neutralização de MCP-1. Os sítios que são importantes para a ligação com o anticorpo também podem ser identificados através de análises estruturais tais como, cristalização ressonância magnética nuclear ou marcação por foto afinidade (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224: 899 a 904

(1992) e de Vos, et al., Science 255: 306 a 312 (1992)).

Os anticorpos anti MCP-1 da presente invenção, podem incluir, porém não estão limitados a, pelo menos uma parte, seqüência ou combinação selecionada a partir de 5 até todos os aminoácidos contíguos de pelo menos uma das SEC ID NOS: 2 a 5 e 27 e 28.

O anticorpo anti MCP-1 pode opcionalmente também compreender um polipeptídio de pelo menos uma das SEC ID NOS: 27 e 28. Em uma modalidade, a seqüência de aminoácido de uma cadeia de imunoglobulina, ou uma parte da mesma tem cerca de 100% de identidade à seqüência de aminoácido da cadeia correspondente de pelo menos uma das SEC ID NOS: 27 e 28, porém para as substituições conservadoras que não mudem a especificidade de ligação do anticorpo anti MCP-1. Por exemplo, a seqüência de aminoácidos de uma região variável de uma cadeia leve pode ser comparada com a seqüência das SEC ID NOS: 4 ou 5, ou a seqüência de aminoácido de uma cadeia pesada pode ser comparada com as SEC ID NOS: 2 ou 3. De preferência, a identidade em aminoácido é determinada com a utilização de um algoritmo de computador adequado como conhecido na técnica.

Como aquelas pessoas versadas irão observar, a presente invenção inclui pelo menos um anticorpo biologicamente ativo da presente invenção. Os anticorpos biologicamente ativos tem uma atividade específica de pelo menos 20%, 30% ou 40%, e de preferência pelo menos de 50%, 60%, ou 70%, e de mais preferência de pelo menos 80%, 90%, ou de 95% a 100% daquela do anticorpo natural (não sintético) endógeno ou relacionado. Os métodos para a avaliação e quantificação as medições de atividade enzimática e especificidade de substrato, são bem-conhecidos daquelas pessoas versadas na técnica e descritos aqui, neste pedido de patente.

Em outro aspecto a invenção se refere a anticorpos humanos e a fragmentos que se ligam a antígenos que são modificados através da fixação covalente de uma parte orgânica. Essa modificação pode produzir um anticorpo ou um fragmento que se liga a antígenos com propriedades farmacocinéticas aperfeiçoadas (por exemplo, a uma meia vida no soro in vivo aumentada). A parte orgânica pode ser um grupo polimérico hidrófilo linear

ou ramificado, grupo de ácido graxo, ou grupo de éster de ácido graxo. Em modalidades específicas, o grupo polimérico hidrófilo pode ter um peso molecular de cerca de 800 até cerca de 120,000 Dáltons e pode ser um glicol de polialcano (por exemplo, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol (PPG), polímero de carboidrato ou polivinil pirrolidona, e os grupos de ácido graxo ou de éster de ácido graxo podem compreender a partir de cerca de oito até cerca de quarenta átomos de carbono.

Os anticorpos e os fragmentos que se ligam a antígenos modificados da invenção podem compreender uma ou mais partes orgânicas que estejam ligadas de modo covalente, diretamente ou indiretamente ao anticorpo. Cada parte orgânica que está ligada a um anticorpo ou a um fragmento que se liga ao antígeno da invenção pode ser independentemente um grupo polimérico hidrófilo, um grupo de ácido graxo, ou grupo de éster de ácido graxo. Na forma usada aqui, neste pedido de patente, a expressão "ácido graxo" engloba ácidos monocarboxílicos e ácidos di-carboxílicos. Um "grupo polimérico hidrófilo" na forma em que a expressão é usada aqui, neste pedido de patente, se refere a um polímero orgânico que seja mais solúvel em água do que em octano. Por exemplo, a polilisina é mais solúvel em água do que em octano. Desse modo, um anticorpo modificado através da ligação covalente de polilisina é englobado pela invenção. Os polímeros hidrófilos adequados para a modificação de anticorpos da invenção podem ser lineares ou ramificados, por exemplo, os glicóis de polialquila (por exemplo, PEG, monometóxi polietileno glicol (mPEG), PPG e os similares), carboidratos (por exemplo, dextrano, celulose, oligossacarídeos, polissacarídeos e os similares) polímeros de aminoácidos hidrófilos (por exemplo, polilisina, poli-arginina, poliaspartato e os similares), óxidos de polialcano (por exemplo, óxido de polietileno, óxido de polipropileno e os similares) e polivinil pirrolidona. De preferência, o polímero hidrófilo que modifica o anticorpo da invenção tem um peso molecular de cerca de 800 até 120.000 Dáltons como uma entidade molecular separada. Por exemplo, o PEG<sub>5000</sub> e o PEG<sub>20.000</sub> nos quais o subscrito é o peso molecular médio do polímero em Dáltons, podem ser usados. O grupo de polímero hidrófilo pode ser substituído com um até

cerca de seis grupos de alquila, ácido graxo ou éster de ácido graxo. Os polímeros hidrófilos que são substituídos com um grupo de ácido graxo ou de éster de ácido graxo podem ser preparados através do emprego de métodos adequados. Por exemplo, um polímero compreendendo um grupo de amina  
 5 pode ser acoplado com um carboxilato do ácido graxo ou do éster de ácido graxo, e um carboxilato ativado (por exemplo, ativado com N,N-carbonil diimidazola) em um ácido graxo ou éster de ácido graxo pode ser acoplado a um grupo hidroxila em um polímero.

Os ácidos graxos e os ésteres de ácido graxo adequados para a  
 10 modificação de anticorpos da invenção podem ser saturados ou podem conter uma ou mais unidades de não saturação. Os ácidos graxos que são adequados para a modificação de anticorpos da invenção incluem, por exemplo os n-dodecanoato ( $C_{12}$ , laurato), n-tetradecanoato ( $C_{14}$ , miriestato), n-octadecanoato ( $C_{18}$ , estearato), n-eicosanoato ( $C_{20}$ , araquidato), n-  
 15 docosanoato ( $C_{22}$ , behenato), n-triacontanoato ( $C_{30}$ ), n-tetracontanoato ( $C_{40}$ ), *cis*- $\Delta^9$ -octadecanoato ( $C_{18}$ , oleato), todos os *cis*- $\Delta^{5,8,11,14}$ -eicosatetraenoatos ( $C_{20}$ , araquidonato), ácido octanedióico, ácido tetradecanedióico, ácido octadecanedióico, ácido docosanedióico e os similares. Os ésteres de ácido graxo incluem mono ésteres de ácidos dicarboxílicos que  
 20 compreendem um grupo linear ou ramificado de alquila inferior. O grupo de alquila inferior pode compreender a partir de um até doze, de preferência de um até cerca de seis átomos de carbono.

Ao anticorpos humanos modificados e os fragmentos de ligação com antígeno podem ser preparados com a utilização de métodos adequados, tais como pela reação com um ou mais agentes de modificação. Um  
 25 "agente modificador" na forma em que a expressão é usada aqui, neste pedido de patente, se refere a um grupo orgânico adequado (por exemplo, um polímero hidrófilo, um ácido graxo, um éster de ácido graxo) que compreende um grupo de ativação. Um "grupo de ativação" é uma parte química ou  
 30 um grupo funcional que pode, sob condições apropriadas, reagir com um segundo grupo químico e por meio disso formar uma ligação covalente entre o agente modificador e o segundo grupo químico. Por exemplo, grupos ati-

vadores reativos a amina incluem os grupos eletrófilos, tais como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, flúor, iodo), ésteres de N-hidroxisuccinimidil e os similares. Os grupos de ativação que podem reagir com os tióis incluem, por exemplo, meleimida, iodoacetila, acrilolila, dissulfetos de piridila, tiol do ácido 5-tiol-1-nitro benzóico (TNB-tiol) e os similares. Um grupo funcional de aldeído pode ser acoplado a moléculas contendo amina ou hidrazida, e um grupo de azida pode reagir com um grupo de fósforo trivalente para a formação de fosforamidato ou ligações de fosforimida. Os métodos adequados para a indução de grupos de ativação dentro de moléculas são conhecidos na técnica (vide por exemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Um grupo de ativação pode estar ligado diretamente ao grupo orgânico (como por exemplo, um polímero hidrófilo, um ácido graxo, um éster de ácido graxo), ou através de uma parte de ligação, por exemplo um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> divalente no qual um ou mais átomos de carbono podem ser substituídos por um hetero átomo tal como oxigênio, nitrogênio ou enxofre. As partes de ligação adequadas incluem, por exemplo, tetraetileno glicol-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH- and -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH-NH-. Os agentes de modificação que compreendem uma parte de ligação podem ser produzidos, por exemplo, através da reação de uma mono-Boc-alquildiamina (por exemplo, mono-Boc-etilenodiamina, mono-Boc-diaminoexano) com um ácido graxo na presença de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) para a formação de uma ligação de amida entre a amina livre e o carboxilato de ácido graxo. O grupo de proteção Boc pode ser removido a partir do produto pelo tratamento com ácido trifluoracético (TFA) para expor uma amina primária que pode ser acoplada a outro carboxilato e o produto resultante se ciclizado para a produção de um derivado ativado de maleimida do ácido graxo. (vide, por exemplo, Thompson, *et al.*, WO 92/16221 as informações totais da qual ficam incorporadas aqui, neste pedido de patente por referência).

Os anticorpos modificados da invenção podem ser produzidos através da reação de um anticorpo humano ou um fragmento que se liga ao antígeno com um agente de modificação. Por exemplo, as partes orgânicas

podem ser ligadas ao anticorpo de uma maneira não específica através do emprego de um agente de modificação reativo a amina, por exemplo, um éster de NHS de PEG. Os anticorpos humanos modificados ou os fragmentos que se ligam ao antígeno também podem ser preparados através da redução das ligações de dissulfeto (por exemplo, ligações de dissulfeto entre cadeias) de um anticorpo ou um fragmento que se liga ao antígeno. O anticorpo ou o fragmento que se liga ao antígeno reduzidos podem em seguida ser reagidos com um agente de modificação reativo a tiol para a produção do anticorpo modificado da invenção. Os anticorpos ou os fragmentos que se ligam ao antígeno modificados humanos compreendendo uma parte orgânica que está ligada a sítios específicos de um anticorpo da presente invenção podem ser preparados com a utilização de métodos adequados, tais como proteólise reversa (Fisch *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 3: 147-153 (1992); Werlen *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5: 411-417 (1994); Kumaran *et al.*, *Protein Sci.* 6(10): 2233-2241 (1997); Itoh *et al.*, *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4): 456-463 (1997)), e métodos descritos em Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

#### 7. Anticorpos Anti-Idiótipo para Anticorpos Anti MCP-1.

Além dos anticorpos monoclonais ou quiméricos anti MCP-1, a presente invenção também é direcionada a um anticorpo antiidiotípico (anti-Id) específico para tais anticorpos da invenção. Um anticorpo anti-idiótipo é um anticorpo que reconhece determinantes únicas geralmente associadas com a região de ligação do antígeno com outro anticorpo. O anti-Id pode ser preparado através da imunização de um animal da mesma espécie e tipo genético (como por exemplo, uma cepa de camundongo) como a fonte do anticorpo Id com o anticorpo ou uma região CDR que contenha o mesmo. O animal imunizado irá reconhecer e responder ao determinante idiotípico do anticorpo imunizante e produzir um anticorpo anti-Id. O anticorpo anti-Id também pode ser usado como um "imunogeno" para a indução de uma resposta de imunização em ainda um outro animal, produzindo um assim chamado anticorpo anti-Id.

## 8. Composições de Anticorpo compreendendo outros ingredientes terapêuticos ativos.

A composição também pode compreender opcionalmente uma quantidade eficaz de pelo menos um composto ou proteína selecionado a partir de pelo menos um fármaco dermatológico, um fármaco antiinflamatório; um analgésico, um fármaco renal (por exemplo, um bloqueador ou antagonista do receptor da angiotensina (ARB), um fármaco antiinfecioso, um fármaco para o sistema cardiovascular (CV), um fármaco para o sistema nervoso central (CSN), um fármaco para o sistema nervoso autônomo (ANS), um fármaco para o trato respiratório, um fármaco para o trato gastrointestinal (GI), um fármaco hormonal, um fármaco para o equilíbrio fluido ou eletrolítico, um fármaco hematológico, um antineoplásico, um fármaco de imuno modulação, um fármaco oftálmico ou nasal, um fármaco tópico um fármaco nutricional ou similares. Esses fármacos são bem-conhecidos na técnica, incluindo formulações, indicações, dosagem e administração para cada um dos apresentados aqui, neste pedido de patente (vide, por exemplo, Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21<sup>st</sup> edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., ed., Appleton & Lange, Stamford, CT, cada um incorporado em sua totalidade aqui, neste pedido de patente, por referência).

As composições de anticorpo anti MCP-1 da presente invenção podem ainda compreender pelo menos um de qualquer quantidade eficaz adequada de uma composição ou composição farmacêutica compreendendo pelo menos um anticorpo anti MCP-1 para uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente que esteja necessitando dessa modulação, tratamento ou terapia, compreendendo opcionalmente também pelo menos um selecionado a partir de um antagonista de TNF (como por exemplo, porém não limitados a, um antagonista químico de TNF ou proteína, anticorpo monoclonal policlonal ou fragmento TNF, um receptor solúvel de TNF (como por exemplo, p55, p70 ou p85) ou fragmento, polipeptídios de fusão dos mesmos ou um antagonista de TNF de molécula pequena, por exemplo, uma proteína de ligação

I ou II (TBP-1 ou TBP-II) nerelimonmab, infliximab, interassess, CDP-571, CDP-870, afelimomab, lenercept, e os similares), um anti-reumático (como por exemplo, metotrexato, auranofin, aurotioglucose, azatioprina, etanercept, tiomalato de sódio de ouro, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida, sulfasalzina), um relaxante muscular, um narcótico, um fármaco antiinflamatório não esteróide (NSAID), um analgésico, um anestésico, um sedativo, um anestésico local, um bloqueador neuromuscular, um antimicrobiano (como por exemplo, aminoglicosídeo, um antifúngico, um antiparasítico, um antiviral, a carbapenemo, cefalosporina, uma flúorquinolona, um macrolídeo, uma penicilina, uma sulfonamida, uma tetraciclina, outros antimicrobianos), um antipsoriático, um corticosteroídeo, um esteróide anabólico, um agente relacionado com diabetes, a mineral, a nutritivo, um agente de tireóide, uma vitamina, um hormônio relacionado com cálcio, um anti diarreico, um anti tosse, um anti emético, um anti ulcera, um laxativo, um anticoagulante, uma eritropoietina (como por exemplo epoetina alfa), um filgrastim (como por exemplo G-CSF, Neupogen), um sargramostim (GM-CSF, Leucina), um agente contra a doença obstrutiva pulmonar crônica (COPD), um agente anti-fibrótico, uma imunização, uma imunoglobulina, um supressor de imunização (como por exemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), um hormônio de crescimento, um fármaco de reposição hormonal, um modulador do receptor de estrogênio, um midriático, um cicloplégico, um agente de alquilação, um antimecórito, um inibidor mitótico, um radio farmacêutico, um antidepressivo, um agente antimaníaco, um anti psicótico, um ansiolítico, um hipnótico, um simpático mimético, um estimulante, donapezil, tacrina, uma medicação para asma, um beta agonista, um esteróide inalado, um inibidor de leucotrieno, uma metilxantina, uma cromolina, uma epinefrina ou análogo, dornase alfa (Pulmozime), uma citocina ou um antagonista de citocina. Os exemplos não limitadores de tais citocinas incluem, porém não estão limitados a, qualquer uma de IL-1 até IL-29. As dosagens adequadas são bem-conhecidas na técnica. Vide, por exemplo, Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing,

Loma Linda, CA (2000), cada uma das quais dessas referências são inteiramente incorporadas aqui, neste pedido de patente, por referência.

Esses fármacos anticâncer ou antiinfecções também podem incluir moléculas de toxina que estão associadas, ligadas, co-formuladas ou co-administradas com pelo menos um anticorpo da presente invenção. A toxina pode opcionalmente atuar para matar seletivamente a célula ou o tecido patológico. A célula patológica pode ser um câncer ou outra célula. Essas toxinas podem ser, porém não estão limitadas a, toxinas purificadas ou recombinantes ou fragmentos de toxina compreendendo pelo menos um domínio citotóxico funcional de toxina, como por exemplo, selecionada a partir de pelo menos uma de rícino, toxina da difteria, uma toxina de veneno, ou uma toxina de bactéria. O termo toxina também inclui ambas as endotoxinas e as exotoxinas produzidas através de um mutante de ocorrência natural ou bactéria recombinante ou vírus que possam ocasionar qualquer condição patológica em seres humanos e em outros mamíferos, incluindo a toxina do choque, que podem resultar em morte. Essas toxinas podem incluir, porém não estão limitadas a, enterotoxina enterotoxigenica de *E. coli* instável ao calor (LT), enterotoxina estável ao calor (ST), citotoxina de *Shigella*, enterotoxina de *Aeromonas*, toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), enterotoxina Estafilocócica A (SEA), B (SEB), ou C (SEC), Enterotoxina Estreptocócica e similares. Essas bactérias incluem, porém não estão limitadas a, cepas de uma espécie de *E. coli* enterotoxiogênico (ETEC), *E. coli* entero hemorrágico (e.g., cepas do serotipo 0157:H7), espécies de *Staphylococcus* (como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), espécies de *Shigella* (como por exemplo, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, e *Shigella sonnei*), espécies de *Salmonella* (como por exemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholera-suis*, *Salmonella enteritidis*), espécies de *Clostridium* (como por exemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), espécies de *Camphlobacter* (como por exemplo, *Camphlobacter jejuni*, *Camphlobacter fetus*), espécies de *Heliobacter*, (como por exemplo, *Heliobacter pylori*), espécies de *Aeromonas* (como por exemplo, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*),

*Pleisomonas shigelloides*, *Yersina enterocolitica*, espécies de *Vibrios* (como por exemplo, *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), espécies de *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Streptococci*. Vide, por exemplo, Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3rd ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, 5 (1990); Evans et al., eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell et al, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al, eds., *The Merck Manual*, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood et al, FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); Marrack et al, Science, 248:705-711 10 (1990), os teores de cujas referências são incorporados em sua totalidade aqui, neste pedido de patente, por referência.

Os compostos, composições ou combinações do anticorpo anti MCP-1 da presente invenção podem ainda compreender pelo menos um de 15 qualquer agente auxiliar adequado, tais como, porém não limitados a, diluente, aglutinante, estabilizante, tampões, sais, solventes lipófilos, conservante, adjuvante ou os similares. Os auxiliares farmacêuticamente aceitáveis são os de preferência. Os exemplos não limitativos dos, e dos métodos para a preparação de tais soluções estéreis são bem-conhecidos na técnica, tais 20 como, porém não limitados a Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Podem ser selecionados da forma rotineira os veículos farmacêuticamente aceitáveis que sejam adequados para o modo de administração, solubilidade e/ou estabilidade do anticorpo anti-MCP-1, fragmento ou composição 25 variante como bem-conhecidos na técnica ou descritos aqui, neste pedido de patente.

Os excipientes farmacêuticos e aditivos úteis na presente composição incluem porém não estão limitados a proteínas, peptídios, aminoácidos, lipídios, e carboidratos (como por exemplo, açúcares, incluindo monosacarídeos, di-, tri- tetra- e oligossacarídeos; açúcares derivatizados tais 30 como alditóis, ácidos aldônicos, açúcares esterificados e os similares, e polissacarídeos ou polímeros de açúcar), que podem estar presentes de forma

isolada ou em combinação, compreendendo isoladamente ou em combinações de 1 a 99,99% em peso ou volume. Os excipientes de proteínas de exemplo incluem albumina do soro tal como a albumina do soro humano (HSA), albumina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína e os similares. Os componentes de aminoácido/anticorpo representativos, que também podem funcionar em uma capacidade de tampão, incluem a alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutâmico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartame e os similares. Um aminoácido de preferência é a glicina.

Os excipientes de carboidratos adequados para serem usados na invenção incluem, por exemplo, monossacarídeos tais como a frutose, maltose, galactose, glicose, D-manose, sorbose e os similares; dissacarídeos, tais como lactose, sacarose, trehalose, celobiose e os similares; polissacarídeos, tais como a rafinose, melezitose, maltodextrinas, dextranos, amidos e os similares; e alditóis, tais como o manitol, xilitol, maltitol, lactiol, xilitol sorbitol (glicitol), mioinositol, e os similares. Os excipientes de carboidratos de preferência para serem usados na presente invenção são manitol, trehalose e rafinose.

As composições de anticorpo anti MCP-1 também podem incluir um tampão ou um agente de ajuste do pH; tipicamente o tampão é um sal preparado a partir de um ácido ou base orgânica. Os tampões representativos incluem sais de ácidos orgânicos tais como os sais de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucônico, ácido carbônico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, ou ácido fólico; tampões de Tris cloridrato de trometamina ou fosfato. Os tampões de preferência para serem usados nas presentes composições são os sais de ácido orgânico tais como o citrato.

Além disso, as composições de anticorpo anti MCP-1 da invenção podem incluir excipientes/aditivos poliméricos tais como as polivinil pirrolidonas, ficóis (um açúcar polimérico), dextratos (como por exemplo, ciclodextrinas, tais como 1-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina), polietileno glicóis, agentes de aromatização, agentes antimicrobianos, adoçantes, agentes antiestática, surfatantes (como por exemplo, polissorbatos tais como o "TWEEN 20"

e TWEEN 80") lipídios (como por exemplo, fosfolipídios, ácidos graxos), esteróides (como por exemplo, colesterol) e agentes de quelação (por exemplo o EDTA).

Esses e outros excipientes farmacêuticos adicionais conhecidos e/ou aditivos adequados para serem usados no anticorpo anti-MCP-1, parte ou composições variantes de acordo com a invenção são conhecidos na técnica, por exemplo, como relacionados em "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19<sup>th</sup> ed., Williams & Williams, (1995), e no "Physician's Desk Reference", 52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), a descrição dos quais fica inteiramente incorporada aqui, neste pedido de patente, por referência. Os materiais de veículo ou de excipientes de preferência são os carboidratos (por exemplo, sacarídeos e alditóis) e os tampões (por exemplo, citrato) ou agentes poliméricos.

#### 9. Formulações.

Como observado acima, a invenção proporciona formulações estáveis adequadas para uso farmacêutico ou veterinário, compreendendo pelo menos um anticorpo anti MCP-1 em uma formulação farmacêuticamente aceitável.

Como observado acima, a invenção proporciona um artigo de fabricação, compreendendo material de embalagem e pelo menos um frasco compreendendo uma solução de pelo menos um anticorpo anti-MCP-1, com os tampões e/ou conservantes prescritos, opcionalmente em um diluente aquoso, em que o referido material de embalagem compreende uma rótulo que indica que tal solução pode ser mantida durante um período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas ou mais. A invenção também compreende um artigo de fabricação, compreendendo material de embalagem, um primeiro frasco compreendendo pelo menos um anticorpo anti-MCP-1 liofilizado, e um segundo frasco compreendendo um diluente aquoso do tampão ou do conservante prescrito, em que o referido material de embalagem compreende uma rótulo que instrui um paciente para reconstituir pelo menos um anticorpo anti-MCP-1 liofilizado no diluente aquoso para a formação de uma solução que pode ser mantida durante um

período de vinte e quatro horas ou maior.

A faixa de pelo menos um anticorpo anti MCP-1 no produto da presente invenção inclui quantidades que produzem depois da reconstituição, em um sistema seco/molhado, concentrações a partir de cerca de 1,0  
5  $\mu\text{g/ml}$  até cerca de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , embora concentrações mais baixas ou mais altas sejam operáveis e são dependentes do veículo de suprimento pretendido, como por exemplo, formulações de solução serão diferentes de métodos de adesivo transdérmico, pulmonares, por transmucosa ou osmótica ou de micro bombas.

10 O diluente aquoso também compreende opcionalmente um conservante farmacologicamente aceitável. Os conservantes de preferência incluem aqueles selecionados a partir do grupo que consiste em fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresil, clorocresol, álcool de benzila, parabeno de alquila (metila, etila, propila, burila e os similares), cloreto de benzalcônio, deidroacetato de sódio e timerosal, ou as misturas dos mesmos. A concentração do  
15 conservante usado na formulação é uma concentração suficiente para produzir um efeito anti microbiano. Essas concentrações são dependentes do conservante selecionado e são determinadas com facilidade pelo artesão habilitado.

20 Outros excipientes, como por exemplo, os agentes isotônicos, tampões, antioxidantes, aumentadores de preservação, podem ser opcionalmente e de preferência adicionados ao diluente. Um agente de capacidade isotônica, tal como a glicerina, é comumente usado em concentrações conhecidas. As formulações podem cobrir uma faixa ampla de pH, tal como  
25 a partir de cerca de pH 4 até cerca de pH 10, e de preferência variam a partir de cerca do pH 5 até cerca de pH 9, e em uma faixa de maior preferência de cerca de 6,0 até cerca de 8,0. De preferência as formulações da presente invenção têm um pH entre cerca de 6, 8 e cerca de 7.8. Os tampões de preferência incluem os tampões de fosfato, de mais preferência fosfato de sódio, especificamente solução salina tamponada com fosfato (PBS).  
30

Outros aditivos, tais como solubilizantes farmacologicamente aceitáveis como o Teen 20 (monolaurato de polioxietileno sorbitano (20)),

Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno sorbitano (20)), Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitano (20)), Pluronic F68 (copolímeros em bloco de polioxoetileno e polioxipropileno), e PEG (polietileno glicol) ou surfatantes não iônicos tais como o polissorbato 20 ou 80 ou o poloxâmero 184 ou 188, polis Pluronic®, outros copolímeros em bloco, e quelantes tais como EDTA e AGTA podem ser adicionados opcionalmente as formulações ou composições para a redução da agregação. Esses aditivos são especificamente úteis se for usado um recipiente de bomba ou de plástico para a administração da formulação. A presença de um surfatante farmacologicamente aceitável mitiga a propensão da proteína para se agregar.

As formulações da presente invenção podem ser preparadas através de um processo que compreende a mistura de pelo menos um anticorpo anti MCP-1 e uma solução tamponada em quantidade suficiente para prover a proteína nas concentrações desejadas. As variações desse processo poderão ser reconhecidas por uma pessoa versada na técnica. Por exemplo, a ordem em que os componentes são adicionados, se forem usados aditivos adicionais, a temperatura e o pH nos quais a formulação é preparada, são todos os fatores que podem ser otimizados com relação a concentração e os meios de administração usados.

As formulações reivindicadas podem ser providas a pacientes como soluções ou como frascos duplos compreendendo um frasco de pelo menos um anticorpo anti MCP-1 liofilizado que é reconstituído com um segundo frasco contendo água, um conservante e/ou excipientes, de preferência um tampão de fosfato e/ou solução salina e um sal escolhido em um diluente aquoso. Tanto um frasco de solução única ou uma dupla de frascos necessitando de reconstituição podem ser reusados múltiplas vezes e podem ser suficientes para um ciclo único ou múltiplos ciclos de tratamento do paciente e desse modo podem prover um regime de tratamento mais conveniente do que o correntemente disponível.

Os artigos de fabricação presentemente reivindicados são úteis para a administração durante um período a partir de imediatamente até vinte e quatro horas ou maior. Por consequência, os artigos de fabricação presen-

- temente reivindicados oferecem vantagens significativas para o paciente. As formulações da invenção podem opcionalmente ser armazenadas com segurança em temperaturas a partir de cerca de 2 até cerca de 40°C e conservam a atividade biológica da proteína durante períodos de tempo prolongados, permitindo desse modo um rótulo na embalagem indicando que a solução pode ser mantida e/ou usada durante um período de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, ou 96 horas, ou maior. Se for usado um diluente preservado, esse rótulo pode incluir o uso em até de 1 a 12 meses, durante meio ano, um ano e meio e/ou dois anos.
- 10 O produto reivindicado pode ser provido indiretamente aos pacientes através da provisão para farmácias, clínicas e outras de tais instituições e facilidades, de soluções transparentes ou de frascos duplos compreendendo um frasco de pelo menos um anticorpo anti-MCP-1 liofilizado que é reconstituído com um segundo frasco contendo o diluente aquoso. A solução
- 15 transparente neste caso pode ser de até um litro ou mesmo maior em tamanho, provendo um reservatório maior a partir do qual pequenas porções de pelo menos uma solução de anticorpo possam ser retiradas uma ou múltiplas vezes para serem transferidas para frascos menores e providas pela farmácia ou clínica aos seus consumidores e/ou pacientes.
- 20 Dispositivos reconhecidos compreendendo esses sistemas de frascos único ou duplos incluem aqueles dispositivos de injetor tipo caneta para o suprimento de uma solução tal como o BD Pens, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D® Pen, AutoPen®, e OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®,
- 25 lject®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, por exemplo, tais como fabricados ou desenvolvidos por Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, [www.bectondickenson.com](http://www.bectondickenson.com)), Disetronic (Burgdorf, Suíça, [www.disetronic.com](http://www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon ([www.bioject.com](http://www.bioject.com)); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, [www.weston-medical.com](http://www.weston-medical.com)), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, [www.mediject.com](http://www.mediject.com)). Os
- 30 dispositivos reconhecidos compreendendo o sistema de frascos duplos incluem aqueles sistema de injetor tipo caneta para a reconstituição de um

fármaco liofilizado em um cartucho para o suprimento da solução reconstituída tal como o HumatroPen®.

Os produtos presentemente reivindicados incluem o material de embalagem. O material de embalagem provê, além da informação requerida pelas agências reguladoras, as condições sob as quais o produto pode ser usado. O material de embalagem da presente invenção provê instruções ao paciente para a reconstituição do pelo menos um anticorpo anti MCP-2 no diluente aquoso para formar uma solução e para usar a solução durante um período de 2 a 24 horas ou mais para o produto de dois frascos, molhado/seco. Para o produto de solução de um frasco único, o rotulo indica que tal solução pode ser usada durante um período de 2 a 24 horas ou maior. Os produtos presentemente reivindicados são úteis para serem usados em produtos farmacêuticos humanos.

Outras formulações ou métodos para a estabilização de um anticorpo anti MCP-1 podem resultar outra solução, que não a solução transparente de pó liofilizado compreendendo o referido anticorpo. Entre as soluções não transparentes estão as formulações que compreendem as suspensões particuladas, os referidos particulados sendo uma composição que contém o anticorpo anti MCP-1 em uma estrutura de dimensões variáveis e conhecidos de forma variada como uma microesfera, micro partícula, nano partícula, nano esfera, ou lipossomo. Essas formulações particuladas essencialmente esféricas relativamente homogêneas que contém um agente ativo podem ser formadas através do contato de uma fase aquosa contendo o ingrediente ativo e um polímero e uma fase não aquosa seguida pela evaporação da fase não aquosa para ocasionar a coalescência das partículas a partir da fase aquosa como reportada pela U. S. 4.589.330. As micropartículas porosas podem ser preparadas primeiro pela utilização de uma primeira fase contendo o princípio ativo e um polímero disperso em um solvente contínuo e removendo o referido solvente a partir da suspensão através de secagem por congelamento ou por diluição-extração-precipitação como reportado pela U. S. 4.818.542. Os polímeros de preferência para essas preparações são copolímeros naturais ou sintéticos selecionados a partir do grupo

que consiste em gelatina, ágar, amido, arabinogalactano, albumina, colágeno, ácido poliglicólico, ácido polilático, glicolida-L(-) lactídio poli(epsilon-caprolactona), poli(ácido epsilon-caprolactona-CO-lático, poli(ácido epsilon-caprolactona-CO-glicólico), poli(ácido  $\beta$ -hidróxi butírico), óxido de polietileno, polietileno, poli(alquil-2-acrilato de ciano), poli(metacrilato de hidroxietil), poliamidas, poli(aminoácidos), poli(2-hidroxietil DL-aspartamida), poli(éster de uréia), poli(L-fenilalanina/etileno glicol/1,6 diidrocianato hexano) e poli(metacrilato de metil).

Os polímeros de preferência específica são os poliésteres tais como o ácido poliglicólico, ácido poliacético, glicolida-L(-)lactido poli(epsilon-caprolactona, poli(ácido epsilon-caprolactona-CO-lactico, e poli(ácido epsilon-caprolactona-CO-glicólico). Os solventes úteis para a dissolução do polímero e/ou do ingrediente ativo incluem água, hexafluorisopropanol, cloreto de metileno, tetraidrofurano, hexano, benzeno ou sesquidrato de hexafluor acetona. O processo para a dispersão da fase que contem o ingrediente ativo com a segunda fase pode incluir forças com pressão a referida primeira fase através de um orifício ou bocal para efetuar a formação de gotículas.

As formulações em pó seco podem partir de outros processos que não o de liofilização tais como através de secagem por pulverização, ou extração do solvente através de evaporação ou pela precipitação de uma composição cristalina seguida por uma ou mais etapas para a remoção do solvente aquoso ou não aquoso. A preparação de uma preparação de anticorpo por secagem por pulverização é ensinada na U. S. 6.019.968. As composições de pó seco com base no anticorpo podem ser produzidas através de soluções ou suspensões pastosas de secagem por pulverização do anticorpo e, opcionalmente, excipientes, em um solvente sob condições para prover um pó seco respirável. Os solventes podem incluir compostos polares tais como a água e etanol, que podem ser secados com facilidade. A estabilidade do anticorpo pode ser aumentada através da realização dos procedimentos de secagem por pulverização na ausência de oxigênio, tal como sob uma atmosfera de nitrogênio ou através da utilização do nitrogênio como o gás de secagem. Outra formulação relativamente seca é uma dispersão de

uma pluralidade de microestruturas perfuradas dispersas em um meio de suspensão que compreenda tipicamente um propelente de hidrofluoralcano, como ensinado na WO 99/16419. As dispersões estabilizadas podem, ser administradas ao pulmão de um paciente com a utilização de um inalador de dose medida. Os equipamentos úteis na fabricação comercial de medicamentos secados por pulverização são fabricados por Buchi Ltd. ou Niro Corp.

Pelo menos um anticorpo anti MCP-1 tanto em formulações ou soluções estáveis como preservadas descritas aqui, neste pedido de patente, podem ser administradas a um paciente de acordo com a presente invenção através de uma variedade de métodos de suprimento incluindo injeção SC ou IM; transdérmico, pulmonar, transmucosa, implante, bomba osmótica, cartucho, microbomba, ou outros meios apreciados pelo versado, como bastante conhecidos na técnica.

#### 10. Aplicações Terapêuticas.

A presente invenção também proporciona um método para a modulação ou o tratamento de pelo menos uma doença relacionada com a MCP-1 em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente, como conhecida na técnica ou como descrita aqui, neste pedido de patente, com a utilização de pelo menos um anticorpo MCP-1 da presente invenção. A presente invenção também proporciona um método para a modulação ou o tratamento de pelo menos uma doença relacionada com a MCP-1, em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, porém não limitando a, pelo menos uma doença maligna, doença metabólica, uma doença relacionada com imunização ou inflamatória, uma doença cardiovascular, uma doença infecciosa, ou uma doença neurológica.

Essas condições são selecionadas a partir de, porém não estão limitadas a, doenças ou condições mediadas pela adesão de células e/ou angiogênese. Essas doenças ou condições incluem um distúrbio ou doença de imunização, um distúrbio ou uma doença cardiovascular, um distúrbio ou uma doença infecciosa, maligna e/ou neurológica, ou outras condições conhecidas ou especificadas como relacionadas com a MCP-1. Especifica-

mente, os anticorpos são úteis para o tratamento de doenças que envolvem a angiogênese tais como a doença do olho e doença neoplásica, remodelação de tecido como a restenose, e proliferação de determinados tipos de células especificamente os carcinomas de células epiteliais e escamosas. As indicações específicas incluem o uso no tratamento de aterosclerose, restenose, metástase do câncer, artrite reumatóide, retinopatia diabética e degeneração macular. Os anticorpos neutralizantes da invenção também são úteis para a prevenção ou o tratamento de reabsorção ou degradação de osso não desejada, por exemplo, como encontrada na osteoporose ou resultante da expressão exagerada de PTHrP por alguns tumores. Os anticorpos podem também ser úteis para o tratamento de diversas doenças fibróticas tais como fibrose pulmonar idiopática, nefropatia diabética, hepatite e cirrose.

Desse modo, a presente invenção prove um método para a modulação ou o tratamento de pelo menos uma doença relacionada com a MCP-1, em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente, como conhecidas na técnica ou como descritas aqui, neste pedido de patente, com a utilização de pelo menos um anticorpo MCP-1 da presente invenção. As indicações específicas são discutidas abaixo:

#### 20 Doença Pulmonar

A presente invenção também proporciona um método para a modulação ou o tratamento de pelo menos uma doença maligna em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, porém não limitada a, pelo menos uma de: pneumonia, abscesso no pulmão, doença ocupacional pulmonar causada por agentes na forma de poeiras, gases, ou névoas; asma, bronquiolite fibrosa obliterans, insuficiência respiratória, doenças da hipersensibilidade dos pulmões incluindo pneumonite de hipersensibilidade (alveolite alérgica extrínseca), aspergilose bronco pulmonar e reações a fármacos; síndrome do desconforto respiratório adulto (ARDS), síndrome de Goodpasture, distúrbios obstrutivos crônicos das vias aéreas, doenças intersticiais idiopáticas do pulmão tais como fibrose pulmonar idiopática e sarcoidose, pneumonia intersticial descamativa, pneumonia intersticial aguda,

- bronquiolite respiratória associada com doença intersticial do pulmão, bronquiolite obliterans com o pneumonia e organizando, pneumonite intersticial linfocítica, granulomatose da célula de Langerhans, hemosiderose idiopática pulmonar; bronquite aguda, proteinose pulmonar alveolar, bronquiestasia, 5 distúrbios pleurais, atelectasis, fibrose cística, e tumores do pulmão, e embolismo pulmonar.

#### Doença Maligna

- A presente invenção também proporciona um método para a modulação ou tratamento de pelo menos uma doença maligna em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, porém não limitadas a, pelo 10 menos uma de: leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda, (ALL)Célula B, célula T ou FAB ALL, leucemia mielóide aguda (AML), leucemia mielocítica crônica (CML), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia de célula do pelo, síndrome mielodiplástica (MDS), um linfoma, doença de 15 Hodgkin, um linfoma maligno, linfoma não de hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiplo, sarcoma de Kaposi, carcinoma colo retal, carcinoma pancreático, carcinoma da célula renal, câncer de mama, carcinoma nasofaríngeo, histiocitose maligna, síndrome para neoplásica/hipercalcemia de malignidade, tumores sólidos, adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas, sarcomas, melanoma maligno, melanoma especificamente metatático, 20 hemangioma, doença metastática, câncer relacionado a reabsorção óssea, câncer relacionado a dor óssea e os similares.

#### Doença Relacionada com Imunização.

- A presente invenção também proporciona um método para a 25 modulação ou tratamento de pelo menos uma doença relacionada com a imunização em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, porém não limitadas a, pelo menos uma de artrite reumatóide, artrite reumatóide de juvenil, artrite reumatóide juvenil sistêmica inicial, artrite psoriática, espondilite anquilosante, úlcera gástrica, artropatias soro negativas, osteoartrite, doença inflamatória do intestino, colite ulcerativa, lúpus etitematoso sistêmico, síndrome antifosfolipídios, iridocistite/uveíte neurite ótica, fibrose pulmonar idiopática, granulomatose sistêmica vasculite de Wegeger, sardoisi- 30

- dose, orquite/procedimentos de reversão de vasectomia, doenças alérgicas atópicas, asma, rinite alérgica, eczema, dermatite alérgica de contato, conjuntivite alérgica, pneumonite de hipersensibilidade, transplantes, rejeição de transplante de órgãos. Doença de enxerto versus hospedeiro, síndrome de
- 5 resposta inflamatória sistêmica, síndrome septicemia, septicemia gram-positiva, septicemia gram-negativa, septicemia de cultura negativa, septicemia fúngica, febre neuropênica, urosepticemia, meningococemia, trauma/hemorragia, queimaduras, exposição a radiação ionizante, pancreatite
- 10 tite induzida pelo álcool, patologias inflamatórias crônicas, sarcoidose, patologia de Chron, anemia da célula foice, diabetes, nefrose, doenças atópicas, reações de hipersensibilidade, rinite alérgica, febre do feno, rinite perene, conjuntivite, endometriose, asma, urticária, anafilaxe sistêmica, dermatite, anemia perniciosa, doença hemolítica, trombocitopenia, rejeição de enxerto
- 15 de qualquer órgão ou tecido, rejeição ao transplante de rim, rejeição ao transplante de coração, rejeição ao transplante de fígado, rejeição ao transplante de medula óssea (BMT), rejeição a enxerto de pele, rejeição ao transplante de cartilagem, rejeição ao transplante de osso, rejeição ao transplante de intestino delgado, rejeição ao transplante de timo fetal, rejeição ao transplante de paratireóide, rejeição ao enxerto de qualquer órgão ou tecido, rejeição ao transplante de enxerto, reações de hipersensibilidade anti-receptor, doença de Graves, doença de Raymond, diabetes tipo B resistente a insulina, asma, miastenia gravis, citotixidez mediada por anticorpo, reações de hipersensibilidade do tipo III, lupus eritematoso sistêmico, síndrome de PO-
- 20 EMS (polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, gamopatia nonoclônica, e síndromes de mudanças da pele), polineuropatia, organonegalia, endocrinopatia, gamopatia nonoclônica, e síndromes de mudanças da pele, síndrome antifosfolípido, pênfigo, escleroderma, doença mista do tecido conectivo, doença idiopática de Addison, diabete melito, hepatite ativa crônica,
- 25 cirrose biliar primária, vitiligo, vasculite, síndrome de cardiectomia por MI, hipersensibilidade do tipo IV, dermatite de contato, pneumonite de hipersensibilidade, rejeição de enxerto, granulomas devido a organismos intracelula-
- 30

- res, sensibilidade ao fármaco, metabólico/idiopático, doença de Wilson, hemacromatose, deficiência de alfa-1-antitripsina, retinopatia diabética, tiroidite de hashimoto, osteoporose, avaliação do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal, cirrose biliar primária, encefalomielite, caquexia, fibrose cística, doença de pulmão neonatal, doença obstrutiva pulmonar crônica (COPD), linfocitose hematofagocítica familiar, condições dermatológicas, psoríase, alopecia, síndrome nefrótica, nefrite, nefrite glomerular, insuficiência renal aguda, hemodiálise, uremia, toxidez, pré-eclâmpsia, terapia OKT3, terapia anti CD3, terapia de citocina, quimioterapia, terapia de radiação (por exemplo, incluindo, porém não limitada a astenia, anemia, caquexia e os similares) intoxicação crônica por salicilato, e os similares. Vide, por exemplo, o Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), cada um inteiramente incorporado por referência.

#### Doença Cardiovascular

##### Relacionada com Imunização.

- A presente invenção também proporciona um método para a modulação ou tratamento de pelo menos uma doença cardiovascular em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, porém não limitadas a, síndrome de "stun" cardíaco, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, acidente vascular cerebral isquêmico, hemorragia, arteriosclerose, aterosclerose, restenose, doença aterosclerótica diabética, hipertensão, hipertensão arterial, hipertensão renovascular, síncope, choque, sífilis do sistema cardiovascular, insuficiência cardíaca, cor pulmonale, hipertensão pulmonar primária, arritmias cardíacas, batimentos atríacos etópicos, palpitação atrial, fibrilação atrial (contínua ou de paroxismo), síndrome pós perfusão, resposta a inflamação de desvio cardiopulmonar, taquicardia atrial caótica ou multi-focal, taquicardia QSR regular estreita, arritmias específicas, fibrilação ventricular, arritmias de novo His, bloqueio atrioventricular, bloqueio do ramo do novo, distúrbios miocárdicos isquêmicos, doença da artéria coronária, angina pectoris, infarto do miocárdio, car-

diomiopatia, cardiomiopatia congestiva dilatada, cardiomiopatia restritiva, doenças das válvulas do coração, endocardite, doença do pericárdio, tumores cardíacos, aneurismas da aorta e periféricos, dissecção da aorta, inflamação da aorta, oclusão da aorta abdominal e suas ramificações, distúrbios vasculares periféricos, distúrbios de oclusão arterial, doença aterosclerótica periférica, thromboangitis obliterans, distúrbios arteriais periféricos funcionais, fenômeno e doença de Raynaud, acrocianose, eritromalgia, doenças venosas, trombose venosa, veias varicosas, fistula arterovenosa, linfoderma, lipidemia, angina instável, lesão de reperfusão, síndrome pós bomba, lesão de isquemia de reperfusão, e os similares. Esse método pode opcionalmente compreender a administração de uma quantidade eficaz de uma composição ou composição farmacêutica compreendendo pelo menos um anticorpo anti MCP-1 a uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente que esteja necessitando de tal modulação, tratamento ou terapia.

#### 15 Doença Neurológica.

A presente invenção também proporciona um método para a modulação ou tratamento de pelo menos uma doença neurológica em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, porém não limitadas a pelo menos uma de: doenças neuro degenerativas, esclerose múltipla, dor de cabeça enxaqueca, complexo de demência de AIDS, doenças demilantes, tais como esclerose múltipla e mielite transversa aguda, distúrbios extrapiramidais e do cerebelo tais como lesões do sistema córtico espinhal, distúrbios dos gânglios basais ou distúrbios do cerebelo, distúrbios de movimento hiper cinético tais como Coreia de Huntington e coreia senil; distúrbios do movimento induzidos por fármacos, tais como aqueles induzidos por fármacos que bloqueiam os receptores de dopamina do SNC, distúrbios de movimento hiper cinético, tais como a mal-de-Parkinson; Paralisia progressiva supra núcleo, lesões estruturais do cerebelo, degeneração espinho cerebelica, tal como ataxia espinhal, ataxia de Friederich, degenerações corticais do cerebelo, degenerações múltiplas de sistema (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, e Machado-Joseph); distúrbios sistêmicos (doença de Refsums, abetalipoproteemia, ataxia, telangiectasia e distúrbios do multi sistema mito-

condrial), distúrbios do núcleo "demylinating", tais como esclerose múltipla, mielite transversa aguda; e distúrbios de unidade motora tais como atrofia muscular (degeneração celular anterior ao nascimento, tais como esclerose lateral amiotrófica, atrofia muscular espinhal infantil e atrofia muscular espinhal juvenil); doença de Alzheimer, Dindrome de Down na meia idade; doença difusa do corpo de Lewy; Demência senil do tipo do corpo de Lewy; síndrome de Wernicke-Korsakoff; alcoolismo crônico; doença de Creutzfeldt-Jakob; panencefalite esclerosante sub aguda; doença de Hallerrorden-Spatz; e Demência pugilística, e os similares. Esse método pode opcionalmente compreender a administração de uma quantidade eficaz de uma composição ou composição farmacêutica compreendendo pelo menos um anticorpo anti MCP-1 ou uma parte específica ou variante a uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente que esteja necessitando de tal modulação, tratamento ou terapia. Vide, por exemplo, o Merck Manual, 16<sup>th</sup> Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

#### Condições Fibróticas

Além das condições e doenças acima descritas, a presente invenção também proporciona um método para a modulação ou o tratamento de condições fibróticas de várias etiologias tais como fibrose do fígado (incluindo, porém não limitada a cirrose induzida pelo álcool, cirrose de indução virótica, hepatite induzida por auto imunização). fibrose do pulmão (incluindo, porém não limitada a escleroderma, fibrose pulmonar idiopática); fibrose do rim (incluindo, porém não limitada a escleroderma, nefrite diabética, nefrite glomerular, nefrite de lupus); fibrose dérmica (incluindo, porém não limitada a escleroderma, formação de cicatriz hipertrófica ou quelóide, queimaduras); mielofibrose; Neurofibromatose; fibroma, fibrose intestinal; e adesões fibróticas resultantes de procedimentos cirúrgicos.

A presente invenção também proporciona um método para a modulação ou o tratamento de pelo menos uma lesão, trauma ou lesão de tecido ou condição crônica resultante de ou relacionada aos mesmos, em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, porém não limitando a, pelo menos um de: lesão corporal ou um trauma associado com cirurgia

incluindo cirurgia torácica, abdominal, do crânio ou oral; ou na qual a lesão é selecionada a partir do grupo que consiste em lesões assépticas, lesões de contusão, lesões de incisão, lesões laceradas, lesões não penetrantes, lesões abertas, lesões penetrantes, lesões perfuradas, lesões de punção, lesões sépticas, lesões de infarto ou subcutâneas; ou em que a lesão é selecionada a partir do grupo que consiste em úlceras isquêmicas, escaras de pressão, fistulas, mordidas graves, queimaduras térmicas e lesões de local doador; ou nas quais a lesão é uma lesão aftosa, uma lesão traumática ou uma lesão associada ao herpes. As lesões dos locais doadores são lesões que ocorrem, por exemplo, em conexão com a remoção de tecido duro de uma parte do corpo para outra parte do corpo como por exemplo, em conexão com transplantes. As lesões resultantes a partir de tais operações são muito dolorosas e uma cicatrização melhorada é por esse motivo muito valiosa. A fibrose de lesão também é tratável com uma terapia de anticorpo anti MCP-1 na medida em que as primeiras células que invadem a área da lesão são os neutrófilos seguidos pelos monócitos que são ativados pelos macrófagos. Os macrófagos são considerados como sendo essenciais para a cicatrização eficaz da lesão em que eles também são responsáveis pela fagocitose de organismos patogênicos e uma limpeza dos restos de tecido. Além do mais, eles liberam numerosos fatores envolvidos em eventos subsequentes do processo de cicatrização. Os macrófagos atraem os fibroblastos que iniciam a produção de colágeno. Quase todos os processos de reparo de tecido incluem a formação inicial de tecido conectivo, um estímulo desse processo e dos processos subsequentes melhora a cicatrização do tecido, no entanto a produção exagerada de tecido conectivo e de colágeno pode levar a um tecido fibrótico caracterizado como não elástico e hipóxico. Os anticorpos anti MCP-1 da invenção podem ser usados em métodos para a modulação, tratamento ou prevenção de tais seqüelas da cicatrização de lesões.

Os presentes anticorpos da presente invenção também podem ser usados em métodos para a modulação ou o tratamento de pelo menos um sintoma de rejeição crônica de um órgão, tecido ou célula transplanta-

dos, tal como um transplante cardíaco.

### Outros Usos Terapêuticos de Anticorpos Anti MCP-1.

A presente invenção também proporciona um método para a modulação ou o tratamento de pelo menos uma doença infecciosa em uma  
 5 célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo porém não limitando a, pelo menos uma: infecção bacteriana aguda ou crônica, processos infecciosos ou parasíticos agudos ou crônicos, incluindo as infecções bacterianas, viróticas ou fúngicas, infecção HIV/neuropatia HIV, meningite, hepatite (A, B ou C ou similares) artrite séptica, peritonite, pneumonia, epiglote, e. coli  
 10 0157:h7, síndrome hemolítica urêmica/purpura trombocitopenica, malária, febre dengue hemorrágica, leishmaniose, lepra, síndrome do choque tóxico, miosite estreptocócica, gangrena gasosa, micobacterium tuberculosis, micobacterium avium intracelulare, pneumonia pneumocistis carinii, doença inflamatória da pélvis, orquite/epididimite, legionela, doença de  
 15 lima, influenza a, vírus de epstein-barr, síndrome hemafagocítica vital-associada, encefalite vital/meningite asséptica, e as similares.

Qualquer método da presente invenção pode compreender a administração de uma quantidade eficaz de uma composição ou composição farmacêutica compreendendo pelo menos um anticorpo anti MCP-1 a uma  
 20 célula, tecido, órgão, animal ou paciente que esteja necessitando de tal modulação, tratamento ou terapia. Esse método também pode opcionalmente ser, pelo menos um selecionado a partir de pelo menos um antagonista de TNF (como por exemplo, porém não limitado a um anticorpo ou fragmento TNF, um receptor ou fragmento TNF solúvel, uma proteína de fusão do  
 25 mesmo, ou um antagonista TNF de molécula pequena), um anti-reumático (como por exemplo, metotrexato, auranofin, aurotioglucose, azatioprina, etanercept, tiomalato de sódio de ouro, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida, sulfasalzina), um relaxante muscular, um narcótico, um fármaco antiinflamatório não esteróide (NSAID), um analgésico, um anestésico, um sedati-  
 30 vo, um anestésico local, um bloqueador neuromuscular, um antimicrobiano (como por exemplo, aminoglicosídeo, um antifúngico, um anti parasítico, um antiviral, a carbapenemo, cefalosporina, uma fluorquinolona, um macrolídeo,

uma penicilina, uma sulfonamida, uma tetraciclina, outros antimicrobianos), um antipsoriático, um corticosteróide (dexametasona), um esteróide anabólico, um agente relacionado com diabetes, a mineral, a nutritivo, um agente de tiróide, uma vitamina, um hormônio relacionado com cálcio, um antidiarréico,

5 um antitussígeno, um antiemético, um antiúlcera, um laxativo, um anticoagulante, uma eritropoietina (como por exemplo epoetina alfa), um filgrastim (como por exemplo G-CSF, Neupogen), um sargramostim (GM-CSF, Leucina), uma imunização, uma imunoglobulina (rituximab), um supressor de imunização (como por exemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), um hormônio de crescimento, um antagonista de hormônio, um antagonista de hormônio de reprodução (flutamida, nilutamida, um modulador da liberação de hormônio (leuprolida, goserelina), um fármaco de reposição hormonal, um modulador do receptor de estrogênio (tamoxifeno), um retinóide (tretinoína),

10 um inibidor da topoisomerase (eposido, irinotecano), uma cicocina (doxorubicina), um midriático, um cicloplégico, um agente de alquilação (carboplatina), uma mostarda de nitrogênio (melfalen, clorabucil), uma uréia nitrosa (carmustina, estramustina), um antimetabólito (metrotexato, citarabina, fluoruracil), um inibidor mitótico (viscristina, taxol), um radio farmacêutico, um antidepressivo, um agente antimaníaco, um anti psicótico, um ansiolítico

15 (lodo 131-tositumomab), um rádio sensibilizados (misonidazola, tirapazamina), um antidepressivo, um agente anti maníaco, um anti psicótico, um ansiolítico, um hipnótico, um simpático mimético, um estimulante, donapezil, tacrina, uma medicação para asma, um beta agonista, um esteróide inalado, um inibidor de leucotrieno, uma metilxantina, uma cromolina, uma epinefrina

20 ou análogo, dornase alfa (Pulmozyme), uma citocina (interferon alfa-2, IL2) ou um antagonista de citocina (inflixamab). As dosagens adequadas são bem-conhecidas na técnica. Vide, por exemplo, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition,

25 on, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), cada uma das quais dessas referências são inteiramente incorporadas aqui, neste pedido de patente, por referência.

As combinações específicas para o tratamento de doença neoplásica compreendem a co-administração ou uma terapia de combinação através da administração antes, concomitantemente, e/ou depois de um agente antineoplásico, tal como um agente de alquilação, uma amostra de nitrogênio, uma uréia nitrosa, um antibiótico, um anti metabólito, um agonista ou antagonista hormonal, um modulador de imunização e os similares, Para uso no melanoma metatástico e outras doenças neoplásicas, uma combinação de preferência é a de co-administrar o anticorpo com dacarbazina, interferon alfa, interleucina-1, temozolamida, cisplatina, vimblastina, Mesilato de Imatinib, carnustina, paclitaxel e os similares. Para o melanoma metatástico a dacarbazina é a de preferência.

#### 11. Dosagens e Métodos de Administração.

Um método da presente invenção pode compreender um método para o tratamento de um distúrbio mediado por MCP-1, compreendendo a administração de uma composição ou composição farmacêutica que compreenda, pelo menos um anticorpo anti MCP-1 a uma célula, tecido, órgão animal ou paciente que esteja necessitando de tal modulação, tratamento ou terapia. Esse método pode opcionalmente ainda compreender a co-administração ou uma terapia de combinação para o tratamento dessas doenças ou distúrbios, em que a administração do referido pelo menos um anticorpo anti MCP-1, parte especificada ou variante do mesmo, compreende também a administração antes, ao mesmo tempo, e/ou depois de pelo menos uma selecionada a partir de um fármaco renal, um fármaco dermatológico, um fármaco antiangiogênico, um fármaco antiinfecção, um fármaco para o sistema cardiovascular (CV), um fármaco para o sistema nervoso central (CSN), um fármaco para o sistema nervoso autônomo (ANS), um fármaco para o trato respiratório, um fármaco para o trato gastrointestinal (GI), um fármaco hormonal, um fármaco para o equilíbrio fluido ou eletrolítico, um fármaco hematológico, um antineoplásico, um fármaco de imunomodulação, um fármaco oftálmico ou nasal, um fármaco tópico um fármaco nutricional ou similares, e pelo menos um antagonista de TNF (por exemplo, porém não limitado a um anticorpo TNF ou fragmento, um receptor ou fragmento TFN

solúvel, uma proteína de fusão do mesmo, ou um antagonista TFN de molécula pequena), um antireumático (como por exemplo, metotrexato, auranofin, aurotioglucose, azatioprina, etanercept, tiomalato de sódio de ouro, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida, sulfasalzina), um relaxante muscular, um

5 narcótico, um fármaco antiinflamatório não esteróide (NSAID), um analgésico, um anestésico, um sedativo, um anestésico local, um bloqueador neuromuscular, um antimicrobiano (como por exemplo, aminoglicosídeo, um antifúngico, um antiparasítico, um antiviral, a carbapenemo, cefalosporina, uma flúorquinolona, um macrolídeo, uma penicilina, uma sulfonamida, uma tetraciclina, outros antimicrobianos), um antipsoriático, um corticosteróide, um esteróide anabólico, um agente relacionado com diabetes, a mineral, a nutritivo, um agente de tiróide, uma vitamina, um hormônio relacionado com cálcio, um antidiarréico, um anti-tussígeno, um antiemético, um antiulcera, um laxativo, um anticoagulante, uma eritropoietina (como por exemplo epoetina

15 alfa), um filgrastim (como por exemplo G-CSF, Neupogen), um sargramostim (GM-CSF, Leucina), uma imunização, uma imunoglobulina, um supressor de imunização (como por exemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), um hormônio de crescimento, um fármaco de reposição hormonal, um modulador do receptor de estrogênio, um midriático, um cicloplégico, um agente de

20 alquilação, um antimetabólito (metotrexato, citarabina, fluoruracila), um inibidor mitótico, um radio farmacêutico, um antidepressivo, um agente antimaníaco, um antipsicótico, um ansiolítico (Iodo 131-tositumomab), um radio sensibilizados (misonidazola, tirapazamina), um anti depressivo, um agente antimaníaco, um antipsicótico, um ansiolítico, um hipnótico, um simpático

25 mético, um estimulante, donapezil, tacrina, uma medicação para asma, um beta-agonista, um esteróide inalado, um inibidor de leucotrieno, uma metilxantina, uma cromolina, uma epinefrina ou análogo, dornase-alfa (Pulmozyme), uma citocina ou um antagonista de citocina. Esses fármacos são bem conhecidos na técnica, incluindo formulações, indicações, dosagem e administração para cada um dos apresentados aqui, neste pedido de patente (vide, por exemplo Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21<sup>st</sup> edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, ed.,

30

Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., ed., Appleton & Lange, Stamford, CT, cada um inteiramente incorporado aqui, neste pedido de patente, por referência).

5                   Tipicamente o tratamento de condições patológicas é efetuado através da administração de uma quantidade eficaz ou dosagem de pelo menos uma composição de um anticorpo anti MCP-1 que total ou em media, uma faixa a partir de pelo menos cerca de 0,01 até 500 miligramas de pelo menos um anticorpo anti MCP-1 por quilograma do paciente por dose, e de  
10 preferência a partir de pelo menos cerca de 0,1 até v 100 miligramas de anticorpo/quilograma do paciente por administração única ou múltipla, dependendo da atividade específica do conteúdo da composição. Alternativamente, a concentração eficaz no soro pode compreender de 0,1 até 5000 µg/ml de concentração no soro por administração única ou múltipla. As dosagens  
15 adequadas são conhecidas dos médicos e irão por certo depender do estado específico da doença, atividade específica da composição que está sendo administrada, e do paciente específico que está sendo submetido a tratamento. Em alguns casos, para alcançar a quantidade terapêutica desejada, pode ser necessário prover uma administração repetida, isto é, administra-  
20 ções individuais repetidas de uma dose específica monitorada ou medida, quando as administrações individuais são repetidas até que a dosagem diária ou o efeito desejado seja alcançado.

As doses de preferência podem incluir opcionalmente, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,  
25 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 e/ou 100 a 500 mg/kg/administração, ou qualquer faixa, valor ou  
30 fração dos mesmos, ou até alcançar uma concentração no soro de 0.1, 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5, 2.9, 3.0, 3.5, 3.9, 4.0, 4.5, 4.9, 5.0, 5.5, 5.9, 6.0, 6.5, 6.9, 7.0, 7.5, 7.9, 8.0, 8.5, 8.9, 9.0, 9.5, 9.9, 10, 10.5, 10.9, 11,

11.5, 11.9, 20, 12.5, 12.9, 13.0, 13.5, 13.9, 14.0, 14.5, 4.9, 5.0, 5.5., 5.9, 6.0, 6.5, 6.9, 7.0, 7.5, 7.9, 8.0, 8.5, 8.9, 9.0, 9.5, 9.9, 10, 10.5, 10.9, 11, 11.5, 11.9, 12, 12.5, 12.9, 13.0, 13.5, 13.9, 14, 14.5, 15, 15.5, 15.9, 16, 16.5, 16.9, 17, 17.5, 17.9, 18, 18.5, 18.9, 19, 19.5, 19.9, 20, 20.5, 20.9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, e/ou 5000 µg/ml de concentração no soro por administração única ou múltipla, ou qualquer faixa, valor ou fração dos mesmos.

Alternativamente, a dosagem administrada pode variar dependendo de fatores conhecidos, tais como as características farmacodinâmicas do agente específico, e o seu modo e via de administração; idade, saúde e peso do recebedor; natureza e grau dos sintomas, tipo de tratamento concorrente, frequência do tratamento e do efeito desejado. Usualmente uma dosagem do ingrediente ativo pode ser de cerca de 0,1 até 100 miligramas por quilograma de peso corporal. Ordinariamente 0,1 até 50, de preferência de 0,1 até 10 miligramas por quilograma por administração ou em forma de liberação contínua são eficazes para serem obtidos os resultados desejados.

Como um exemplo não limitativo, o tratamento de seres humanos ou de animais pode ser provido como uma dosagem de uma vez ou periódica de pelo menos um anticorpo da presente invenção de 0,1 até 100 mg/kg, tal como 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 mg/kg por dia, em pelo menos um do dia 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ou 40, ou alternativamente ou adicionalmente, pelo menos uma da semana de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, ou 52, ou alternativamente ou adicionalmente, pelo menos um de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 anos, ou qualquer combinação dos mesmos, usando doses únicas, por infusão ou repetidas.

As formas de dosagem (composição) adequadas para a admi-

nistração interna contém em geral a partir de cerca de 0,001 miligrama até cerca de 500 miligramas de ingrediente ativo por unidade ou recipiente. Nessas composições farmacêuticas o ingrediente ativo irá estar presente ordinariamente em uma quantidade de cerca de 0,5 a 99,99% em peso com base no peso total da composição.

Para a administração parenteral, o anticorpo pode ser formulado como uma solução, suspensão, emulsão, partícula, pó, ou pó liofilizado em associação, ou provido separadamente com um veículo parenteral farmacêuticamente aceitável. Os exemplos de tais veículos são a água, solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose e de 1 a 10% de albumina de soro humano. Os lipossomos e veículos não aquosos tais como os óleos fixados também podem ser usados. O veículo ou o pó liofilizado pode conter aditivos que mantenham a capacidade isotônica (como por exemplo, cloreto de sódio, manitol) e estabilidade química (por exemplo, tampões e conservantes). A formulação é esterilizada através de técnicas conhecidas ou adequadas. Os veículos farmacêuticos adequados estão descritos na edição mais recente do Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, um texto de referência padrão neste campo.

Administração Alternativa. Muitos dos modos conhecidos e desenvolvidos que podem ser usados de acordo com a presente invenção para a administração de quantidades farmacêuticamente eficazes de pelo menos um anticorpo anti MCP-1 de acordo com a presente invenção. Embora a administração pulmonar seja usada na descrição que se segue, outros modos de administração podem ser usados de acordo com a presente invenção com resultados adequados. Os anticorpos MCP-1 da presente invenção podem ser supridos em um veículo, tal como uma solução, emulsão, colóide ou suspensão, ou como um pó seco, com a utilização de uma variedade de dispositivos e métodos adequados para a administração por inalação ou outros modos descritos aqui, neste pedido de patente dentro da, ou conhecidos na técnica.

Formulação e Administração Parenteral. As formulações para a administração parenteral podem conter como excipientes comuns água ou

solução salina, polialquilenoglicóis tais como polietileno glicol, óleos de origem vegetal, naftalenos hidrogenados e os similares. As suspensões aquosas ou oleosas para injeção podem ser preparadas através da utilização de um emulsificante apropriado ou humidificador e um agente de suspensão, de acordo com métodos conhecidos. Os agentes para injeção podem ser um agente de diluição não tóxico, não administrável por via oral, tal como uma solução aquosa ou uma solução ou suspensão injetável estéril em um solvente. Como o veículo que pode ser usado ou solvente são permitidos a água, solução de Ringer, solução salina isotônica, etc., como um solvente comum, ou solvente de suspensão, pode ser usado óleo não volátil estéril. Para essas finalidades, qualquer tipo de óleo não volátil e de ácido graxo podem ser usado, incluindo óleos graxos ou ácidos graxos naturais ou sintéticos ou semi sintéticos; mono-, di, ou tri-glicerídios naturais ou sintéticos ou semi-sintéticos. A administração parenteral é conhecida na técnica e inclui, porém não está limitada a meios convencionais de injeções, um dispositivo de injeção de gás pressurizado sem agulha, ou dispositivo perfurador a laser, bem como conhecido na técnica ( como por exemplo, porém não limitados a materiais e métodos descritos na Patente U. S. 5.851.198 e Patente U. S., Nº 5.839.446 inteiramente incorporadas aqui, neste pedido de patente, por referência.

Suplemento Alternativo. A invenção também se refere à administração de pelo menos um anticorpo anti MCP-1 através de meios parenterais, subcutâneo, intramuscular, intravenoso, intra-articular, intrabronquio, intra abdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intra cavitário, intracelular, intracerebelo, intra cerebroventricular, intracólica, intracervical, intra gástrico, intra-hepático, intramiocárdico, intra-ósseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitônio, intrapleural, intraprostata, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intra-retina, intraespinhal, intra sinovial, intratorácico, intra-uterino, intravesical, intra lesão, bolus, vaginal, retal, bucal sublingual, intranasal ou transdérmico. Pelo menos uma composição de anticorpo anti MCP-1 pode ser preparada para uso para administração parenteral (subcutânea, intramuscular ou intravenosa) ou qualquer outra administração especificamente

na forma de soluções ou suspensões líquidas; para uso em administrações vaginais ou retais especificamente em forma semi-sólida tal como, porém não limitadas a, cremes e supositórios; para a administração bucal tal como, porém não limitadas na forma de comprimidos ou cápsulas; ou de modo intranasal tal como, porém não limitadas, na forma de pós, gotas nasais ou aerossóis ou determinados agentes; ou de forma transdérmica tal como, porém não limitadas a um sistema de suprimento de gel, ungüento, loção suspensão ou adesivo com aumentadores químicos tais como o sulfóxido de dimetil para tanto modificar a estrutura da pele como para aumentar a concentração do fármaco no adesivo transdérmico (Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994, inteiramente incorporados aqui, neste pedido de patente, por referência), ou com agentes oxidantes que permitam a aplicação de formulações que contenham proteínas e peptídios sobre a pele (WO 98/53847, ou aplicações de campos elétricos para a criação de trajetos de transporte transitórios tais como a iontoforese, ou aplicações de ultra som tais como a sonoforese (Patentes U. S. N°s 4,309.989 e 4.767.402 (as publicações e as patentes acima sendo inteiramente incorporadas aqui, neste pedido de patente, por referência).

Administração Pulmonar/Nasal. Para a administração pulmonar, de preferência pelo menos uma composição de anticorpo anti MCP-1 é suprida em tamanho de partícula eficaz para alcançar as vias aéreas baixas do pulmão e dos sinus. De acordo com a invenção, pelo menos um anticorpo anti MCP-1 pode ser suprido através de qualquer uma de uma variedade de dispositivos de inalação ou nasais conhecidos na técnica para administração de um agente terapêutico por inalação. Esses dispositivos capazes de depositar formulações em forma de aerossol na cavidade ou alvéolos do sinus de um paciente incluem inaladores de dose medida, nebulizadores, geradores de pó seco, pulverizadores e os similares. Outros dispositivos adequados para direcionar a administração pulmonar ou nasal de anticorpos são conhecidos na técnica. Todos esses dispositivos podem usar formulações adequadas para a administração para dispensar o anticorpo em um aerossol.

Esses aerossóis podem ser compostos tanto de soluções (ambas as aquosas e não aquosas) ou de partículas sólidas. Os inaladores de dose medida tal como o inalador de dose medida Ventolin®, usam tipicamente um gás propulsor e requerem a atuação durante a inspiração (vide, por exemplo, a

5 WO 94/16970, WO 98/35888). Os inaladores de pó seco tais como o inalador Turbuhaler® (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), Spiros® (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, e o inalador de pó Spinaler® (Fisons), usam a atuação da respiração de um pó misto (US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US

10 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, inteiramente incorporadas aqui, neste pedido de patente por referência). Nebulizadores tais como AERx® Aradigm, o nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), e o nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), as referências acima inteiramente incorporadas aqui, neste pedido de patente, por referência

15 produzem aerossóis a partir de soluções, enquanto que os inaladores de dose medida, inaladores de pó seco, etc., geram aerossóis de pequenas partículas. Esses exemplos específicos de dispositivos de inalação comercialmente disponíveis são destinados a serem representativos de dispositivos específicos adequados para a prática desta invenção, e não estão destinados a limitar o escopo da invenção. De preferência, uma composição compreendendo pelo menos um anticorpo anti MCP-1 é suprida através de um

20 inalador de pó seco ou de um pulverizador. Existem várias características desejáveis em um dispositivo de inalação para a administração de pelo menos um anticorpo da presente invenção. Por exemplo, o suprimento através

25 do dispositivo de inalação é vantajosamente confiável, reproduzível e acurado. O dispositivo de inalação pode opcionalmente suprir pequenas partículas secas, como por exemplo de menos do que 10 µm, de preferência de cerca de 1 a 5 µm para uma boa condição de respiração.

Exemplo 1: Geração de anticorpos MCP-1 específicos para exibição de fagos como um exemplo não limitativo.

30

As requerentes mostraram previamente as características terapêuticas desejadas de um anticorpo murino anti-humano MCP-1 designado

como C775 e descrito nos pedidos de patentes co-pendentes dos requerentes U.S. Serial Nº Nº 11/170453 (SEQ ID NOS: 7 e 8 daquele pedido de patente com relação a regiões variáveis de cadeia pesada e leve, respectivamente) e depósitos relacionados. O objetivo do presente esforço foi o de identificar pelo menos um anticorpo humano a partir de HuCAL GOLD®, que neutralize a atividade biológica do quimiocina humana MCP-1 e que exiba atributos similares. Os atributos do anticorpo C775, o assim desejado anticorpo anti-MCP-1 humano, foram definidos através de critérios de sucesso mostrados abaixo:

10                      Critérios de Sucesso para Pelo Menos um Anticorpo Terapêutico:

Se liga a MCP-1 humana em formato de fase sólida;

Especificidade definida como falta de ligação à 100 nM para as proteínas humanas homólogas MCP-2, 3, 4 e a Eotaxina humana 1, 2 e 3;

15                      Inibe a ligação da MCP-1 humana ao seu receptor humano C-CR2 em células T e o valor de IC50 é de menos do que para a referência Fab C775;

Inibe a quimiotaxia mediada pela MCP-1 humana das células T e o valor de IC50 é de menos do que para a referência Fab C775;

20                      Inibe a atividade mediada pela MCP-1 humana em uma segunda análise biológica (como por exemplo a mobilização de Ca<sup>2+</sup> ou a internalização do receptor induzida pela CCL-2 como um critério qualitativo sim/não, ou com potência comparável a referência Fab C775 em uma análise quantitativa;

25                      Se liga a MCP-2 humana com  $K_d < 0,5$  nM;

Se liga a MCP-1 do macaco cinomolgo com um  $K_d < 20$  nM, e de preferência  $< 10$  nM;

Inibe a MCP-1 humana natural e sintetiza quimicamente a bioatividade da MCP-1 humana com potencias comparáveis;

30                      Conserva os critérios de 1 a 8 depois do remanejamento da Fab como umas IgG com base na forma de comprimento total da IgG do C775 como um comparador.

### Sumário do processo de seleção.

Foram executadas três escolhas diferentes usando HuCAL GOLD®, e 17856 clones foram submetidos a triagem resultando em 1104 resultados primários. Finalmente 26 Fabs únicos foram identificados se ligando a MCP-1 humana sintética em ELISA. Entre esses, 7 Fabs diferentes foram selecionados com relação a afinidade por maturação, bioatividade, especificidade e ligação a MCP-1 natural de cinomolgo e humana. As afinidades dos Fabs de origem estavam na faixa de 10 até 400 nM e os valores de IC50 na análise de ligação por radioligante foram a partir de 10 até 600 nM.

### Materiais e Métodos.

As enzimas de restrição e de modificação de DNA bem como as polimerases foram adquiridas da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), New England Biolabs (Beverly, MA, USA), Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) ed MBI Fermentas (Vilnius, Lithuania). IgG de cabra anti-humano F(ab')<sub>2</sub> fragmento específico POD conjugado foi fornecido por Jacksons (West Grove, PN, USA), IgG de ovelha anti-human, Fd fragmento específico, anticorpo pelo The Binding Site (Birmingham, UK) e estreptavidina conjugada a fosfatase alcalina (qualidade ZyMAX®) por Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA). Quimiocinas recombinantes humanas, hMCP-1, 2, 3, 4 e hEotaxin 1, 2 e 3 (R&D systems) Reagents, Ligands and Antibodies: mAb 279, específico para MCP-1 humana (R&D systems); hMCP-1 sintética (Bachem); mAb de camundongo anti hCCR2 biotina (R&D systems); gama globulina humana (Jackson Immuno Research); gama globulin de camundongo (Jackson Immuno Research); biotina de controle isotipo mAb mIgG2b (R&D systems); estreptavidina-PE (BD Pharmingen); Versene (Invitrogen); PBS (Invitrogen). FCS (PAN); placas de cavidades com fundo em V (Greiner); e placas de cavidades com o fundo em U (Nunc).

### Preparação do polipeptídio MCP-1 e análogos.

Síntese de peptídio em fase sólida na forma de etapas e purificação por afinidade para prover MCP-1 humana, isolada de comprimento total, madura (76 aminoácidos) e corretamente dobrada e opcionalmente

modificada e variantes com atividade biológica como descritas no pedido de patente dos requerentes U. S. Série de Nº 60/682620 e em Kruszynski et al. 2006, J Peptide Sci. 12: 25-32 As variantes destinadas a exibir a topologia de superfície original e estrutura de esqueleto de peptídio, incluem A40S, V41I, e F43Y. A síntese química também proporcionou um método para a biotilação específica para sítio da MCP-1 humana usando o grupo epsilon-amino da lisina não envolvido na ligação ao receptor ou atividade de superfície a K69 e K75 é desordenada na estrutura (U. S. Série de Nº 60/682620 e Kruszynski et al. 2006, J Peptide Sci. 12: 334 a 360). Um espaçador hidrófilo de quatro unidades de etilenóxi (PEG<sub>4</sub>) foi inserido entre a biotina e o grupo ε-amino do resíduo de lisina. O comprimento da cadeia a partir da amida da biotina até o terminal carbonila é de 19,2 Å. O espaçador foi escolhido para aumentar a solubilidade e prover comprimento de espaçados suficiente para a ligação dos conjugados de estreptavidina. A seqüência do MCP-1 e das variantes é dada na SEQ ID NO: 1. As variantes foram determinadas para conservar a capacidade de induzir a mobilização de Ca<sup>2+</sup> em células THP-1. A MCP1 de Biotina-Lys<sup>69</sup> e biotina-Lys<sup>75</sup> foram comparadas lado a lado na triagem, consolidação e determinação de afinidade e não puderam ser observadas diferenças significativas. Usando Biacore, 35 Fabs otimizados foram analisados em MCP-1 Ile<sup>41</sup>, Lys(biotin-PEG<sub>4</sub>)<sup>69</sup> e MCP-1 Ile<sup>41</sup>, Lys(biotin-PEG<sub>4</sub>)<sup>75</sup> imobilizadas em chips de estreptavidina em paralelo. Em geral as afinidades medidas em K69 e K75 de MCP-1 foram comparáveis.

Coleção de Fago Fab. A coleção de fagemídeos é baseada sobre o conceito HuCAL® (Knappik et al., 2000) e emprega a tecnologia CysDisplay™ para a exibição do Fab da superfície do fago (Löhning, 2001). A coleção codifica aproximadamente 10<sup>10</sup> Fabs únicos mostrados em bacteriófagos M13 como fusões a uma proteína de revestimento menos, pIII. Para a seleção HuCAL GOLD® os anticorpos-fagos foram divididos em três conjuntos compreendendo genes VH máster diferentes. Além disso a coleção inteira foi usada em um conjunto (VH1 a 6). Ingresso de 2 X 10<sup>13</sup> HuCAL GOLD® de fagos foram usados em cada seleção, 4 estratégias de seleção diferentes foram aplicadas, incluindo 3 rodadas de seleção no análogo 1 da MCP-1

humana (V41I, Ile<sup>41</sup>) e análogo-2 (F43Y, Tyr<sup>43</sup>), respectivamente, e duas seleções alternadas sobre os análogos na ordem de 1 - 2 - 1 e 2 - 1 - 2.

Seleções em fase sólida. Uma alíquota de 100 µl do análogo-1 da MCP-1 humana (V41I) ou análogo 2 (F43Y) a 50 µg/ml em PBS, pH 7,4, foram diretamente revestidos em cavidades Maxisorp® (Nalgen Nunc, Rochester, NY) de um dia para o outro à 4°C. As cavidades revestidas foram lavadas e bloqueadas com MPBS a 5% (PBS, 5% de leite em pó de baixa gordura). 100 µl de fagos HuCAL GOLD® bloqueados por cavidade foram adicionados durante 2 horas em temperatura ambiente. Depois de várias etapas de lavagem, os fagos ligados foram eluídos por 100 µl 20 mM de DTT em 10 mM de Tris/HCl, pH 8,0 incubados em temperatura ambiente durante 10 minutos. O eluado foi usado para infectar TG1 de E.coli de fase média (Stratagene, Amsterdam, Holanda) e os fagemidos foram amplificados como descrito em (Krebs et al., 2001).

Seleção em Semi-solução contra o Análogo 1 (V41I) e Análogo 2 (F43Y) da MCP-1 Humana, Resultando na Neutralização das Moléculas Fab. Uma seleção em semi-solução foi realizada pela incubação de dois derivados de MCP-1 humana biotinilados, V41I, K69-PEG-biotina ou V41I, K75-PEG-biotina (SEQ ID NO: 1) com os fagos HuCAL GOLD® em solução seguida pela captura dos complexos de antígeno dos fagos em tiras de placas de microtitulação Reacti-Bind Neutravidin Coated Polystyrene (PERBIO). Para a seleção tubos de Eppendorf de 1,5 ml foram bloqueados com Chemiblocker (Chemicon International) 1:1 diluído com PBS O/N à 4°C. No dia seguinte, tiras de placas de microtitulação Reacti-Bind® NeutrAvidin® (Pierce, Rockford, IL, USA) (capacidade de ligação: 25 pmols de biotina por cavidade; PERBIO) foram enxaguadas com 2 x 300 µl de PBS, necessários para 2 etapas de pré-adsorção para a redução do número de ligantes de neutravidina. 2 x 10<sup>13</sup> de fagos da coleção HuCAL GOLD® em 100 µl de Chemiblocker (Chemicon) a 50%, 0,05% de Tween 20 (Sigma) foram adicionados por cavidade e bloqueados durante uma hora em temperatura ambiente com agitação suave. Para a segunda etapa de pré-adsorção da solução de fagos foi transferida para novas tiras de placas de microtitulação Reacti-Bind Neu-

travidin Coated Polystyrene e incubadas durante uma hora em temperatura ambiente com agitação suave. Em seguida os fagos pré-adsorvidos e os antígenos biotinilados (proporção de 3:1 de biotina para antígeno para a biotilação; 200 mM de concentração final) foram adicionados aos tubos de Eppendorf pré bloqueados e incubados durante 1 hora em temperatura ambiente em uma roda de rotação. Em paralelo outras tiras de placas de microtitulação Reacti-Bind Neutravidin Coated Polystyrene foram enxaguadas com 2 x 300 ul de PBS, bloqueadas com 300 ul de Chemiblocker diluído a 1:1 com PBS durante uma hora e lavadas 1 x com 300 µl de PBS. 100 µl por cavidade do complexo de biotina-antígeno-fago foram pipetados dentro de tiras de placas de microtitulação e incubadas durante uma hora em temperatura ambiente com agitação suave. Depois de várias etapas de lavagem, os fagos ligados foram eluídos por 100 ul de 10 mM de DTT em 10 mM de Tris/HCl, pH 8,0, incubados em temperatura ambiente durante 10 minutos. O eluado foi usado para infectar TG1 de E.coli de fase média (Stratagene, Amsterdam, Holanda) e os fagemidos foram amplificados como descrito em (Krebs et al., 2001).

Sub Clonagem e Micro Expressão de Fragmentos Fab Seleccionados. Para facilitar a expansão rápida do Fab solúvel, os insertos codificando os Fabs dos fagos HuCAL GOLD® selecionados foram sub clonados através de XbaI e EcoRI dentro do vetor de expressão pMORPH®X9\_FH. Os fragmentos de Fab contem um terminal C FLAG® (Prickett et al., 1989) e um segundo terminal C marca o 6x His-tag (Chen et al., 1994). Depois da transformação do clone isolado TG1-F a expressão e a preparação dos extratos periplásmicos contendo fragmentos de HuCal®-Fab foram realizados como descrito anteriormente (Raucehnberger et al., 2003).

A análise de ligação no formato de fase sólida no análogo 1 da MCP-1 humana (V41I) foi executada como descrita acima. Depois do bloqueio, os extratos periplásmicos foram adicionados. A detecção dos fragmentos Fab foi realizada através da incubação com IgG de cabra anti-humano, do anticorpo de fragmento específico F(ab')<sub>2</sub>.

A triagem no HMCO-1 Ve1I imobilizado biotinilado foi executada

com a utilização de pacas de 384 cavidades Reacti-Bind® NeutrAvidin® (Pierce, Rockford, IL, USA) revestidas com 20 µl de 0,5 µl/ml do análogo 1 da hMCP-1 (V41I) ou do análogo 2 (F34Y) diluídos em PBS, pH 7,4, durante 16 horas à 4°C. Depois do bloqueio com 1% de BSA em TBS, 0,05% Tween 20 (Sigma, St, Louis, MO, USA) durante 1 hora em temperatura ambiente, os extratos periplásmicos foram adicionados. A detecção dos fragmentos Fab foi realizada através da incubação com IgG de cabra anti-humano, do anticorpo de fragmento específico F(ab')<sub>2</sub>.

A triagem em fase de solução com o análogo 1 da hMCP-1 (V41I) biotinilado foi executada através do revestimento de placas de 384 cavidades Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, USA) com 20 µl de IgG de ovelha anti-humano, fragmento específico Fdm anticorpo diluído 1:1000 em PBS, pH 7,4 durante 16 horas a 4°C. Depois do bloqueio com BSA a 3% em TBS, 0,05% de Tween 20 Sigma, St, Louis, MO, USA) durante 2 horas em temperatura ambiente, os extratos periplásmicos foram adicionados. Em seguida, os fragmentos HuCAL®-Fab capturados foram permitidos que se ligassem a 0,2 µg/ml do análogo 1 da hMCP-1 (V41I) biotinilado em TBS, que foi detectado por incubação com estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina seguida pela adição do substrato fosforescente AttoPhos (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). A emissão de fluorescência a 535 nm foi registrada com uma excitação a 430 nm.

#### Análises de Bioatividade.

Cultura de células. Todas as células foram cultivadas sob condições padronizadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em uma incubadora umidificada. As células expressando a CCR2 foram cultivadas em meio padronizado. Além disso, as células THP-1 (células da leucemia monocítica aguda humana) foram cultivadas em RPMI contendo 2 mM de L-glutamina, 1,5 g/l de bicarbonato de sódio, 4,5 g/l de glicose, 10 mM HEPES e 2,0 mM de piruvato de sódio a 90%; 10% de soro fetal bovino (FBS; Vitacell RPMI 20-2001, ATCC Manassas, VA) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em uma densidade de 4 a 8 x 10<sup>5</sup> células por ml.

Análise de ligação por Radioligante. Análises de competição fo-

ram realizadas em placas de filtro Milipore Millipore, Bedford, MA).  $1 \times 10^6$  células THP-1 foram incubadas com  $^{125}\text{I}$ -MCP-1 (1 ng/ml; Perkin Elmer Life Science, Boston, MA), em conjunto com concentrações diferentes de (rh) MCP-1 recombinante humana (279-MC, R&D Systems, Minneapolis, MN) ou proteínas sintéticas. Todos os reagentes foram diluídos em tampão de ligação consistindo em RPMI Medium 1640 (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) e 0,1% BSA. A competição foi deixada continuar durante uma hora em temperatura ambiente e as cavidades foram lavadas três vezes com 150  $\mu\text{l}$ /por cavidade com tampão de lavagem (tampão de ligação + 1 M NaCl). A radioatividade nos filtros foi contada com a utilização do Wallac Wizard 1470 Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, MA). As inibições percentuais de ligação do  $^{125}\text{I}$ -MCP-1 ao CCR2 através das doses variadas tanto do MCP-1 recombinante como do sintético foram calculadas. Os valores percentuais de inibição foram em seguida importados para dentro do programa Graphpad Prism e plotados com a utilização de uma curva sigmóide de resposta a dose com uma inclinação variável e constantes de fundo = 0 e topo = 100.

Análise da Mobilização de Cálcio. A análise de mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  foi realizada em um formato de 96 cavidades com a utilização do FLEXstation®  $\text{Ca}^{2+}$  Plus Assay Kit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) seguindo o protocolo do fabricante com relação as células não aderentes e um FLEXstation® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Os valores de pico RFU foram importados para dentro do Graphpad Prism para análise.

Análise FACS da Internalização do Receptor CCR2 Induzida pela MCP-1. Depois da otimização da concentração dos ligantes ( $\text{EC}_{50}$  da MCP-1 sintética - 100 ng/ml) e do tempo de incubação (depois de 1 hora a maior parte da internalização tinha ocorrido) O  $\text{IC}_{50}$  foi determinado através da adição das concentrações diferentes de anticorpos. As células cultivadas expressando o CCR2 foram lavadas com PBS e deslocadas com Versene (Invitrogen) durante cerca de 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Todas as etapas da centrifugação das células foram a cerca de 200 Xg. As células foram lavadas duas vezes com tampão FACS (PBS/3% FACS), contadas e conferidas com rela-

ção a viabilidade (trypan blue). Placas de 96 cavidades de fundo em V (Greiner) foram enchidas com  $\sim 2,5 \times 10^5$  células em 100  $\mu$ l por cavidade e colocadas no gelo. Em uma placa de 96 cavidades de fundo em U (Nunc) os anticorpos foram diluídos em meio de cultura de células (MEME) para dar

5 cerca de 200  $\mu$ g/ml para baixo até 0,01  $\mu$ g/ml em amostras em triplicata. As concentrações diferentes dos anticorpos foram pré incubadas com uma concentração final de 100 ng/ml de MCP-1 sintética (Bachem) durante 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram ressuspensas com 100  $\mu$ l da

10 mistura pré-incubada de MCP-1/anticorpos e incubadas durante uma hora a 37°C em um incubador para a internalização do receptor. Depois da internalização as células foram lavadas com 180  $\mu$ l de tampão FACS frio e as placas tiveram que ser mantidas sobre gelo durante todas as etapas subsequentes para impedir internalização adicional. Anti-hCCR2mAb de camundongo biotinizado (R&D Systems) foi diluído em 1:10 em tampão FACS. Como

15 controle IgG2b Isotype Biotin mAb de camundongo (R&D Systems) também foi diluída em 1:10 com tampão FACS. 10  $\mu$ g/ml da concentração final de uma mistura de 1:1 de gama-globulina de humana e de camundongo (Jackson Immuno Research) foram adicionados a ambos o anti-CCR2 e mAb de controle para bloquear o receptor Fc. As células foram ressuspensas em 50  $\mu$ l de uma mistura de anti-CCR2/gama-globulina (ou n=mistura de

20 IgG2b de controle/gama globulina) e incubados durante uma hora sobre gelo. As células foram lavadas duas vezes com 180  $\mu$ l de tampão FACS, re-suspensas em 50  $\mu$ l de Streptavidina PE (BD Pharmingen) diluídos em 1:400 e incubados durante uma hora à 4°C sobre gelo no escuro. As células foram

25 lavadas duas vezes com 180  $\mu$ l de tampão FACS, re-suspensas em 100  $\mu$ l de PFA/PBS e armazenadas de um dia para o outro a 4°C para fixação (alternativamente a medição direta sem a fixação PFA é possível). Para a medição FACS as células foram re-suspensas com 200  $\mu$ l de tampão FACS e pelo menos 5000 células foram cada uma contadas.

### 30 Análises de Afinidade.

Método de titulação de equilíbrio (SET) para a Determinação de  $K_D$  e Estudos de Reatividade Cruzada Usando BioVeris. A determinação de

afinidade em solução foi basicamente executada como descrita na literatura (Friguet et al., 1985). Com a finalidade de melhorar a sensibilidade e a precisão do método DSET, ela foi transferida do clássico ELISA para a tecnologia BioVeris com base em ECL

- 5 (Haenel et al., 2005, aceito para publicação em *Analytical Biochemistry*).  
1 mg/ml de (fab)<sub>2</sub> de cabra anti-humano ou IgG de cabra anti camundongo, anticorpos de fragmento específico Fc (Jackson Immuno Research) foram marcados com w BV-tag<sup>®</sup> NHS-Ester (Bioveris Europe, Witney, Oxfordshire, UK), de acordo com as instruções do fabricante. Os experimentos foram e-  
10 xecutados em placas de microtitulação de propileno e PBS, pH 7,4 com 0,5% de BSA e 0,02% de Tween 20 como o tampão de análise. O antígeno não marcado foi diluído em 4<sup>n</sup> séries. Para a MCP-1 humana e cyno, uma faixa de concentração de 10 pM até 40 nM e para os controles de reatividade cruzada (Eotaxina e MCP-2) foi escolhida uma faixa de concentração de  
15 40 mM até 160 pM. As cavidades sem o antígeno foram usadas para a determinação dos valores *S*<sub>max</sub>. Depois da adição de 100 pM de Fab oi IgG (concentração final em 75 µl de volume final), a mistura foi incubada durante duas horas em temperatura ambiente. Em seguida uma mistura de 25 µl de Dynabeads (0,4 mg/ml M-200 Estreptavidina, DYNAL, Hamburgo) revestida  
20 com 0,25 µg/ml de MCP-1 biotinizada e anticorpo de detecção marcado com marcadores BV em uma diluição final de 1:4000 para Fab anti-humano ou de 1:2000 para a IgG anticamundongo foi adicionadas por cavidade. Depois da incubação durante 30 minutos em um agitador Eppendorf (700 rpm) em temperatura ambiente, os sinais de luminescência eletroquímica foram de-  
25 tectados com a utilização de um M-384 SÉRIES<sup>®</sup> Workstation (Bioveris Europe). Os dados foram avaliados com o software Origin 5.0 (Microcal) aplicando modelos de ajustamento customizados (para Fab: Haenel et al., aceito para publicação em *Analytical Chemistry*; para IgG: de acordo com Piheler et al., 1997).

- 30 Determinação de *K<sub>D</sub>* em Biacore sobre Antígeno Revestido Diretamente. As constantes cinéticas *k<sub>on</sub>* e *k<sub>off</sub>* foram determinadas com as diluições em série dos Fabs respectivos se ligando a MCP-1 imobilizada de for-

ma covalente com a utilização do instrumento BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Suécia). Para a imobilização covalente do antígeno foi usada a química de acoplamento de amina padrão EDC-NHS. As medições cinéticas foram feitas em PBS (135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4) em uma taxa de fluxo de 20 µl/minuto usando uma faixa de concentração de Fab a partir de 1,5 até 500 nM. O tempo de injeção para cada concentração foi de 1 minuto, seguido por 3 minutos de fase de dissociação. Para a regeneração foram usados 5 µl de 10 mM HCl. Todos os sensorgramas foram ajustados com a utilização do software de avaliação BIA 3.1 (Biacore). A determinação K<sub>D</sub> em Biacore sobre Biotin-K90 MCP-1 humano e MCP-2 cyno. A Biotin-K90 MCP-1 humana e MCP-2 cyno biotinizada foram revestidas na superfície de um chip de estreptavidina e a MCP-2 cyno foi revestida diretamente sobre chips CM5. A ligação dos Fabs foi testada com a utilização dos métodos padronizados.

Determinação de K<sub>D</sub> em Biacore no Modo de Captura de Anticorpo. Os Fabs foram capturados à 500 nM com anti-Fab (s.3.15) sobre um chip CM5 (taxa de fluxo 5 µl/minuto), uma solução de cada análogo (MCP-1, 2, 3, 4 e Eotaxina, Eotaxina-2 e -3) foi injetada. Todas as citocinas estavam isentas de veículo e usadas em uma faixa de concentração a partir de 15 até 500 nM (para os Fab de origem antes da otimização) em uma análise para a determinação de afinidade. Os sensorgramas foram analisados com a utilização do software de avaliação BIA. A determinação da afinidade em Biacore com relação a MCP-1 no modo de captura de anticorpo não foi possível com relação aos ligantes otimizados devido a que os limites de detecção do Biacore foram alcançados.

Para a análise de especificidade dos Fabs foi usada a ressonância de superfície de plasmônio (Biacore 3000, Uppsala, Suécia) usando a análise de captura. Os Fabs foram capturados e as diversas proteínas (MCP-2, 3, 4, e a Eotaxina 1, 2, e 3) foram usados como os analitos. Os chips CM5 (Biacore, Suécia) foram revestidos com de 6500 a 8000 RU de anti (fab)<sub>2</sub> (Dianovam Affipure, fragmento F(ab)<sub>2</sub> de IgG cabra anti-humano; fragmento específico F(ab)<sub>2</sub>; 10 mM de tampão de acetato, pH 4,5) em todas

as 4 células de fluxo, com a utilização de química de acoplamento de amina padrão EDC-NHS. As células de fluxo 2 - 4 foram capturadas com Fabs específicos anti-MCP-1 (20 µl de 500 nM Fab em uma taxa de fluxo de 10 µl/ml, resultou em uma densidade de captura de 300 - 400 RU). Depois da captura dos Fabs as quimiocinas foram injetadas (20 µl, taxa de fluxo 20 µl/min, PBS pH 7,4) em uma concentração de 100 nM. As quimiocinas foram armazenadas em pequenas alíquotas e somente o material descongelado de fresco com um máximo de um ciclo de congelamento descongelamento foi usado para as medições. Para evitar que uma combinação de fora de qualidade provocada pela fora de qualidade da MCP-1, a interação específica do Fab e a interação anti-Fab/Fab, foi injetado um tampão, para determinar a dissociação da interação anti-Fab/Fab. O sensorgrama conseguido pelo tampão foi subtraído do específico. As unidades de resposta foram normalizadas com relação a quantidade de captura de anticorpo sobre a superfície.

Ligação a MCP-1 natural no Modo de Captura de Anticorpo. O método foi usado como descrito acima. A MCP-1 natural foi purificada a partir do sobrenadante PANC1 e usada para a análise de ligação. A ligação à MCP-1 natural no modo de captura de Fab foi bem acima do limite de detecção, no entanto, uma medição de afinidade verdadeira não foi possível devido as impurezas no extrato obscurecendo a concentração correta da MCP-1 natural.

#### Conversão para IgG.

Com a finalidade de expressar a IgG de comprimento total, fragmentos de domínio variável (VH) e de cadeia leve (VL) foram subclonados a partir dos vetores de expressão Fab em vetores pMorph\_hlg apropriados para a IgG1 humana, IgG4 humana, IgG1 quimérica humana/camundongo e IgG2. As enzimas de restrição *EcoRI*, *MfeI*, *BlnI* foram usadas para a sub clonagem do fragmento do domínio VH em pMorph\_hlgG1.1, pMorph\_hlgG4.1, pMorph\_mlgG1.1 ou pMorph\_mlgG2a.1, e *EcoRV*, *BsWI* para a sub clonagem do fragmento do domínio VL dentro dos vetores pMorph\_hlgk\_1, pMorph\_hlgλ\_1, pMorph\_mlgk\_1 ou pMorph\_mlgλ\_1, respectivamente. Os constructos de IgG resultantes foram ex-

pressos em CNTO.

### Resultados

A seleção em fase sólida foi realizada em hMCP-1 (41I) e hMCP-1 (43Y) diretamente revestidas em placas Maxisorp. Quatro estratégias diferentes de seleção foram aplicadas, contendo três rodadas de seleção em cada uma. Depois da subclonagem dentro do vetor de expressão pMORPHx9\_Fab\_FH a triagem em fase sólida foi executada sobre a hMCP-1(41I) diretamente revestida e sobre a e hMCP-1 biotinilada. No total foram analisados 8832 clones em uma triagem primária e 983 acertos primários foram obtidos. Finalmente 5 Fabs únicos foram identificados, porém todos os 5 Fabs não neutralizaram a MCP-1 em análises celulares, indicando que o revestimento direto para Maxisorp pode prejudicar a conformação ou pelo menos a acessibilidade dos epítomos neutralizantes.

Uma seleção em semi-solução foi realizada incubando o análogo 1 da MCP-1 humana (V41I) e o análogo 2 (F43Y) com os fagos HuCAL GOLD® em solução seguida pela captura dos complexos antígeno fago como descrito. Duas estratégias principais de seleção diferentes foram aplicadas incluindo três rodadas de seleção sobre o análogo 1 e análogo 2 (F34Y) da MCP-1 humana (V41I) biotinilada respectivamente (nenhuma seleção alternada). No total 9024 clones foram analisados na triagem primária e 121 acertos primários foram obtidos, revelando finalmente 18 ligantes únicos. Uma re-triagem de 192 clones com base em Luminex para seleção no análogo 1 da MCP-1 humana (V41I) levou a 9 acertos primários adicionais e 3 ligantes únicos adicionais, mostrando que a triagem com Luminex é um método de triagem alternativa adequada para a triagem de captura. No total 21 ligantes únicos foram identificados a partir as seleção em semi-solução e 14 desses ligantes mostraram atividade de neutralização. Todos os Fabs neutralizantes a partir de HuCAL GOLD® foram derivados a partir dessa seleção.

Caracterização dos Fabs HuCAL GOLD®. Os Fabs únicos foram expressos e purificados para caracterização posterior. A afinidade de ligação da hMCP-1 foi determinada por BIAcore e os Fabs foram caracterizados nas análises que se seguem: 1) inibição de ligação de <sup>125</sup>I-CCL-2 para células

Thp-1 e 2) inibição da mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por hMCP-1 em células Thp-1. Os Fabs que demonstraram atividade de neutralização em análises baseadas em células foram ainda testados com relação a 1) ligação a hMCP-1 de cynomolgus sintética; 2) ligação a família da HMCP-2 relacionada com a ligação a quimiocinas humanas com relação a especificidade de ligação (isto é, MCP-2, 3, 4 e Eotaxina 1,2, 3); e 3) ligação a hMCP-2 humana natural para assegurar que os Fabs selecionados com a utilização do peptídeo sintético hMCP-2, reconhecem a hMCP-2 natural. Sete Fabs com as propriedades mais ótimas foram escolhidos para a maturação por afinidade adicional.

As propriedades dos Fabs selecionados com relação a maturação por afinidade foram resumidas na Tabela 2. Os sete Fabs que foram selecionados para a maturação por afinidade foram designados para 3 grupos para a clonagem da coleção e a seleção. A otimização de L-CDR3 e H-CDR2 foi executada em paralelo. A otimização em paralelo das cadeias leve e pesada variáveis criou o potencial para a combinação de cadeia leve e pesada através da clonagem cruzada para a geração de outros anticorpos ainda mais aperfeiçoados.

Tabela 2. Um resumo dos Fab candidatos selecionados para maturação por afinidade. (1ª parte)

Nomeação do Fab	Grupo	Kd MCP-1 (nM)	Ligação Radioligante IC50 (nM)	Mobilização de $\text{Ca}^{2+}$ IC50 (nM)
MOR 03336	1	$60 \pm 33$	114	526
MOR 03464	1	$75 \pm 50$	105	1340
MOR 03468	1	ND	255	2000
MOR 03470	1	$46 \pm 1$	645	2100
MOR 03471	2	$94 \pm 6$	180	1256
MOR 03473	2	$175 \pm 20$	184	2900
MOR 03548	3	42	11	124

Tabela 2. (2ª parte)

Nomeação do Fab	Especificidade	Kd Cyno [nM]	Ligação a MCP-1 natural	Grupo de seqüências Hc Lc
MOR 03336	MCP-1	170 ± 42	sim	VH3/VL -λ3
MOR 03464	MCP-1, 2	175 ± 49	sim	VH3/VL -λ3
MOR 03468	MCP-1	550 ± 14	ND	VH1B/VL -λ3
MOR 03470	MCP1	145 ± 92	sim	VH1B/VL -λ3
MOR 03471	MCP-1	465 ± 106	sim	VH1A/VL -κ3
MOR 03473	MCP-1	478 ± 95	sim	VH1A/VL -κ3
MOR 03548	MCP-1, Eo	54+ 8	sim	VH3/VL -λ3

Exemplo 2: Avaliação de alta afinidade, anticorpos específicos para MCP-1 a partir de FABS.

- Como observado, a seleção de candidatos com relação a maturação por afinidade foi executada sobre candidatos no formato de Fab livre. Os critérios de seleção foram: atividade em análise de radioligante, atividade em análise de mobilização de Ca<sup>2+</sup>, afinidade com relação a MCOp1 humana medida por Biacore, especificidade com relação a MCP-1 humana, afinidade a MCP-1 de cyno e ligação a MCP-1 natural detectada em Biacore. Os critérios adicionais para agrupamento dos Fabs de origem foram a competição C775 em ELISA e foram baseados sobre a família da estrutura da cadeia pesada e leve variável. A caracterização dos candidatos a maturação como IgG, especialmente em análises de quimiotaxia, foi executada em paralelo com os processos de seleção para maturação.
- Os sete Fabs selecionados para o processo de maturação caíram dentro de 3 classes de seqüências diferentes. Em uma classe (Grupo 1, Tabela 2) Os Fabs 03336, 03464, 03468 e 03470 tinham estrutura de cadeia leve com Vλ3 uma das duas cadeias diferentes de estrutura de cadeia pesada. Os Fabs 03336 e 03464 tinham estruturas VH3 de cadeia pesada. A segunda classe de Fabs (Grupo 2, Tabela 2), 03471 e 03473, tinham estruturas VH1A de cadeia pesada e estruturas Vκ3 de cadeia leve. O Fab 03548 tinha a mesma estrutura para a cadeia leve e para a cadeia pesada como

dois dos Fabs da primeira classe (VH3, VL3) porém foram mantidos separadamente. (Grupo 3, Tabela 2) devido a que ele tinha excepcionalmente atividade biológica potente e reatividade de ligação cruzada com a Eotaxina. Para uma descrição completa da classificação das seqüências da região variável usadas aqui, vide a Patente U.S. Nº6.828.422, inteiramente incorporada aqui, neste pedido de patente por referência. O objetivo da última mutação foi o de melhorar a afinidade do 03548 com relação a CCL-2 enquanto aumentando a especificidade.

Antes da maturação, foi somente determinada a ligação porém não a afinidade com relação a MCP-1 natural de cinomólgo e humana, no modo de captura de Fab Biacore. Todos os 7 Fabs de origem exibiram ligação a ambos, a MCP-1 cino e natural, o que é um pré-requisito para a maturação.

Especificidade de Ligação das IgG de origem. Depois da conversão de todos os 7 Fabs de origem para IgG1, os estudos de reatividade cruzada foram repetidos com relação as formas de IgG. A Eotaxina 3 se ligaram de forma não específica à superfície de dextrano dos chips sensores e essa ligação não específica pode ser completada através da adição de carboxil metil dextrano. Como a ligação não específica à superfície do dextrano de outras quimiocinas também era possível, o carboxil metil dextrano foi adicionado em todas as análises de especificidade por Biacore. Em contraste com os Fabs, duas das IgG não exibiram nenhuma ligação significativa a MCP-1 humana, de modo interessante todos os 4 ligantes finais que preencheram todos os critérios de sucesso vieram a partir de um Fab de origem.

O sinal de ligação da MCP-1 (unidades de resposta) foram normalizados através da quantidade da captura de anticorpo sobre a superfície: a proporção molar de ligação =  $(RU \text{ do antígeno ligado} / MW \text{ do antígeno}) \times (MW \text{ de mAb} / RU \text{ de mAb capturado sobre a superfície})$  e a proporção de ligação molar mais baixa do que 0,5, foi prevista como não sendo significativa. Quatro das IgG exibiram uma proporção de ligação normalizada a MCP-1  $> 0,5$  e todas as quimiocinas homólogas  $< 0,5$  e foram, por esse motivo denominadas de específicas no nível da IgG. Uma IgG também exibiu algu-

ma ligação à MCP-2 e a Eotaxina, o que já tinha sido detectado no nível do Fab, porém essa reatividade cruzada foi reduzida no nível da IgG. Os dados da IgG MOR03468 não estão mostrados.

Inibição da ligação de  $^{125}$ I MCP-1 à células THP-1 (CNTO). A neutralização da atividade dos ligantes de origem no formato IgG foi primeiro testada na análise de ligação por radioligante. Depois do bloqueio dos receptores Fc nas células THP-1 através da adição de IgG1 humana não relacionada, a inibição da ligação da MCP-1 foi detectável com relação a todas as IgG de origem. Quatro das IgG mostraram inibição de MCP-1 humana marcada com radiação para células THP-1 com valores de  $IC_{50}$  na faixa da referência IgG C775.

Inibição da mobilização de cálcio (CNTO). Todas as IgG de origem inibiram a mobilização de cálcio induzida pela MCP-1 em células THP-1. Quatro das IgG mostraram inibição da mobilização do cálcio induzida pela MCP-1 em uma concentração mais alta de anticorpos, quando comparada com a referência IgG C775.

Inibição da quimiotaxia induzida pela MCP-1 (CNTO). Como os Fabs de origem não puderam ser testados na análise de quimiotaxia, a quimiotaxia induzida pela MCP-1 foi testada no formato IgG. Todas as IgG testadas foram ativas na análise de quimiotaxia, e quatro das IgG mostraram inibição da quimiotaxia induzida pela MCP-1 em concentrações de anticorpos mais altas, quando comparada com a referência IgG C775.

Exemplo 3: Afinidade de maturação de FAB selecionado através de troca de cassetes I-CDR3H - H-CDR2

## 25 Sumário do Processo de Maturação por Afinidade

Na primeira rodada de maturação a otimização de L-CDR3 e a otimização de H-CDR2 foram executadas em paralelo. O DNA para cada classe de Fabs foi juntado para a construção da coleção de maturação. As seqüências originais de CDR2 de cadeia pesada e CDR3 de cadeia leve foram substituídas por seqüências aleatórias cada um dos DNA juntados resultando em 6 novas bibliotecas: 3 bibliotecas de H-CDR2 aleatórias e 3 bibliotecas de L-CDR3 aleatórias. A diversidade de cada uma das 6 bibliotecas foi

maior do que  $10^8$  Fabs únicas. O peptídeo sintético de CCL-2- 4I1 biotina-K69 foi usado tanto para a seleção em solução ou a seleção de peptídeo de biotina capturado em cavidades plásticas revestidas de neutravidina; Cada uma das 6 bibliotecas foi selecionada sob diversas condições para serem enriquecidas em Fabs fora de qualidade vagarosos (isto é, lavagem prolongada, concentração de antígeno reduzida). Foram realizadas 36 seleções paralelas, incluído seleção em solução e seleção em semi-solução. A redução da concentração de antígenos, seleção fora de qualidade e a lavagem prolongada resultaram em condições severas de seleção. A triagem de afinidade foi executada com o auxílio de uma plataforma de luminescência eletroquímica (ECL) Bio Veris (anteriormente IGEN), permitindo uma alta produção de classificação de afinidade e identificação das moléculas de Fab com uma afinidade aumentada.

Maturação de Bibliotecas por Afinidade. Como as bibliotecas de cadeia pesada H-CDR2 de H1A e H1B foram clonadas separadamente, 7 bibliotecas de regiões variáveis diferentes foram clonadas. As duas bibliotecas H1A e H1B foram mais parte juntadas antes da seleção dando 6 bibliotecas de seleção, os tamanhos das bibliotecas variaram a partir de  $10^8$  até  $8 \times 10^9$ . Toda a diversidade teórica foi coberta para todas as bibliotecas exceto para coleção MOR03548  $\lambda$ 3 L-CDR3, na qual ainda 0,625x da diversidade teórica foram cobertas. O controle de qualidade das bibliotecas foi executado através do seqüenciamento de clones escolhidos de forma aleatória. 71 das 75 (95%) seqüências estavam corretas e diversificadas, enquanto o deslocamento da estrutura de 4 das 75 seqüências foi detectado. Os derivados de todos os Fabs de origem foram encontrados em suas respectivas bibliotecas.

Para o aumento da afinidade e da atividade biológica dos fragmentos dos anticorpos selecionados, as regiões L-CDR3 e H-CDR2 foram otimizadas em paralelo através de mutagenese de cassete usando mutagenese direcionada a trinucleotídeo (Virnekås et al, 1994), enquanto que as regiões de estrutura foram mantidas constantes. Antes da clonagem por maturação por afinidade, todos os fragmentos dos Fab de origem foram transfe-

ridos a partir do correspondente vetor de expressão (pMORPH<sup>®</sup>X9\_FH) dentro do vetor CysDisplay<sup>™</sup> pMORPH<sup>®</sup>25\_LHC através de *XbaI/EcoRI*. O pMORPH<sup>®</sup>25\_LHC foi criado a partir do vetor de exibição pMORPH<sup>®</sup>23\_LHC de HuCAL GOLD<sup>®</sup> através da remoção de um sítio *BssHII* interferindo com a

5 clonagem da coleção para a otimização de H-CDR2. Para a otimização de L-CDR3 de um conjunto de fragmentos L-CDR3 de Fab de origem, a estrutura 4 e a região constante das cadeias leves (405 pb) do conjunto de ligantes foram removidas por *BpiI/SphI* e substituída por um repertório de L-CDR3 diversificado em conjunto com a estrutura 4 e o domínio constante. O Proje-

10 to, síntese e a clonagem desse cassete L-CDR3 serão descritos em outra ocasião (manuscrito em preparação). 5 µg do vetor do conjunto de ligantes foram ligados com um excesso molar de 3 vezes do fragmento inserto contendo o L-CDR3 diversificado. Em um conjunto de uma segunda coleção o H-CRD2 (*XhoI/BssHII*) foi diversificado, enquanto que as regiões de ligação

15 com a estrutura foram mantidas constantes. Com a finalidade de monitorar a eficácia da clonagem o H-CDR2 de origem foi substituído por um simulacro, antes que o cassete H-CRD2 diversificado fosse clonado. As misturas de ligação de 7 bibliotecas diferentes foram eletroporadas em 4 ml células TOP10F de E.coli (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), produzindo a partir de  $1 \times 10^8$  até  $8 \times 10^9$  de colônias independentes. O tamanho dessa coleção assegura a cobertura da diversidade teórica. A amplificação da coleção foi executada como descrito anteriormente (Rauchenberg et al., 2003). Para o controle de qualidade foram apanhados de forma aleatória clones isolados e se-

20 quenciados (SequiServe, Vaterstetten, Alemanha).

25 Seleção em Semi-Solução contra Biotin-K69 MCP-1 (V41I) Humana com Relação a Maturação por Afinidade.  $1 \times 10^{13}$  de fagos resgatados das bibliotecas otimizadas foram pré adsorvidos duas vezes em tiras de placas de microtitulação Reacti-Bind Neutravidin Coated Polystyrene e em seguida bloqueados com ChemiBLOCKER (Chemicon, Temecula, CA, USA).

30 Os fagos pré adsorvidos e diferentes concentrações de Biotin-K69 MCP-1 (0,02 - 20 nM) foram incubados durante 1,5 hora a 22°C em solução, seguida pela captura dos complexos de antígeno-fago em tiras de placas de mi-

crotitulação Reacti-Bind Neutravidin Coated Polystyrene (PERBIO). As etapas de lavagem a 22°C foram prolongadas em até 12 horas. A eluição por 20 mM DRR em 10 mM de Tris/HCl, pH 8,0, e a amplificação dos flagemidos entre cada rodada de seleção foram executadas como descrito acima.

- 5 Seleção em Solução contra Biotin-K69 MCP-1 (V41I) Humana com Relação a Maturação por Afinidade.  $1 \times 10^{13}$  de fagos resgatados das bibliotecas da maturação por afinidade como descrito acima, foram bloqueados com ChemiBLOCKER (Chemicon, Temecula, CA, USA), 0,05% Tween 20 (sigma, St. Louis, MO) USA) e pré-adsorvidos duas vezes em Dynabeads® M-280 Streptavidin (DynaL Biotech, Oslo, Noruega), bloqueados por ChemiBLOCKER sem o Tween 20. A redução de antígeno foi aplicada durante as três rodadas de seleção e a concentração de Biotin-K69 MCP-1 variou a partir de 0,1 até 5 nM. As Dynabeads® bloqueadas e um separador magnético de partículas, MPC-E (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) foram usados para a captura de fagos ligados ao antígeno biotinilado. As etapas de lavagem (Rauchenberger et al., 2003), e a eluição por 20 mM DRR em 10 mM de Tris/HCl, pH 8,0, e a amplificação dos flagemidos entre cada rodada de seleção foram executadas como descrito acima. Além disso, a rigorosidade da seleção foi ainda aumentada pela seleção fora de qualidade (Hawkins et al., 1992) e pelo prolongamento das etapas de lavagem (em até 6 horas).
- 10
- 15
- 20

- 3312 clones foram submetidos a triagem e 85 Fabs otimizados vindos de 4 dos 7 Fabs de origem foram identificados. Os Fabs otimizados em L-CDR3 e H-CDR2, foram identificados e a clonagem cruzada das cadeias leve e pesada melhoradas foi realizada a partir da derivatização de 2 clones de origem diferentes que levaram a um aperfeiçoamento adicional em afinidade ( $K_D$ ) de até 100 vezes. Os ligantes de maior classificação (cerca de 100 ) com um  $K_D$  calculado a  $10^{-1}$  nM foram seqüenciados levando a identificação de 41 Fabs únicos melhorados. A maioria dos ligantes melhorados foi derivada a partir do Grupo III (-3548). Uma triagem adicional foi executada nos Grupos I e II para a identificação de mais Fabs melhorados nesses grupos de maturação. Vinte e nove ligantes adicionais das classes I e II foram
- 25
- 30

identificados. No total, 87 Fabs únicos derivados a partir de cinco dos sete Fabs de origem foram identificados no processo de maturação, A Tabela 3 resume os resultados da seleção de maturação.

Tabela 3. Resumo da seleção de Fab com ligação melhorada à MCP-1.

Grupo	Clone de origem	L-CDR3 melhora- do	H-CDR2 melho- rado	
1	03336	-	14	
1	03470	-	2	
1	03464	-	1	
1	03468	-	-	
2	03471	23	1	
2	03473	-	-	
3	03548	11	35	
	Total de Fabs me- lhorados	34	63	87

5 As trocas de aminoácidos nos Fabs melhorados foram localiza-  
das tanto na H-CDR2 como na L-CDR3 dos clones de origem 03741 e  
03548. A clonagem cruzada da CDR2 da cadeia pesada mais melhorada  
com a CRD3 da melhor cadeia leve dos Fabs foi executada em seguida para  
tentar gerar Fabs com uma afinidade ainda mais alta. Aproximadamente 36  
10 clones cruzados foram gerados. Todas as seqüências dos Fabs únicos tam-  
bém foram submetidas a triagem para a previsão de sítios de glicosilação  
ligados a N. Poucos Fabs foram identificados com a seqüência de consenso  
NIS para a glicosilação em CDR2 de cadeia pesada. Esses Fabs foram ex-  
cluídos de uma caracterização adicional. Um total de 84 Fabs foram expres-  
15 sos e purificados em Morphosys e transferidos para Centocor para a carac-  
terização biológica.

O limite de sensibilidade para a medição de afinidade com a uti-  
lização do Biacore foi alcançado com os Fabs otimizados. Por esse motivo  
os valores de afinidade determinados por ECL com base em titulação de  
20 equilíbrio em solução (SET) (Haenel et al., 2004, submetido para publicação  
em *Analytical Chemistry*). Depois da maturação por afinidade, um  $K_D$  de cer-  
ca de 10 pM foi alcançado e o valor confirmado com a utilização de Kinex A,

A ligação de Fab na análise de ligação por radioligante alcançou um IC<sub>50</sub> de 110 pM. Desse modo, ambas, a afinidade de MCP-1 e a cinética da ligação aumentaram em até 100 vezes quando comparadas a dos Fab de origem. Quatro Fabs otimizados preencheram todos os 9 critérios de sucesso, 5 Dois foram Fabs otimizados L-CDR3 e dois foram clones cruzados compostos por cadeias otimizadas de L-CDR3 e H-CDR2. Todos os quatro foram convertidos para IgG e retiveram a atividade em todas as análises testadas com o melhor K<sub>D</sub> de 10 pM e o melhor IC<sub>50</sub> de 20 pM na análise de ligação por radioligante. Um clone cruzado adicional MOR03899 preencheu todos os 10 critérios de sucesso como uma IgG porém não como um Fab. Todos os ligantes que preencheram os critérios de sucesso foram derivados a partir do Fab de origem MOR03471 (SEQ ID N<sup>os</sup> 2, 4). O Fab único, MOR03790 foi escolhido para a produção de IgG, em desenvolvimento de escala de fabricação, e avaliação in vivo em modelos animais com base no MOR03471 e 15 compreendendo seqüências de regiões variáveis de cadeia pesada e leve dadas nas Tabelas 4D e nas SEQ.ID. NOS: 6, 7, 9, 13, 14 e 16.

Triagem por Bioveris Durante a Maturação por Afinidade. Clones de Fabs com a afinidade melhorada foram identificados através uma análise BioVeris de uma triagem de afinidade de alta produção com base em ECL. 20 Depois dessa seleção quatro sub clones foram consolidados pelo mesmo método.

Estratégias de Seleção Para maturação por afinidade. No total foram executadas 36 seleções diferentes. 18 seleções em solução contra biotin-K69 MCP-1 (V41I) com a captura de complexos de fago-antígeno em 25 contas de Estreptavidina. A rigorosidade durante o processo de seleção foi aumentada pela redução da concentração de antígenos, seleção fora da qualidade e lavagem prolongada. Além disso, foram executadas 18 seleções em semi-solução contra biotin-K69 MCP-1, capturando complexos de fago-antígeno para placas de Neutravidin. Nessas seleções, a rigorosidade foi 30 aumentada pela redução da concentração de antígenos e lavagem longa.

Triagem por BioVeris para maturação por afinidade. O antígeno biotin-K69 MCP-1 41I foi usado as seleção de maturação e também para a

triagem com base no BioVeris. A triagem funcionou de forma muito eficiente com relação a identificação dos ligantes aperfeiçoados. Para cada uma das 36 condições de seleção 92 clones foram submetidos a triagem, resultando em 3312 clones triados. No total, 85 ligantes únicos diferentes otimizados foram identificados. Foram encontrados Fabs otimizados em todos os 3 grupos. Além desses, Fabs otimizados em L-CDR3 e H-CDR2 puderam ser identificados, tornando possível a clonagem cruzada com relação aos Fabs designados como os derivados de MOR03471 e MOR03548. 46 Fabs otimizados derivados a partir do MOR03548 vieram da otimização da H-CDR2 exibindo uma afinidade e atividade mais altas comparados com os 11 Fabs otimizados L-CDR3. Porém também a MOR03471 de origem foi otimizada com muito sucesso nessa maturação com 23 Fabs otimizados em L-CDR3 e um em H-CDR2. Fabs melhorados derivaram a partir de 4 entre os 7 Fabs de origem, indicando que cada ligante de origem tem um potencial diferente para serem otimizados. Finalmente 4 Fabs preenchendo todos os critérios de sucesso derivaram de MOR03471, somente dois otimizados em L-CDR3 e dois a partir de clonagem cruzada otimizados em L-CDR2 e H-CDR2.

Clonagem Cruzada das Moléculas de Fabs Otimizados. A estrutura modular da tecnologia HuCAL<sup>®</sup> permite uma rápida clonagem cruzada de cadeias leves e pesadas otimizadas de Fabs derivados a partir do mesmo clone de origem simplesmente pela combinação das duas cadeia otimizadas em uma etapa de clonagem. A clonagem cruzada é um método rápido com o potencial para conseguir anticorpos melhorados adicionais sem uma rodada adicional de maturação. Por um lado 2 derivados de L-CDR3 de MOR03548 otimizados foram clonados de forma cruzada com 6 H-CDR2 de MOR03548 otimizados levando a 12 clones cruzados. Por outro lado, 22 L-CDR3 de MOR03471 otimizados foram clonados de forma cruzada com um clone disponível de H-CDR3 de MOR03471 otimizado. Neste projeto a clonagem cruzada executada com sucesso levando à dois clones cruzados de diferentes derivados de MOR03471, MOR03850 e MOR03878, que finalmente satisfizeram a todos os critérios de sucesso.

Caracterização Detalhada de 16 Anticorpos Pré-selecionados

85 Fabs otimizados identificados a partir de triagem por afinidade e 34 clones cruzados adicionais (vide acima) resultaram em um total de 110 Fabs únicos otimizados diferentes, que não foram todos caracterizados através de todas as análises disponíveis. Por esse motivo, 16 Fabs otimizados foram pré-selecionados de acordo como seu IC50 em inibição de ligação por radioligante, a atividade na análise de liberação de cálcio, a falta de sítios de N-glicosilação nas CDR (Tabelas 4A e B) e a afinidade. A caracterização mais detalhada inclui o teste de especificidade, a ligação a e a neutralização da MCP-1 natural, a afinidade a MCP-1 humana e de cyno, a atividade na análise de quimiotaxia e a caracterização de todas as GiG1 convertidas.

Os clones representando os Fabs otimizados estão representados pelas seqüências dadas nas Tabelas de 4A a C, nas quais o Fab de origem do clone MOR03471 tem estruturas VH3 x 3 kapa e o MOR03548 tem as estruturas VH1A x lambda 3. Os 17 Fabs selecionados com atributos físico-químicos desejáveis (nenhum sítio de N-glicosilação nas CDR) e propriedades otimizadas de afinidade e de bioatividade, exibem determinadas seqüências alternadas únicas de CDR e seqüências de consenso representativas entre as seqüências HC-CDR2 e LC CDR3 dentro das estruturas usadas (VH3 e VH1A) bem como, mais geralmente, um consenso entre todas as HC-CDR1. Essas seqüências de consenso estão mostradas nas Tabelas de 4C a 4E e nas SEQ ID NOS: 2 a 26.

Tabela 4A: Seqüências CDR de cadeia Pesada de 17 ligantes selecionados

Origem	MOR #	VH Tipo	HCDR1	HCDR2	HCDR3
MOR03471 derivado (L-CDR3)	3781	VH1A	GGTFSSY-GIS	WMGGIIPFG-TANYAQKFQG	YDGIY-GELDF
MOR03471 derivado (L-CDR3)	3790	VH1A	GGTFSSY-GIS	WMGGIIPFG-TANYAQKFQG	YDGIY-GELDF
MOR03471 derivado (L-CDR3)	3791	VH1A	GGTFSSY-GIS	WMGGIIPFG-TANYAQKFQG	YDGIY-GELDF

Origem	MOR #	VH Tipo	HCDR1	HCDR2	HCDR3
MOR03471 x clone (3822x3797)	3849	VH1A	GGTFSSY- GIS	WMGAINPLAGH- THYAQKFQG	YDGIY- GELDF
MOR03471 x clone (3822x3819)	3850	VH1A	GGTFSSY- GIS	WMGAINPLAGH- THYAQKFQG	YDGIY- GELDF
MOR03471 x clone (3822x3794)	3878	VH1A	GGTFSSY- GIS	WMGAINPLAGH- THYAQKFQG	YDGIY- GELDF
MOR03471 x clone (3822x3788)	3885	VH1A	GGTFSSY- GIS	WMGAINPLAGH- THYAQKFQG	YDGIY- GELDF
MOR03471 x clone (3822x3876)	3899	VH1A	GGTFSSY- GIS	WMGAINPLAGH- THYAQKFQG	YDGIY- GELDF
MOR03548 de- rivado (L-CDR3)	3744	VH3	GFT- FRSYGMS	WVS- NIRSDGSYTY- YADSVKG	FEFTPW TYFDF
MOR03548 de- rivado e (L- CDR3)	3747	VH3	GFT- FRSYGMS	WVS- NIRSDGSYTY- YADSVKG	FEFTPW TYFDF
MOR03548 de- rivado (H-CDR2)	3753	VH3	GFT- FRSYGMS	WVSSI- EHKWSGYTTS- YAASVKG	FEFTPW TYFDF
MOR03548 de- rivado (H-CDR2)	3754	VH3	GFT- FRSYGMS	WVSSI- EHKWSGYATT- YAASVKG	FEFTPW TYFDF
MOR03548 de- rivado (H-CDR2)	3755	VH3	GFT- FRSYGMS	WVSSI- EHKWSGYATG- YAASVKG	FEFTPW TYFDF
MOR03548 de- rivado (H-CDR2)	3757	VH3	GFT- FRSYGMS	WVSSIEHKWTN- YATSYAASVKG	FEFTPW TYFDF
MOR03548 de- rivado e (H- CDR2)	3758	VH3	GFT- FRSYGMS	WVSSIEHKWTG- YATSYAASVKG	FEFTPW TYFDF

Origem	MOR #	VH Tipo	HCDR1	HCDR2	HCDR3
MOR03548 derivado e (H-CDR2)	3832	VH3	GFT-FRSYGMS	WVSSIEHKWSN-YATSYAAGVKG	FEFTPW TYFDF
MOR03548 derivado e (H-CDR2)	3836	VH3	GFT-FRSYGMS	WVSSI-EHKWSGYATG-YAASVKG	FEFTPW TYFDF

Tabela 4B: Sequências CDR de Cadeia Leve de 17 ligantes selecionados

De origem	MOR #	VL Tipo	LCDR1	LCDR2	LCDR3
MOR03471 derivado (L-CDR3)	3781	VL-□3	RASQSVS-DAYLA	LLIYDASSRAT	HQYI-ELWSF
MOR03471 derivado (L-CDR3)	3790	VL-□3	RASQSVS-DAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIQ-LHSF
MOR03471 derivado e (L-CDR3)	3791	VL-□3	RASQSVS-DAYLA	LLIYDASSRAT	QQYI-DISPM
MOR03471 x clone (3822x3797)	3849	VL-□3	RASQSVS-DAYLA	LLIYDASSRAT	QQYI-SHPQ
MOR03471 x clone (3822x3819)	3850	VL-□3	RASQSVS-DAYLA	LLIYDASSRAT	QQ-YITYPPF
MOR03471 x clone (3822x3794)	3878	VL-□3	RASQSVS-DAYLA	LLIYDASSRAT	QQ-YISFPA
MOR03471 x clone (3822x3788)	3885	VL-□3	RASQSVS-DAYLA	LLIYDASSRAT	QQ-YISQPV
MOR03471 x clone (3822x3876)	3899	VL-□3	RASQSVS-DAYLA	LLIYDASSRAT	HQ-YIFYPN
MOR03548 derivado (L-CDR3)	3744	VL-□3	SGDN-LGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QTY-DRFSS-TA

De origem	MOR #	VL Tipo	LCDR1	LCDR2	LCDR3
MOR03548 derivado (L-CDR3)	3747	VL-□3	SGDN-LGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSY-DRFSST G
MOR03548 derivado (H-CDR2)	3753	VL-□3	SGDN-LGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSY-TAQS-SAS
MOR03548 derivado (H-CDR2)	3754	VL-□3	SGDN-LGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSY-TAQS-SAS
MOR03548 derivado (H-CDR2)	3755	VL-□3	SGDN-LGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSY-TAQS-SAS
MOR03548 derivado (H-CDR2)	3757	VL-□3	SGDN-LGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSY-TAQS-SAS
MOR03548 derivado (H-CDR2)	3758	VL-□3	SGDN-LGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSY-TAQS-SAS
MOR03548 derivado (H-CDR2)	3832	VL-□3	SGDN-LGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSY-TAQS-SAS
MOR03548 derivado (H-CDR2)	3836	VL-□3	SGDN-LGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSY-TAQS-SAS

Tabela 4C: Sequências de consenso para Regiões V anti MCP-1 (1ª parte)

SEQ ID NO:	Região wW	FR1	CDR1	FR2
2	VH1A	qvElvqsgae vkkpgssvkv sckas	GGTFSSY- GIS	wvrqapgggle
3	VH3	QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS	GFT- FRSYGMS	WVRQAPGK- GLE
4	Kapa3	DIVLTQSPAT LSLSP- GERAT LSC	RASQSVS- DAYLA	WYQQKPG- QAPR
5	Lambda3	DIELTQPPSV SVAPGQTARI SC	SGDN- LGKKYV Y	WYQQKPG- QAPV

Tabela 4C: (2ª parte)

SEQ ID NO:	CDR2	FR3	CDR3	FR4
2	WMGXIXPXXG XXXYAQKFQG	rvtitadest stay- melssl rsedtavyy ar	ydgiygeldf	wgqgtlvtvss
3	WVSNIRSDGS YTTYADSVKG	RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC AR	FEFTPWTYF DF	WGQG- TLVTVSS
4	LLIYDASSRAT	GVPARFSGSG SGTDFTLTIS S- LEPEDFAVY YC	XQYIXXXX	FTFGQGT KVEIK
5	LVIYDDDNRPS	GIPERFSGSN SGNTATLTIS GTQAEDEADY YC	QXYXXXSS XX	FGGGT- KLTVL

Tabela 4D: CDR únicos anti-MCP-1

Região V	CDR	SEQ ID NO:	Designação do Fab	SEQÜÊNCIA
VH1A	CDR1	6	Todo MOR03471	GGTFSSYGIS
VH1A	CDR2	7	3781, 3790, CNTO 888	WMGGIIPFGTAN- YAQKFQG
VH1A	CDR2	8	3899	WMGAINPLAGHTH- YAQKFQG
VH1A	CDR3	9	Todo MOR03471	ydgiygeldf
VH3	CDR1	10	Todo MOR03548	GFTFRSYGMS
VH3	CDR2	11	3744, 3747	WVSNIRSDGS YTY- YADSVKG
VH3	CDR3	12	Todo MOR03548	FEFTPWTYFD F
Kapa3	CDR1	13	Todo MOR03471	RASQSVSDAYLA
Kapa3	CDR2	14	Todo MOR03471	LLIYDASSRA T
Kapa3	CDR3	15	3781	HQYIELWSF
Kapa3	CDR3	16	3790, CNTO888	HQYIQLHSF
Kapa3	CDR3	17	3899	HQYIFYPN
Lambda3	CDR1	18	Todo MOR03548	SGDNLGKKYV Y

Região V	CDR	SEQ ID NO:	Designação do Fab	SEQÜÊNCIA
Lambda3	CDR2	19	Todo MOR03548	LVIYDDDNRP S
Lambda3	CDR3	20	3744	QTYDRFSSTA
Lambda3	CDR3	21	3747	QSYDRFSSTG

Tabela 4E: Seqüências de Consenso das Regiões CDR Anti-MCP-1.

CDR	SEQ ID NO:	SEQÜÊNCIA	VARIANTES
VH1A- CDR2	22	WMGXIXPXXG XXXYAQKFQG	X4 = A, G X6 = I, N X8 = I, L X9 = A, F X11 = H, T X12 = A, T X13 = H, N
VH3- CDR2	23	WVSSIEHKWX XYXTXYAAXV KG	X10 = S, T X11 = G, N X13 = A, T X15 = G, S, T X19 = G, S
Lk- CDR3	24	XQYIXXXX	X1 = H, Q X5 = D, E, F, Q, S, T X6 = Q, L, I, H, T, F X7 = W, H, S, P X8 = A, N, Q, V, P-F, P-M, S-F
LA- CDR3	25	QXYXXXSSXX	X2 = S, T X4 = D, T X5 = A, R X6 = F, Q X9 = A, T X10 = A, G, S
HC- CDR1	26	GXTFXSYGXS	X2 = F, G X5 = S, R X9 = I, M

Tabela 5: Sumário da Afinidade dos anticorpos selecionados. (1ª parte)

KD [nM]	MOR3757	MOR3781	MOR3790
Fab BioVeris rh MCP-1 n=2	0,008/0,02	$0,03 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
Fab BioVeris cyno MCP-1 n=2	0,01/0,07	0,004/0,01	$0,06 \pm 0,02$
Fab KinexA bt-K69 h MCP-1 (CNTO)	0,0067	0,0089	0,075
IgG1 BioVeris rh MCP-1 n=2	ND	0,02	$0,07 \pm 0,03$ n=3
IgG1 BioVeris cyno MCP-1 n=2	ND	$0,016 \pm 0,008$	$0,06 \pm 0,01$ n=3

Tabela 5: (2ª parte)

KD [nM]	MOR3850	MOR3878	MOR3899
Fab BioVeris rh MCP-1 n=2	$0,04 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,14$	$0,81 \pm 0,18$
Fab BioVeris cyno MCP-1 n=2	0,04	$0,32 \pm 0,04$	$0,49 \pm 0,04$
Fab KinexA bt-K69 h MCP-1 (CNTO)	0,02	ND	ND
IgG1 BioVeris rh MCP-1 n=2	$0,011 \pm 0,005$ n=3	$0,27 \pm 0,06$	$0,34 \pm 0,05$
IgG1 BioVeris cyno MCP-1 n=2	$0,021 \pm 0,015$ n=3	$0,23 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,06$

Ligação a MCP-1 nativa medida por Biacore. Ligação a MCP-1 nativa foi testada no modo de captura Biacore Fab e todos Fabs selecionados mostraram ligação a MCP-1 nativa. Especialmente se os limites de detecção para determinação de  $K_D$  forem alcançados com Fabs otimizados, métodos alternativos para determinação de afinidade e verificação de especificidade tiveram que ser usados.

Conversões de IgG. Todos os Fabs otimizados selecionados para caracterização detalhada foram convertidos no formato IgG1, além disso, 4 Fabs foram sub-clonados no formato IgG4. Os dados de expressão e a atividade em diferentes análises do IgG4 humano testado foram tão bons quanto os respectivos IgG1.

Titulação de Equilíbrio de Solução usando BioVeris. Como um método alternativo para determinações de  $K_D$  sensível, a titulação de equilíbrio de solução (SET) usando tecnologia BioVeris foi realizada. Constantes de dissociação monovalentes foram calculadas através de modelos de ajuste apropriados para Fab e IgG. Este método foi adequado para medida de afinidade e estudos de reatividade cruzada. Todos os 16 ligandos selecionados foram analisados através da titulação de equilíbrio de solução (SET) usando BioVeris (Tabelas 5 e 6) e estes valores de afinidade foram com relação aos valores de afinidades finais. Vários ligandos incluindo MOR03757, MOR03781, MOR03790, MOR03850, MOR03878 como Fab e IgG e MOR03899 como IgG preencheram os critérios de sucesso de afinidade contra MCP-1 humano sendo  $< 0,5$  nM e ciano MCP-1 sendo  $< 20$  nM. Melhores afinidades para MCP-1 humano foram 20 a 40 pM no nível do Fab e 10 a 20 pM no nível de IgG (Tabela 5). Melhores afinidades para MCP-1 cinomólogo foram 10 a 40 pM no nível de Fab e 20 pM no nível de IgG (Tabela 6).

Testes de especificidade usando BioVeris. Além da afinidade, também a especificidade, especialmente a reatividade cruzada à Eotaxina e MCP-2 foi analisada na titulação de equilíbrio de solução (SET) usando BioVeris. Nenhuma reatividade cruzada à MCP-2 humana foi detectável para qualquer dos selecionados 16 Fabs e 15 IgG testadas (uma das IgG selecionadas não estava disponível). Da mesma forma como a MCP-1 humana, a

MCP-2 humana se liga principalmente ao receptor CCR2, enquanto que a Eotaxina humana se liga predominantemente ao receptor CCR3. Nenhuma reatividade cruzada a Eotaxina humana foi detectável com relação aos Fab e IgG MOR03744, MOR03747, MOR03790 e MOR03781 em BioVeris, enquanto  
 5 que 12 ligantes selecionados incluindo o MOR03850 exibiram alguma reatividade cruzada á Eotaxina no formato Fab ou IgG (dados não mostrados).

Especificidade de Anticorpos Otimizados no Modo de Captura de Anticorpo Biacore (CNTO). A avaliação da especificidade foi executada com IgG selecionadas. Em Biacore 100 nM de MCP-1, MCP-2, 3, 4 humana e  
 10 Eotaxina 1, 2 e 3 humana foram adicionados aos anticorpos otimizados capturados. As IgG MOR03790, MOR03791, MOR03747, MOR03850, MOR03744, MOR03849, MOR03878, MOR03885, MOR3899 e MOR03781 não mostraram um sinal significativo de ligação as quimiocinas homólogas e satisfizeram os critérios de sucesso de especificidade (Tabela 6).

A ligação de Fabs á MCP-2 não inibe a ligação de  $^{125}\text{I}$  MCP-2 a células Thp-1 (CNTO). Para analisar a atividade de ligação do Fab à MCP-2 e a Eotaxina detectada em Biacore transladada para atividade de neutralização, foram desenvolvidas análises de ligação de radioligante a célula inteira no Centocor. As  $^{125}\text{I}$  MCP-2 mostraram uma bela ligação as células Thp-1 e  
 20 a ligação foi inibida através da adição de MCP-2 não marcada, porém não pela adição do anticorpo de referência específico para MCP-1 C775. Os resultados proporcionaram uma análise funcional importante para testar a especificidade de ligação/neutralização. 1 ng/ml de MCP-1 foi usado em uma análise de ligação ao receptor, enquanto que cerca de 100 ng/ml de MCP-2  
 25 foram necessários nessa análise, na medida em que a marcação de MCP-2 pode ter ocasionado uma perda em atividade. O MOR03754 não exibiu uma inibição significativa da ligação do MCP-2 marcada com  $^{125}\text{I}$  ao receptor CCR2 nas células Thp-1 ( $\text{IC}_{50} \geq 2 \mu\text{M}$ ).

Os Fabs Amadurecidos Inibem de Forma Potente a ligação de  
 30  $^{125}\text{I}$  MCP-1 a Células Thp-1. Devido a baixa quantidade necessária de 2 ng/ml, esta análise foi a análise mais sensível neste projeto com um limite de  $\text{IC}_{50}$  de análise de cerca de 100 pM para o Fab e mesmo de 20 pM para a

IgG. (Tabela 5). Depois da otimização dos Fabs tinham que inibir a ligação da MCP-1 humana ao seu receptor CCR2 humano nas células Thp-1 com um  $IC_{50}$  abaixo do Fab C775 de referência. O Fab de origem do MOR03471 mostrou um  $IC_{50}$  de 180 nM e os derivados do Fab otimizado MOR03471 (MOR03781 com 180 pM, MOR03790 com 260 pM, MOR03850 com 160 pM, MOR03878 com 110 pM e MOR03899 com 130 pM) exibiram um melhoramento total de atividade durante a otimização de até um fator de 1000 x. Embora esta análise foi a bioanálise mais sensível disponível neste projeto, mesmo nesta análise os ligantes otimizados pareceram ter chegado aos limites de análise.

As IgG Amadurecidas Inibem de Forma Potente a ligação de  $1^{125}$  MCP-1 a Células Thp-1. O bloqueio dos sítios de ligação do receptor Fx pela adição de IgG humana não relacionada foi importante para as análises de ligação por radioligante e de mobilização de cálcio. Todas as IgG testadas conservaram a atividade na análise de ligação por radioligante. O valor de  $IC_{50}$  do MOR03781 otimizado foi de 20 pM, 30 pM para MOR03790, 50 pM para MOR03850, 30 pM para MOR03878 e 50 pM para MOR03899. Inibição do Desenvolvimento da Análise FACS da Internalização do Receptor CCR2 induzida pela MCP-1. As análises se internalização do receptor foram realizadas com a utilização de células expressando CCR-2 que exibiram uma expressão de CCR-2 mais alta do que as células THP-1, levando a um melhor sinal com relação a proporção de ruído. Primeiro a MCP-1 humana sintética foi titulada na análise para determinar o valor de  $EC_{50}$ . O valor de  $EC_{50}$  para a MCP-1 foi encontrado como sendo de 116 ng/ml. Por esse motivo, 100 ng/ml (~11 nM) para a MCP-1 foi escolhido para outras análises FACS. Além disso, o tempo de incubação ótimo para ser obtida a internalização completa foi avaliado a 37°C. A maioria da internalização ocorreu dentro dos primeiros 30 minutos. Por essa razão, um tempo de incubação de 1 hora foi usado em todas as análises que se seguiram. A análise foi desenvolvida com sucesso para permitir uma determinação de  $IC_{50}$ . A atividade e a classificação d entre 0,001 até 200 ug/ml de Fab ou IgG usados para a inibição da internalização do receptor induzida pela MCP-1 foi medida. Os ligantes oti-

mizados selecionados exibiram uma boa inibição as internalização do receptor induzida pela MCP-1 (dados não mostrados). Dois lotes diferentes de Fabs foram testados em paralelo com uma capacidade de reprodução demonstrada.

5                    Para a análise de internalização com a utilização de Fabs, um  $IC_{50}$  de 5 nM para MOR03790, 4 nM para MOR03850, 7 nM para MOR03781, 5,3 nM para MOR03878 e 3.3 nM para MOR03899 (Tabela 6). A IgG1 de MOR03781 também mostrou 7 nM, indicando que a atividade foi conservada depois da conversão da IgG.

10                   Mobilização da Inibição de Cálcio (CNTO). A MCP-1 induz a mobilização de cálcio nas células THP-1 que pode ser detectada com o auxílio de um fluorforo. Os anticorpos otimizados exibiram uma inibição potente da mobilização de cálcio os 4 candidatos finais MOR03781, MOR03790, MOR03850 e MOR03878 Fab exibiram valores de  $IC_{50}$  a partir de 18 até 28  
15 nM. As respectivas IgG de nosso conservaram a atividade e exibiram valores de  $IC_{50}$  ainda ligeiramente melhores a partir de cerca de 6 até 10 nM devido a capacidade das mesmas de neutralizar 2 moléculas de MCP-1 por IgG. De novo os limites da análise pareceram ser alcançados à cerca de 10 nM.

A inibição da MCP-1 natural Induziu a Mobilização de Cálcio. A  
20 MCP-1 natural foi purificada a partir do sobrenadante PANCRI e usada para a indução da liberação de cálcio. Os Fabs otimizados exibiram a inibição da mobilização de cálcio induzida pela MCP-1 natural com uma atividade mais elevada quando comparada ao anticorpo de referência C775. De novo os limites da análise pareceram ser alcançados à cerca de 10 até 20 nM da  
25 MCP-1 natural.

Inibição da quimiotaxia. Devido aos efeitos potenciais não específico, os Fabs de origem não puderam ser testados na análise de quimiotaxia., porém depois da maturação, todos os Fabs otimizados testados inibiram especificamente a quimiotaxia o que pode ser devido a atividade au-  
30 mentada. Todas as IgG otimizadas testadas foram ativas na análise de quimiotaxia. Como a análise foi semi quantitativa, nenhum dos valores de  $IC_{50}$  apropriados pode ser determinado.

Competição de Ligação com Referência ao Anticorpo C775. Todos os MOR03548 pré-selecionados derivados de Fabs inibiram completamente a ligação do C775 à MCP-1 em um formato de competição em fase sólida. Todos os 7 MOR03548 pré-selecionados derivados de Fabs exibiram uma competição parcial ( ~ 60%) nesta análise.

#### Sumário dos Dados.

Tabela 6: Perfis de Abs Que Satisfazem os Critérios de Sucesso. (1ª parte)

	Referência	MOR3790k	MOR3850k
Critérios de Sucesso	Fab IgG	Fab IgG	Fab IgG
# 1, 6 MCP-1 Kd<0.5 nM IGEN	65, -	0,12, 0,07	0,04, 0,01
# 2 MCP-1 especificidade BIAcore (IgG)	Nenhuma, Nenhuma	(MCP-2/Eo), Nenhuma	(MCP-2/Eo), Nenhuma
# 3 Inibição 125I MCP-1 IC50< C775	35,6, 25,6	0,26, 0,03	0,16, 0,05
# 4 Inibição da quimiotaxia	Sim, sim	sim, ND	sim, ND
# 5 Inibição da mobilização de Ca <sup>2+</sup> IC50 < C775	71,5, 62,3	25,02, 4,26	28,42, 9,47
# 7 Cyno MCP-1 Kd <10 nM	ND, ND	0,06, 0,06	0,04, 0,01
# 8 Inibição de Ca <sup>2+</sup> Induzida pela MCP-1 Natural	Sim, ND	Sim, ND	Sim, ND
Medição prolongada-1 competição C775	Sim, Sim	parcial, ND	parcial, ND
Medição prolongada-t-2 Inibição da internalização de CCR2	65, ND	5, ND	4, ND

Tabela 6: (2ª parte)

	MOR3781k	MOR3878k	MOR3899k
Critérios de Sucesso	Fab IgG	Fab IgG	Fab IgG
# 1, 6 MCP-1 Kd<0.5 nM IGEN	0,03, 0,02	0,32 0,27	(0,81) 0,34
# 2 MCP-1 especificidade BIAcore (IgG)	(MCP-2/Eo), Nenhuma	(MCP-2/Eo), Nenhuma	(MCP-2/Eo), Nenhuma
# 3 Inibição 125I MCP-1 IC50< C775	0,18, 0,02	0,11, 0,03	0,13, 0,05
# 4 Inibição da quimiotaxia	sim, ND	sim, ND	sim, ND
# 5 Inibição da mobilização de Ca <sup>2+</sup> IC50 < C775	21,8, 10,9	20,24, 6,7	17,54, 5,85
# 7 Cyno MCP-1 Kd <10 nM	0,01, 0,02	0,32, 0,23	0,49, 0,36
# 8 Inibição de Ca <sup>2+</sup> Induzida pela MCP-1 Natural	Sim, ND	Sim, ND	Sim, ND
Medição prolongada-1 competição C775	parcial, ND	parcial, ND	parcial, ND
Medição prolongada-t-2 Inibição da internalização de CCR2	7, 7	5,3, ND	3,3, ND

Exemplo 4: Seleção de Candidatos Terapêuticos

Seleção e geração do candidato terapêutico final, CNT0888.

- Dois dos mAbs, 3781 e 3790, que são diferentes somente em suas seqüências de cadeia leve CDR3 (Tabelas 4C e D, SEQ ID NOS: 15 e 16) demonstraram atividades biológicas quase idênticas nas análises. A aná-

lise de capacidade de geração de imunização *in silico* foi realizada para a identificação de potenciais peptídios de ligação da classe HLA II e para determinar se os candidatos eram significativamente diferentes em termos de epítopos de ligação HLA. A análise previu que o mAb 3790 apresentar um potencial mais baixo com relação a capacidade de geração de imunização do que o mAb 3781. Com base nisso e nas outras análises bioquímicas e biológicas mostradas na Tabela 6, o 3790 compreendendo as regiões de estrutura de cadeia pesada VH1A (SEQ ID NO: 2) e as regiões CDR da cadeia pesada, SEQ ID NOS: 6,7 e 9 e a estrutura kapa 3 da cadeia leve (SEQ ID NO; 4) e as regiões CDR, SEQ ID NOS: 13, 14 e 16, foram selecionados para os mAb terapêuticos finais.

A seqüência do terminal N do mAb 3709 determinou variações a partir das seqüências da linha de germe humana, devido as mudanças de aminoácido introduzidas durante a clonagem. Além, disso, os códons de aminoácido (isto é, a seqüência de DNA) tiveram a propensão de expressão máxima em células procarióticas bacterianas. O DNA Mab foi ressintetizado para a correção do alinhamento imperfeito do terminal N com relação a seqüência da linha de germe e para a mudança do viés do códon para aqueles favorecidos em proteínas humanas altamente expressas. A seqüência modificada do mAb 3790 é designada como CNTO 888 compreendendo as seqüências das regiões variáveis de seqüência pesada e de seqüência leve das SEQ ID NOS: 27 e 28 respectivamente e abaixo (com as CDR sublinhadas) nas quais os resíduos do terminal N da cadeia pesada são QVQ (Gln-Val-Gln) e ou da cadeia leve são EIV (Glu-Ile-Val).

Seqüência variável da cadeia pesada CNTO888 (SEQ ID NO: 27)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMG  
 GIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDGI  
 YGELDFWGQGTLVTVSS

Seqüência variável da cadeia leve CNTO888 (SEQ ID NO: 28)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSDAYLAWYQQKPGQAPRLLIYD  
 ASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCHQYIQLHSFTFGQ  
 GTKVEIK

Caracterização bioquímica e biofísica da CNTO888. A CNTO888 é um anticorpo totalmente humano IgG kapa. Não existe na seqüência a previsão para sítios de glicosilação ligados a N. As propriedades bioquímicas e biofísicas da CNTO888 (transitoriamente expressas em células HEK293 e purificadas através de cromatografia de afinidade de proteína A) foram caracterizadas em SDS-PAGE, cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), espectro de massa (MS) e BIAcore, com relação a afinidade de ligação ( $K_D$ ) e especificidade. No SDS-PAGE, a CNTO888 natural migra como uma faixa única à aproximadamente 150 kDa. A IgG reduzida/alquilada migra como duas faixas a aproximadamente 60 kDa e 33 kDa. A cromatografia por exclusão de tamanho da CNTO888 demonstrou a eluição da IgG como um único pico no mesmo volume de eluição como aquele medido para a IgG de controle Remicade (dados não mostrados). Finalmente, a análise MS mostrou que a CNTO888 tem uma massa de 147.000 Da (dados não mostrados). A análise BIAcore demonstrou que a afinidade de ligação da CNTO888 ( $K_D$ ) com relação a CCL-2 de cyno e humana foi de 30 e 10 pM, respectivamente. A CNTO888 não exibiu a ligação detectável em BIAcore às quimiocinas relacionadas com a CCL-2, isto é, as MCP-2, 3, 4 e eotaxina 2, 2 e 3.

Caracterização in vitro da CNTO888.

As atividades biológicas da CNTO888 foram avaliadas em uma variedade de análises com base em células. A CNTO888 expressa transitoriamente avaliada em todos os critérios de sucesso tinha atividades das quais não foram distinguidas da mAb 3790 de origem (Tabela 5).

Exemplo 5: Clonagem e Expressão de um Anticorpo Anti MCP-1

Alíquotas de E.coli com os plasmídios CNTO888, p2844 e p2882, contêm as cadeias pesada e leve do anticorpo, respectivamente. O plasmídio p2844 contém a seqüência de codificação da cadeia pesada otimizada da CNTO888 codificando as regiões sob o promotor anti-CD4 da cadeia pesada e o plasmídio p2882 contém a cadeia leve otimizada da CNTO888 codificando regiões sob o promotor anti-CD4 da cadeia leve. Ambos os constructos incluem o gene de seleção gpt para conferir resistência química com relação a MHX (Ácido Micofenólico, Hipoxantina e Xantina). Cada

plasmídeo foi purificado, caracterizado e sequenciado.

As células a partir de uma cultura exponencial da linha de células hospedeiras C463A, um derivado Sp2/0 adaptado para crescer no meio quimicamente definido (CD-Hibridoma), foram co-eletroporadas com os p2844 e p2882 linearizados. Depois de 48 horas, as células foram expostas a 1 x MHX (0,5 mg/l de ácido micofenólico, 2,5 mg/l de Hipoxantina e 50 mg/l de Xantina). Três dias depois da seleção, a viabilidade das células tinha crescido para menos do que 13%, em cuja ocasião - 90.000 células viáveis foram colocadas em placas de metilcelulose. As células foram incubadas sem serem perturbadas durante de oito até treze dias, em seguida triadas e colocadas em placas de 24 cavidades com a utilização do procedimento Halo. As culturas foram expandidas e foram obtidas as titulações crescidas em excesso nas 24 cavidades.

A linha mais alta de células de origem (1C4) teve uma titulação crescida em excesso nas 24 cavidades de 70 mg/l e uma titulação de 108,5 mg/l em frascos de agitação (em meio de CD-hibridoma). Essa linha de células de origem, C126A, foi escolhida para uma avaliação posterior em frascos de agitação. A C126A foi submetida ao Cell Banking Group para a geração de um Development Cell Bank (DCB). As células do DCB, designadas como C1262A:DCB;02SEP04, testaram como negativas com relação a micoplasma e esterilidade. A Produção da CNTO888 para sustentar outros estudos de pesquisa a partir das células C126A em frascos de agitação (com a adição de peptona de soja) alcançou uma titulação de 230 mg/l e produziram 366 mg de CNTO888 purificada a partir de uma cultura de 2 litros. Em paralelo, uma cultura de 9 l adicional de células C126A produziu - 2 g de matéria de CNTO888 em bruto para purificação antecipada e desenvolvimento de formulação.

A linha de células de origem C126A foi sub clonada com a utilização de procedimento Halo e produziu cinco linhas de células de sub clone de alta produção. A melhor linha de sub clones da célula (4D5) teve uma titulação crescida em excesso nas 24 cavidades de 70 mg/l e uma titulação de 108,5 mg/l em frascos de agitação (em meio de CD-hibridoma). Essa li-

nha de células de subclone foi codificada como C1262B.

Exemplo 6: Tratamento de tumores pancreáticos humanos com CNTO888.

Este estudo investiga se o bloqueio de MCP-1 de tumor (produzido através de células derivadas de tumor humano) suprime o crescimento do tumor em um xenotransplante murino. Com a finalidade de aferir o tumor, bem como o papel do homólogo hospedeiro COM-1, JE, no crescimento e na progressão de doença maligna, ambos os anticorpos MCP-1 anti-humano e JE anticamundongo foram testados com relação a capacidade de suprimir o crescimento de tumores pancreáticos humanos *in vivo*.

Camundongos portadores de tumores pancreáticos BxPC-3 foram tratados com o anticorpo anti-humano MCP-1 humano designado de CNTO888 que compreende as seqüências das regiões variáveis (SEQ ID NOS: 27 e 28, fundidas as regiões constantes da IgG humana. Com a finalidade de comparar a atividade *in vivo* do CNTO888 com o anticorpo murino previamente testado no qual ele foi considerado mais eficaz na inibição dos efeitos no hospedeiro, ambos o CNTO888 e o MCP-1 (C775) murino anti-humano foram administrados em combinação com o anti-JE (C1142). Com base na medição do peso final do tumor ambos os Mabs anti-humanos (CNTO888) e murino (V775) inibiram de forma significativa o crescimento do tumor.

#### Materiais e Métodos

As BxPC-3 são células derivadas do câncer pancreático humano. Matrigel® preparadas a partir do rumos de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) foram obtidas de Becton Dickinson (0.2 EU/mg, Bedford, MA).

C775 é um Mab MCP-1 anti-humano de camundongo e C1142 é um anticorpo JE rato/murino quimérico anti camundongo, com regiões variáveis de rato e regiões constantes de camundongo ambas descritas no Pedido de Patente co-pendente das requerentes U. S. Série de Nº 11/Co-pendente das requerentes e depósitos relacionados. O anticorpo de controle e cVaM é uma IgG rato/murina quimérica que consiste em uma região variável de rato e constante de camundongo que serve como um controle de isótipo com relação a C1142 e C775. A IgG humana de qualidade clínica foi

obtida da Beckett Apothecary and Home Health Care, Inc, Sharon Hill, PA, e serve como um controle para o CNT888.

Foram usados no estudo camundongos SCDI fêmeas (6 a 8 semanas de idade) obtidos de Charles River (Raleigh, NC). Os camundongos foram alojados em grupo em gaiolas de plástico com cobertura de filtro e supridas com alimento e água passada em autoclave.

As células BxPC-3 foram cultivadas em meio RPMI 1640 que continha 10% de FBS (meio completo). As células foram divididas 1:3 quarenta e oito horas antes do início do estudo. No dia do estudo, as células foram tripnizadas para a geração de uma única suspensão de células e a suspensão de células foi lavada com 10 volumes do meio completo para a neutralização da tripsina. As células foram submetidas a rotação e ressuspensas em soro isento de RPML. O Matrigel® foi descongelado a 4°C de um dia para o outro. A suspensão de células de tumor Matrigel® foi preparada pela mistura de volumes iguais da solução de Matrigel® e de células BxPC-3. A concentração final da suspensão de células de câncer foi de  $5 \times 10^6$  células em 5 mg/ml de Matrigel®.

No Dia 0, 80 camundongos SCID fêmeas foram implantados por via subcutânea com 0,2 ml da suspensão de células BxPC-3. A suspensão de células de 0,2 ml continha  $1 \times 10^6$  de células BxPC-3 e 1,0 mg de Matrigel®. Foram usadas seringas frias para impedir a polimerização do Matrigel®.

Tabela 7. Projeto do estudo antitumor.

Número do Grupo	Animais por Grupo	Tratamento (i.p.)
1	10	PBS
2	10	cVaM + hulgG (20 mg/kg cada anticorpo)
3	10	C775 + C1142 (20 mg/kg cada anticorpo)
4	10	CNT0888 + C1142 (2 mg/kg cada anticorpo)
5	10	CNT0888 + C1142 (20 mg/kg cada anticorpo)

Todos os animais foram pesados no início do estudo e uma vez por semana durante a duração do estudo. Uma vez que foi observado o crescimento do tumor ( $3,0 \text{ mm}^3$ ), os tumores foram medidos com compassos de calibre em duas dimensões (comprimento e largura) em milímetros (mm).

- 5 Os camundongos foram monitorados com relação ao crescimento do tumor e o volume do tumor ( $\text{mm}^3$ ) foi calculado com base na fórmula (comprimento x largura x largura)/2.

No dia 14 depois da implantação das células de tumor, os camundongos com um volume médio de tumor de cerca de  $50 \text{ mm}^3$  foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos ( $n = 10$  por grupo). O tratamento (Tabela 7) se iniciou no dia 14, e os tratamentos foram administrados duas vezes por semana durante o restante do estudo (52 dias depois do início do tratamento no dia 14). Os tumores foram medidos uma vez por semana durante o restante do estudo. No final do estudo, os camundongos foram mortos por asfixia por  $\text{CO}_2$ . Os tumores foram dissecados, pesados em uma balança digital e fixados. Os tumores foram fotografados com a utilização de uma câmara digital. No dia 50, um camundongo do Grupo 3 tinha um tumor que excedia o limite aceitável sob as normas do estudo. O volume e o peso deste animal estão incluídos na análise final.

20 Com relação ao peso dos tumores, os dados foram analisados através de um modelo linear padrão e análise da variação (ANOVA). Os valores de P de menos do que 0,5 com relação a todos os testes e comparações foram considerados como significativos a não ser que indicado de outra forma. Foi usada a escala logarítmica uma vez que as presunções subjacentes de variação igual e distribuição de tamanho normal foram melhor satisfeitas. Os valores de meia-dúzia zero, para os camundongos que estavam livres do tumor, foram substituídos com um pequeno valor interpolado por curvas (0,007240538) que facilitou a análise estatística na escala logarítmica sem a corrupção da estrutura dos dados.

30 Com relação ao volume do tumor, um modelo de medições repetidas foi ajustado aos dados, presumindo uma primeira autocorrelação de covariação da estrutura. As curvas naturais foram usadas para flexibilizar o

modelo da curvatura das tendências nos perfis de tempo. As comparações do tipo de confrontação entre os grupos foram feitas a cada ponto de tempo. Os cálculos foram realizados pelo software de ambiente R.

### Resultados

5                    Ambos os grupos de controle negativo de PBS e de cVam/hulgG exibiram crescimento de tumores similares, chegando a ~ 350 mm<sup>3</sup> depois de 51 dias. Isso indica que o tratamento com anticorpo com anticorpos irrelevantes não inibe o crescimento de tumores. O crescimento dos tumores nos três grupos (C775/C1142 e CNTO888/C1142) foi mais vagaroso do que  
10    o dos grupos de controle negativo, indicando que os tratamentos anti C-CL2/anti-JE teve um impacto sobre o crescimento do tumor. Os grupos (C775/C1142 e CNTO888/C1142) (2 mg/kg) exibiram uma inibição significativa do tumor quando comparados com o grupo de controle de PBS, como medido pelo volume de tumor no dia 18 até o final do estudo. O grupo  
15    CNTO888/C1142 (20 mg/kg) mostrou uma inibição significativa a partir do Dia 18 até o Dia 39, quando comparado com o grupo de controle de PBS.

Os pesos dos tumores foram obtidos no final do estudo no dia 51 (Tabela 8). Houve camundongos isentos de tumor no Grupo 1 do PBS (1 camundongo), no Grupo 3 C775/C142 (3 camundongos), e no Grupo 4 (CN-  
20    TO888/C1142) (2 camundongos). Quando os pesos dos tumores foram comparados, os grupos de CNTO888 em teste mostraram cada um uma redução significativa no peso de tumor quando comparada ao grupo de controle PBS (Tabela 8). O percentual de inibição do grupo CNTO888/C1142 dosado a 2 mg/kg foi de 80% ( $P = 0,006$ ), enquanto que para o grupo de CN-  
25    TO888/C1142 dosado com 20 mg/kg a inibição foi de 68% ( $P = 0,046$ ). O grupo C775/C1142 também exibiu uma inibição significativa do crescimento de tumor ( $P = 0,004$ ). As diferenças observadas na interpretação estatística dos resultados do volume do tumor vs o peso do tumor é mais provável devido a imprecisão da medição do volume do tumor com compassos de calibre, quando comparados a precisão da pesagem dos tumores retirados do  
30    animal.

Tabela 8: Peso Final do Tumor

Animal #	PBS	cVaM+Hu IgG	C775+C1 142	CN- TO888+C1142*	CN- TO888+C1142
1	0	0,142	0	0,089	0,116
2	0,34	0,349	0,075	0	0,13
3	0,368	0,302	0	0,04	0,028
4	0,239	0,667	0,032	0,123	0,13
5	0,386	0,268	0,273	0,198	0,453
6	0,222	0,178	0,018	0,065	0,059
7	0,926	0,531	0,044	0,196	0,058
8	0,484	0,485	0,307	0,128	0,029
9	0,564	0,302	0	0	0,024
10	0,459	0,28	1,328	0,031	0,356
Peso médio do tumor (g)	0,399	0,350	0,208	0,087	0,138
SD	0,244	0,163	0,410	0,073	0,148

Coletivamente esses resultados indicam que no modelo estabelecido BxPC-3 o bloqueio do MCB-1 e do JE de camundongo inibem de forma significativa o crescimento de tumor, e que o CNTO888 tem uma atividade antitumor.

Se tornará claro que a invenção pode ser praticada de outra forma do que a especificamente descrita na descrição e nos exemplos precedentes.

Numerosas modificações e variações da presente invenção são possíveis na luz das informações acima e, por esse motivo, estão dentro do escopo das reivindicações em anexo.

#### Referências

- Abraham R., Buxbaum, S. Link, J., Smith, R., Venti, C., Darsley, M. (1996). Determination of Binding Constants of Diabodies directed against Prostate-specific Antigen using Electrochemiluminescence-based Immunoassays. J. Mol. Recognit., 9(5-6):456-61.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., (1998) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley,

New York, USA

- Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lynch JP 3rd, Xue YY, Berlin A, Ross DJ, Kunkel SL, Charo IF, Strieter RM. (2001). Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest.* 108(4):547-56.
- 5 Boder, E. T., Midelfort, K. S., Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *PNAS* 97, 20, 10701-10705
- Carnevale KA, Cathcart MK. (2003). Protein kinase C beta is required for
- 10 human monocyte chemotaxis to MCP-1. *J Biol Chem.* 278(28):25317-22.
- Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NE, Vogel SN. (2003). Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23(6):748-55.
- 15 Chen, B.P., Hai, T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene* 139, 73-75. 1994
- Chen, Y., Wiesmann, C., Fuh, G., Li, B., Christinger, H. W., McKay, P., de Vos, A. M., Lowman, H. B. (1999). Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex
- 20 with antigen. *J. Mol. Biol.* 293, 865-881
- Conti P, DiGiacchino M. (2001). MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.* 22(3):133-7.
- Dawson J, Miltz W, Mir AK, Wiessner C. (2003). Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. *Expert Opin Ther Targets.* 7(1):35-
- 25 48.
- Ernst CA, Zhang YJ, Hancock PR, Rutledge BJ, Corless CL, Rollins BJ. (1994). Biochemical and biologic characterization of murine monocyte chemoattractant protein-1. Identification of two functional domains. *J Immunol.* 152(7):3541-9.
- 30 Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., & Goldberg M.E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Meth.* 77,

305-319.

Frisch,C., Brocks,B., Ostendorp,R., Hoess,A., von Ruden,T., and Kretzschmar,T. (2003). From EST to IHC: human antibody pipeline for target research. *J Immunol Methods* 275, 203-212.

- 5 Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest.* 103(6):773-8.
- Haenel C, Satzger M, Della Ducata D, Ostendorp R and Brocks B (2005) Characterization of High Affinity Antibodies by Electrochemiluminescence-Based
- 10 Equilibrium Titration (accepted for publication in *Analytical Biochemistry*)
- Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Freedman R, Grunberger D, Krstenansky J, Lee S, McCarley D, Mulkins M, Wong B, Pease J, Mizoue L, Mirzadegan T, Polsky I, Thompson K, Handel TM, Jarnagin K. (1999). Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the
- 15 MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* 38(40):13013-25.
- Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, Perry VH, Mir AK, Wiessner C. (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22(3):308-17.
- Jarnagin K, Grunberger D, Mulkins M, Wong B, Hemmerich S, Paavola C,
- 20 Bloom A, Bhakta S, Diehl F, Freedman R, McCarley D, Polsky I, Ping-Tsou A, Kosaka A, Handel TM. (1999). Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2. *Biochemistry.* 38(49):16167-77.
- Jimenez-Sainz MC, Fast B, Mayor F Jr, Aragay AM. (2003). Signaling pathways for monocyte chemoattractant protein 1-mediated extracellular signal-
- 25 regulated kinase activation. *Mol Pharmacol.* 64(3):773-82.
- Knappik,A., Ge,L., Honegger,A., Pack,P., Fischer,M., Wellnhofer,G., Hoess,A., Wolle,J., Pluckthun,A., and Virnekas,B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus fra-
- 30 meworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.
- Krebs,B., Rauchenberger,R., Reiffert,S., Rothe,C., Tesar,M., Thomassen,E., Cao,M., Dreier,T., Fischer,D., Hoss,A., Inge,L., Knappik,A., Marget,M.,

- Pack,P., Meng,X.Q., Schier,R., Sohlmann,P., Winter,J., Wolle,J., and Kretzschmar,T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.
- Kretzschmar,T. and von Rüden, T. (2002). Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* 13:598-602.
- Leonard EJ, Yoshimura T. (1990). Human monocyte chemoattractant protein-1. *Immunol Today*, 11: 97-101.
- Löhning, C. (2001). Novel methods for displaying (poly)peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.
- 10 Losy J, Zaremba J. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke*. 32(11):2695-6.
- Low, N. M., Holliger, P., Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260, 359-368
- 15 Mahad DJ, Ransohoff RM. (2003). The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol.* 15(1):23-32.
- McManus C, Berman JW, Brett FM, Staunton H, Farrell M, Brosnan CF. (1998). MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol.* 86(1):20-9.
- 20 Nagy ZA, Hubner B, Lohning C, Rauchenberger R, Reiffert S, Thomassen-Wolf E, Zahn S, Leyer S, Schier EM, Zahradnik A, Brunner C, Lobenwein K, Rattel B, Stanglmaier M, Hallek M, Wing M, Anderson S, Dunn M, Kretzschmar T, Tesar M. (2002). Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med.*8(8):801-7.
- Nakamura M, Kyo S, Kanaya T, Yatabe N, Maida Y, Tanaka M, Ishida Y, Fujii C, Kondo T, Inoue M, Mukaida N. (2004). hTERT-promoter-based tumor-specific expression of MCP-1 effectively sensitizes cervical cancer cells to a low dose of cisplatin. *Cancer Gene Ther.* 11(1):1-7.
- 30

- Neumark E, Sagi-Assif O, Shalmon B, Ben-Baruch A, Witz IP. (2003). Progression of mouse mammary tumors: MCP-1-TNFalpha cross-regulatory pathway and clonal expression of promalignancy and antimalignancy factors. *Int J Cancer*. 106(6):879-86.
- 5 Ni W, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Hiasa K, Zhao Q, Nishida K, Takeshita A, Egashira K. (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24(3):534-9.
  - 10 Nokihara H, Yanagawa H, Nishioka Y, Yano S, Mukaida N, Matsushima K, Sone S. (2000). Natural killer cell-dependent suppression of systemic spread of human lung adenocarcinoma cells by monocyte chemoattractant protein-1 gene transfection in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res*. 15;60(24):7002-7.
  - 15 Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. (2003). Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol*. 22(4):773-8.
  - 20 Piehler, J, Brecht, A., Giersch, T., Hock, B., Gauglitz, G (1997). Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J. Immunol. Meth*. 201, 189-206.
  - Prickett, KS, Amberg DC, Hopp TP (1989). A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques*. 7(6):580-9
  - 25 Rauchenberger,R., Borges,E., Thomassen-Wolf,E., Rom,E., Adar,R., Yaniv,Y., Malka,M., Chumakov,I., Kotzer,S., Resnitzky,D., Knappik,A., Reifert,S., Prassler,J., Jury,K., Waldherr,D., Bauer,S., Kretzschmar,T., Yayon,A., and Rothe,C. (2003). Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem*. 278(40):38194-38205
  - 30 Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG. (2003). Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*.2(3):242-56.

- Rose CE Jr, Sung SS, Fu SM. (2003). Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation*. 10(3-4):273-88.
- 5 Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*. 96(1):34-40.
- Sarau HM, Rush JA, Foley JJ, Brawner ME, Schmidt DB, White JR, Barnette MS. (1997). Characterization of functional chemokine receptors (CCR1 and
- 10 CCR2) on EoL-3 cells: a model system to examine the role of chemokines in cell function. *J Pharmacol Exp Ther*. 283(1):411-8.
- Sartipy P, Loskutoff DJ. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(12):7265-70.
- Schier, R., Bye, J., Apell, G., Mc Call, A., Adams, G. P., Malmqvist, M., Weiner, L. M. Weiner, Marks, J. D. (1996a). Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J. Mol. Biol.* 255, 28-43
- 15 Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C., Marks, J. D. (1996b). Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.* 263, 551-567
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. and Skerra, A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255, 753-766
- 25 Seli E, Selam B, Mor G, Kayisli UA, Pehlivan T, Arici A. (2001). Estradiol regulates monocyte chemotactic protein-1 in human coronary artery smooth muscle cells: a mechanism for its antiatherogenic effect. *Menopause*. 8(4):296-301.
- 30 Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KK, Siow YL, O K. (2002). Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney Int*. 62(4):1160-70.

- Szalai C, Kozma GT, Nagy A, Bojszko A, Krikovszky D, Szabo T, Falus A. (2001). Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol.* 108(3):375-81.
- 5 Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. (2003). Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 278(47):46654-60.
- Tonouchi H, Miki C, Ohmori Y, Kobayashi M, Mohri Y, Tanaka K, Konishi N,  
 10 Kusunoki M. (2004). Serum monocyte chemoattractant protein-1 in patients with postoperative infectious complications from gastrointestinal surgery for cancer. *World J Surg.* 28(2):130-6.
- Van Der Voorn P, Tekstra J, Beelen RH, Tensen CP, Van Der Valk P, De Groot CJ. (1999). Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol.* 154(1):45-51.
- 15 Voss, S. and Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10, 975-982
- Yamada M, Kim S, Egashira K, Takeya M, Ikeda T, Mimura O, Iwao H.  
 20 (2003). Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(11):1996-2001.
- Yang, W., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A. T., Burton, D. R., Barbas III, C. F. (1995). CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a  
 25 potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* 254, 392-403
- Yoshimura T, Leonard EJ. (1999). Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes. *J Immunol.*, 145(1):292-7.
- 30 Zhu BQ, Heeschen C, Sievers RE, Karliner JS, Parmley WW, Glantz SA, Cooke JP. (2003). Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell.* 4(3):191-6.

## Listagem de Sequência

- <110> Centocor, Inc.
- Das, Anuk
- Sweet, Raymond
- 5 Tsui, Ping
- Bardoff, Micheal
- <120> ANTICORPOS ANTI MCP-1, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS
- <130> CEN5098 PCT
- <150> US 60/682654
- 10 <151> 2005-05-19
- <160> 28
- <170> Versão PatentIn 3.3
- <210> 1
- <211> 76
- 15 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (1)..(1)
- 20 <223> Xaa pode ser Gln, Glu ou ácido piroglutâmico
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (40)..(40)
- <223> Xaa pode ser Ala ou Ser
- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (41)..(41)
- <223> Xaa pode ser Val ou Ile
- <220>
- 30 <221> VARIANTE
- <222> (43)..(43)
- <223> Xaa pode ser Phe ou Tyr

<220>

<221> SITE

<222> (69)..(69)

<220>

5 <221> SITE

<222> (75)..(75)

<223> Posição conjugada, como por exemplo, biotina ou PEG-biotina

<400> 1

Xaa Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr

10	1		5		10		15
	Asn	Arg	Lys	Ile	Ser	Val	Gln
	Arg	Leu	Ala	Ser	Tyr	Arg	Arg
							Ile
							Thr
		20		25		30	
	Ser	Ser	Lys	Cys	Pro	Lys	Glu
	Ala	Xaa	Ile	Xaa	Lys	Thr	Ile
							Val
							Ala
		35		40		45	

15	Lys	Glu	Ile	Cys	Ala	Asp	Pro	Lys	Gln	Lys	Trp	Val	Gln	Asp	Ser	Met
		50						55								60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr

65		70		75
----	--	----	--	----

<210> 2

20 <211> 119

<212> PRT

<213> Humano

<220>

<221> FR1

25 <222> (1)..(25)

<220>

<221> CDR1

<222> (26)..(35)

<223> Degenerate

30 <220>

<221> FR2

<222> (36)..(46)

<223> Degenerate  
 <220>  
 <221> CDR2  
 <222> (47)..(66)  
 5 <223> Degenerate  
 <220>  
 <221> FR3  
 <222> (67)..(98)  
 <220>  
 10 <221> CDR3  
 <222> (99)..(108)  
 <220>  
 <221> FR4  
 <222> (109)..(119)  
 15 <400> 2  
 Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 20 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 25 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 30 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 3

<211> 109  
<212> PRT  
<213> Humano  
<220>  
5 <221> FR1  
<222> (1)..(23)  
<220>  
<221> CDR1  
<222> (24)..(35)  
10 <220>  
<221> FR2  
<222> (36)..(46)  
<220>  
<221> CDR2  
15 <222> (47)..(57)  
<220>  
<221> FR3  
<222> (58)..(89)  
<220>  
20 <221> VARIANTE  
<222> (90)..(90)  
<223> X pode ser H ou Q  
<220>  
<221> CDR3  
25 <222> (90)..(97)  
<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (94)..(94)  
<223> X pode ser Glu, Gln, Asp, Ser, Thr ou Phe  
30 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (95)..(95)

<223> X pode ser Leu, Ile, His, Tyr, Phe ou Gln

<220>

<221> VARIANTE

<222> (96)..(96)

5 <223> X pode ser Trp, His, Ser, Prolina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (97)..(97)

<223> X pode ser Ala, Val, Asn, Gln, Ser ou Prolina

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (98)..(98)

<223> X pode estar ausente ou ser Phe ou Met

<220>

15 <221> FR4

<222> (98)..(109)

<220>

<221> FR4

<222> (99)..(109)

20 <400> 3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala

20 25 30

25 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

30 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Gln Tyr Ile Xaa Xaa Xaa

85 90 95

Xaa Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 4

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Humano

<220>

<221> FR1

<222> (1)..(25)

10 <220>

<221> CDR1

<222> (26)..(35)

<220>

<221> FR2

15 <222> (36)..(46)

<220>

<221> CDR2

<222> (47)..(66)

<220>

20 <221> FR3

<222> (67)..(98)

<220>

<221> CDR3

<222> (99)..(110)

25 <220>

<221> FR4

<222> (111)..(120)

<400> 4

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

30 1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr

20

25

30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asn Ile Arg Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln

10

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 5

<211> 107

15 <212> PRT

<213> Humano

<220>

<221> FR1

<222> (1)..(22)

20 <220>

<221> CDR1

<222> (23)..(33)

<220>

<221> FR2

25 <222> (34)..(44)

<220>

<221> CDR2

<222> (45)..(55)

<220>

30 <221> FR3

<222> (56)..(87)

<220>

<221> CDR3  
 <222> (88)..(97)  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 5 <222> (89)..(89)  
 <223> Xaa pode ser Ser ou Thr  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (91)..(91)  
 10 <223> Xaa pode ser Asp ou Thr  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (92)..(92)  
 <223> Xaa pode ser Arg ou Ala  
 15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (93)..(93)  
 <223> Xaa pode ser Gln ou Phe  
 <220>  
 20 <221> VARIANTE  
 <222> (96)..(96)  
 <223> Xaa pode ser Thr ou Ala  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 25 <222> (97)..(97)  
 <223> Xaa pode ser Ala, Gly ou Ser  
 <220>  
 <221> FR4  
 <222> (98)..(107)  
 30 <400> 5  
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val  
 20 25 30  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 5 Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa  
 10 85 90 95  
 Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105  
 <210> 6  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Humano  
 <400> 6  
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Ile Ser  
 1 5 10  
 20 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Humano  
 <400> 7  
 25 Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Lys Phe Gln Gly  
 20  
 <210> 8  
 30 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Humano

<400> 8

Trp Met Gly Ala Ile Asn Pro Leu Ala Gly His Thr His Tyr Ala Gln

1 5 10 15

Lys Phe Gln Gly

5 20

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Humano

10 <400> 9

Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 10

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Humano

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Gly Met Ser

1 5 10

20 <210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Humano

<400> 11

25 Trp Val Ser Asn Ile Arg Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp

1 5 10 15

Ser Val Lys Gly

20

<210> 12

30 <211> 11

<212> PRT

<213> Humano

<400> 12

Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 13

5 <211> 12

<212> PRT

<213> Humano

<400> 13

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala

10 1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Humano

15 <400> 14

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5 10

<210> 15

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Humano

<400> 15

His Gln Tyr Ile Glu Leu Trp Ser Phe

1 5

25 <210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Humano

<400> 16

30 His Gln Tyr Ile Gln Leu His Ser Phe

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Humano

<400> 17

5 His Gln Tyr Ile Phe Tyr Pro Asn

1 5

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Humano

<400> 18

Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val Tyr

1 5 10

<210> 19

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Humano

<400> 19

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser

20 1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Humano

25 <400> 20

Gln Thr Tyr Asp Arg Phe Ser Ser Thr Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Humano

<400> 21

	Gln	Ser	Tyr	Asp	Arg	Phe	Ser	Ser	Thr	Gly
	1				5					10
	<210> 22									
	<211> 20									
5	<212> PRT									
	<213> Humano									
	<220>									
	<221> VARIANTE									
	<222> (4)..(4)									
10	<223> Xaa pode ser Gly ou Ala									
	<220>									
	<221> VARIANTE									
	<222> (6)..(6)									
	<223> Xaa pode ser Ile ou Asn									
15	<220>									
	<221> VARIANTE									
	<222> (8)..(8)									
	<223> Xaa pode ser Ile ou Leu									
	<220>									
20	<221> VARIANTE									
	<222> (9)..(9)									
	<223> Xaa pode ser Phe ou Ala									
	<220>									
	<221> VARIANTE									
25	<222> (11)..(11)									
	<223> Xaa pode ser Thr ou His									
	<220>									
	<221> VARIANTE									
	<222> (12)..(12)									
30	<223> Xaa pode ser Ala ou Thr									
	<220>									
	<221> VARIANTE									

<222> (13)..(13)

<223> Xaa pode ser Asn ou His

<400> 22

Trp Met Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln

5 1 5 10 15

Lys Phe Gln Gly

20

<210> 23

<211> 22

10 <212> PRT

<213> Humano

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

15 <223> Xaa pode ser Ser ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa pode ser Gly ou Asn

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa pode ser Ala ou Thr

<220>

25 <221> VARIANTE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa pode ser Gly, Ser, ou Thr

<220>

<221> VARIANTE

30 <222> (19)..(19)

<223> Xaa pode ser Ser ou Gly

<400> 23

Trp Val Ser Ser Ile Glu His Lys Trp Xaa Xaa Tyr Xaa Thr Xaa Tyr

1 5 10 15

Ala Ala Xaa Val Lys Gly

20

5 <210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Humano

<220>

10 <221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa pode ser His ou Gln

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (5)..(5)

<223> Xaa pode ser Asp, Glu, Gln, Ser, Thr ou Phe

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

20 <223> Xaa pode ser Gln, Leu, Ile, His, Tyr ou Phe

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa pode ser Trp, His, Ser ou Pro

25 <220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa pode ser Ala, Gln, Val, Asn, Pro-Phe, Pro-Met ou Ser-Phe

<400> 24

30 Xaa Gln Tyr Ile Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 25

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Humano  
 <220>  
 5 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa pode ser Ser ou Thr  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 10 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa pode ser Asp ou Thr  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (5)..(5)  
 15 <223> Xaa pode ser Ala ou Arg  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa pode ser Gln ou Phe  
 20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa pode ser Ala ou Thr  
 <220>  
 25 <221> VARIANTE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa pode ser Ala, Gly ou Ser  
 <400> 25  
 Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa Xaa  
 30 1 5 10  
 <210> 26  
 <211> 10

- <212> PRT  
 <213> Humano  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 5 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa pode ser Gly ou Phe  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (5)..(5)  
 10 <223> Xaa pode ser Ser ou Arg  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa pode ser Ile ou Met  
 15 <400> 26  
 Gly Xaa Thr Phe Xaa Ser Tyr Gly Xaa Ser  
 1 5 10  
 <210> 27  
 <211> 119  
 20 <212> PRT  
 <213> Humano  
 <220>  
 <221> Estrutura 1  
 <222> (1)..(25)  
 25 <223> CDR3  
 <220>  
 <221> CDR1  
 <222> (26)..(35)  
 <223> CDR1  
 30 <220>  
 <221> Estrutura 2  
 <222> (36)..(46)

<223> CDR3  
 <220>  
 <221> CDR2  
 <222> (47)..(66)  
 5 <223> CDR2  
 <220>  
 <221> Estrutura 3  
 <222> (67)..(98)  
 <223> CDR3  
 10 <220>  
 <221> CDR3  
 <222> (99)..(108)  
 <223> CDR3  
 <220>  
 15 <221> Estrutura 4  
 <222> (109)..(119)  
 <223> CDR3  
 <400> 27  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 20 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 25 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 30 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Humano

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

10 <223> Xaa pode ser Asp ou Glu

<220>

<221> Estrutura 1

<222> (1)..(23)

<223> VH1A

15 <220>

<221> Característica \_ Misc

<222> (24)..(35)

<223> CDR1

<220>

20 <221> Estrutura 2

<222> (36)..(46)

<223> VH1A

<220>

<221> Característica \_ Misc

25 <222> (47)..(57)

<223> CDR2

<220>

<221> Estrutura 3

<222> (58)..(89)

30 <223> VH1A

<220>

<221> Característica \_ Misc

<222> (90)..(97)

<223> CDR3

<220>

<221> Estrutura 4

5 <222> (98)..(109)

<223> VH1A

<400> 28

Xaa Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

10 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

15 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile Gln Leu His

85 90 95

20 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

## REIVINDICAÇÕES

1. Pelo menos um anticorpo de mamífero isolado MCP-1, compreendendo, pelo menos uma região variável composta de pelo menos uma região variável de cadeia pesada e pelo menos uma cadeia leve, o referido anticorpo MCP-1 compreendendo ambas as regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve compreendendo as SEQID NOS: 27 e 28.

2. Pelo menos um anticorpo de mamífero isolado MCP-1, compreendendo, pelo menos uma região variável composta de pelo menos uma região variável de cadeia pesada e pelo menos uma região variável de cadeia leve, o referido anticorpo compreendendo todas as regiões determinando de forma complementar de cadeia pesada e de cadeia leve (CDR) das seqüências de aminoácido das SEQID NOS: 6, 7, 9, 13, 14, e 16.

3. Um anticorpo que se liga de forma competitiva ao MCP-1 com pelo menos um anticorpo de mamífero isolado MCP-1 compreendendo pelo menos uma região variável compreendendo pelo menos uma cadeia pesada e uma cadeia leve, o referido anticorpo MCP-1 compreendendo ambas as regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve compreendendo as SEQ ID NOS: 27 e 28.

4. Um anticorpo que se liga de forma competitiva ao MCP-1 com pelo menos um anticorpo de mamífero isolado MCP-1 compreendendo pelo menos uma região variável de cadeia pesada e pelo menos uma região variável de cadeia leve, o referido anticorpo compreendendo todas as regiões determinando de forma complementar de cadeia pesada e de cadeia leve (CDR) das seqüências de aminoácido das SEQID NOS: 6, 7, 9, 13, 14, e 16.

5. Pelo menos um anticorpo de mamífero isolado MCP-1, que se liga especificamente à mesma região do polipeptídio MCP-1 como um anticorpo compreendendo pelo menos um CDE de cadeia pesada ou cadeia leve tendo a seqüência de aminoácido de pelo menos uma das SEQID NOS: 6, 7, 9, 13, 14, e 16.

6. Um anticorpo humano isolado anti MCP-1 compreendendo uma região variável de uma cadeia pesada ou de uma cadeia leve de pelo menos uma das SEQ ID NOS: 2 a 5 compreendendo ainda uma região de-

terminante complementar (CDR) de uma cadeia pesada ou leve ou um ligante ligando uma parte das mesmas, selecionada a partir do grupo que consiste em SEQID NO: 6 a 20, e, opcionalmente associada de forma funcional com uma região de estrutura, também compreendendo opcionalmente pelo menos CH1, dobradiça, CH2 ou CH3 de uma imunoglobulina humana.

7. Um anticorpo MCP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, em que o referido anticorpo se liga ao MCP-1 com uma afinidade de pelo menos uma selecionada a partir de pelo menos  $10^{-9}$  M, pelo menos  $10^{-10}$  M, pelo menos  $10^{-11}$  M, ou pelo menos  $10^{-12}$  M.

8. Um anticorpo MCP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, em que o referido anticorpo modula substancialmente pelo menos uma atividade de pelo menos um polipeptídeo MCP-1.

9. Um ácido nucléico isolado que codifica pelo menos um anticorpo de mamífero isolado MCP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7.

10. Um vetor de ácido nucléico isolado compreendendo um ácido nucléico isolado de acordo com a reivindicação 8.

11. Uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica compreendendo um ácido nucléico isolado de acordo com a reivindicação 9.

12. Uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 10, em que a referida célula hospedeira é pelo menos uma célula selecionada a partir de COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, YB2/0, células de mieloma, ou linfoma, ou qualquer célula derivada, imortalizada ou transformada das mesmas.

13. Um método para a produção de pelo menos um anticorpo MCP-1, compreendendo transladar um ácido nucléico de acordo com a reivindicação 9, sob condições in vitro, in vivo ou in situ, de tal forma que o anticorpo MCP-1 seja expresso em quantidades detectáveis ou recuperáveis.

14. Uma composição compreendendo pelo menos um anticorpo de mamífero isolado MCP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, que tenha pelo menos um CDR humano, e pelo menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

15. Uma composição de acordo com a reivindicação 13, que compreende ainda pelo menos um pelo menos um composto ou polipeptídio selecionado a partir de pelo menos um de um marcador ou repórter detectável, um antagonista TFN, um fármaco antiinfecção, um fármaco do sistema cardiovascular (CV), um fármaco do sistema nervoso central (CNS), um fármaco do sistema nervoso autônomo (ANS), um fármaco do trato respiratório, um fármaco do trato gastrointestinal (GI), um fármaco hormonal, um fármaco para o equilíbrio fluido ou eletrolítico, um fármaco hematológico, um antineoplásico, um fármaco de imuno modulação, um fármaco oftálmico,ótico ou nasal, um fármaco tópico, um produto nutricional, uma citocina, ou um antagonista de citocina.

16. Um anticorpo ou fragmento antiidiotipo que se ligue especificamente a pelo menos um anticorpo MCP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7.

17. Um método para o diagnóstico ou tratamento de uma condição relacionada com o MCP-1 em uma célula, tecido, órgão ou animal, compreendendo contatar ou administrar uma composição compreendendo uma quantidade eficaz de pelo menos um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, com, ou à referida célula, tecido, órgão ou animal.

18. Um método de acordo com a reivindicação 16, no qual a referida quantidade eficaz é de 0,001 a 50 mg/quilograma das referidas células, tecido, órgão ou animal.

19. Um método de acordo com a reivindicação 16, no qual o referido contato ou administração é através de pelo menos um modo selecionado a partir de parenteral, subcutâneo, intramuscular, intravenoso, intra-articular, intrabronquico, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitário, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intra-hepático, intramiocárdico, intraósteo, intrapélvico, intrapericardio, intra-peritônio, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intra-retal, intra-renal, intra-retina, intra-espinhal, intrasinovial, intratorácico, intra-uterino, intravesical, intralesional, bolus, vaginal, retal, bucal,

sublingual, intranasal, ou transdérmico.

20. Um método de acordo com a reivindicação 16, que compreende ainda a administração antes, concorrentemente ou depois do referido (a) contato ou administração d pelo menos uma composição compreendendo uma quantidade eficaz de pelo menos um composto ou polipeptídio selecionado a partir de pelo menos um de um marcador ou reportes detectável, um fármaco antiinfecção, um fármaco do sistema cardiovascular (CV), um fármaco do sistema nervoso central (CNS), um fármaco do sistema nervoso autônomo (ANS), um fármaco do trato respiratório, um fármaco do trato gastrointestinal (GI), um fármaco hormonal, um fármaco para o equilíbrio fluido ou eletrolítico, um fármaco hematológico, um antineoplásico, um fármaco de imuno modulação, um fármaco oftálmico,ótico ou nasal, um fármaco tópico, um produto nutricional, uma citocina, ou um antagonista de citocina.

21. Um dispositivo medicinal compreendendo pelo menos um anticorpo MCP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que o referido dispositivo é adequado para o contato ou a administração do referido pelo menos um anticorpo MCP-1 através de pelo menos um modo selecionado a partir de parenteral, subcutâneo, intramuscular, intravenoso, intra-articular, intrabronquico, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitário, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intra-hepático, intramiocárdico, intraósteo, intrapélvico, intrapericardio, intra-peritônio, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intra-retal, intra-renal, intra-retina, intra-espinhal, intrasinovial, intratorácico, intra-uterino, intravesical, intralesional, bolus, vaginal, retal, bucal, sublingual, intranasal, ou transdérmico.

22. Um artigo de fabricação para uso farmacêutico ou para diagnóstico humano compreendendo material de embalagem e um recipiente compreendendo um a solução ou uma forma liofilizada de pelo menos um anticorpo MCP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7.

23. O artigo de fabricação da reivindicação 21, no qual o referido recipiente é um componente de dispositivo ou sistema de suprimento paren-

teral, subcutâneo, intramuscular, intravenoso, intra-articular, intrabronquico, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelial, intracelebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intra-hepático, intramiocárdico, intraósteo, intrapélvico, intrapericardio, intra-  
5 peritônio, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intra-retal, intra-renal, intra-retina, intra-espinhal, intrasinovial, intratorácico, intra-uterino, intravesical, intralesional, bolus, vaginal, retal, bucal, sublingual, intranasal, ou transdérmico.

24. Um método para a produção de pelo menos um anticorpo de  
10 mamífero isolado MCP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, compreendendo a provisão de uma célula hospedeira ou um animal transgênico ou uma planta transgênica ou célula de planta capaz de expressar em quantidades recuperáveis o referido anticorpo.

25. Pelo menos um anticorpo MCP-1 produzido através de um  
15 método de acordo com a reivindicação 23.

26. Qualquer invenção descrita aqui, neste pedido de patente.

## RESUMO

Patente de Invenção: **"ANTICORPOS ANTI MCP-1, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS"**.

- A presente invenção se refere à pelo menos um novo anticorpo
- 5 anti-MCP-1, incluindo ácidos nucleicos isolados que codificam pelo menos um anticorpo anti MCP-1, MCP-1, vetores, células hospedeiras, animais ou plantas transgênicas, e métodos para a fabricação e utilização do mesmo, incluindo composições terapêuticas, métodos e dispositivos.