

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

(21) **PI0620115-6 A2**

(22) Data de Depósito: 20/12/2006
(43) Data da Publicação: 01/11/2011
(RPI 2130)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/24
A61K 39/395
A61P 29/00

(54) Título: ANTICORPO DE DOMÍNIO RECOMBINANTE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODOS PARA DETECTAR O TNF-ALFA HUMANO EM UMA AMOSTRA E PARA TRATAR DE UM DISTÚRBIO DISTINGUIDO PELA ATIVIDADE DO TNF-ALFA HUMANO EM UM INDIVÍDUO HUMANO

(30) Prioridade Unionista: 20/12/2005 AU 2005907124, 28/06/2006 US 60/817272

(73) Titular(es): Arana Therapeutics Limited

(72) Inventor(es): Anthony Gerard Doyle, Benjamin P. Woolven, Ian M. Tomlinson, Jennifer A. Lee, Philip Anthony Jennings

(74) Procurador(es): MOMSEN, LEONARDOS & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT AU2006001940 de 20/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/070948de 28/06/2007

(57) Resumo: ANTICORPO DE DOMÍNIO RECOMBINANTE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODOS PARA DETECTAR O TNF-ALFA HUMANO EM UMA AMOSTRA E PARA TRATAR DE UM DISTÚRBIO DISTINGUIDO PELA ATIVIDADE DO TNF-ALFA HUMANO EM UM INDIVÍDUO HUMANO A presente invenção fornece um anticorpo de domínio recombinante (dAb) que se Liga ao TNF- α humano, o dAb compreendendo o domínio variável de cadeia pesada ou leve de imunoglobulina, em que referido domínio variável compreende pelo menos uma região determinante da complementaridade (CDR) tendo uma sequência derivada de um primata do Novo Mundo, em que a CDR é selecionada do grupo consistindo de YAATKLQS (SEQ ID NO: 1), YEASSLQS (SEQ ID NO: 2), YEASKLQS (SEQ ID NO: 3) e YSASNLET (SEQ ID NO: 4). O anticorpo de domínio recombinante é usado para detectar o TNF- α humano em uma amostra, e para tratar de um distúrbio caracterizado pela atividade do TNF- α humano.

“ANTICORPO DE DOMÍNIO RECOMBINANTE, MOLÉCULA DE
ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E,
MÉTODOS PARA DETECTAR O TNF-ALFA HUMANO EM UMA
AMOSTRA E PARA TRATAR DE UM DISTÚRBIO DISTINGUIDO
5 PELA ATIVIDADE DO TNF-ALFA HUMANO EM UM INDIVÍDUO
HUMANO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção diz respeito a anticorpos de domínio (dAbs)
recombinantes úteis para a terapia humana. Mais particularmente, a presente
10 invenção diz respeito a um anticorpo de domínio (dAb) que se liga ao TNF- α
humano, e ao seu uso no tratamento de distúrbios caracterizados pela
atividade do TNF- α humano.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina
15 produzida por numerosos tipos de células, incluindo monócitos e macrófagos,
que tenham sido implicados em mediar o choque e a fisiopatologia de uma
variedade de doenças e distúrbios humanos, incluindo sepse, infecções,
doenças autoimunes, rejeição de transplantes e a doença enxerto-versus-
hospedeiro.

20 Em um esforço para contrariar os efeitos nocivos mediados
pelo TNF- α humano, anticorpos que se liguem e neutralizem o TNF- α
humano têm sido procurados como m meio de inibir a atividade do TNF- α .
Alguns dos anticorpos mais primitivos direcionados contra o TNF- α humano
foram os anticorpos monoclonais de camundongos secretados das linhagens
25 de células de hibridomas preparadas dos linfócitos colhidos de camundongos
imunizados com TNF- α humano. Embora tais anticorpos tenham sido
eficazes na ligação e neutralização do TNF- α humano, seu uso na terapia in
vivo foi limitado pelos problemas associados com a administração de
anticorpos de camundongos aos seres humanos, em particular a eliciação de

uma resposta imune indesejável contra o anticorpo de camundongos em um ser humano, referida como reações dos anticorpos humanos anticamundongos (HAMA).

Em uma tentativa de superar aqueles problemas, anticorpos de

5 TNF- α anti-humanos de murinos foram geneticamente engendrados para serem mais semelhantes aos humanos. Por exemplo, foram criados anticorpos quiméricos humanos/de camundongos, nos quais as seqüências de região variável de anticorpos do genoma de camundongos são combinadas com as seqüência de região constante de anticorpos do genoma humano. Os

10 anticorpos quiméricos apresentam as características de ligação do anticorpo parental de camundongo, e as funções efetoras associadas com a região constante humana. Embora estes anticorpos quiméricos tenham sido ousados na terapia humana, eles ainda retêm algumas seqüências murinas e, portanto, ainda podem eliciar as reações de anticorpos antiquiméricos em receptores

15 humanos, particularmente quando administrados por períodos prolongados, assim limitando sua aplicação terapêutica.

Os anticorpos monoclonais humanos contra o TNF- α humano foram desenvolvidos com o uso de técnicas de hibridomas humanos. Esta abordagem, entretanto, padece de limitações éticas, clínicas e imunológicas na

20 imunização de pacientes humanos.

Foi postulado que os anticorpos de primatas não humanos serão tolerados nos seres humanos porque eles são estruturalmente semelhantes aos anticorpos humanos [Ehrlich, P. H. et al. Human and primate monoclonal antibodies for in vivo therapy. Clin Chem. 34: 9 pp. 1681-1688 (1988)]. Além disso, tendo em vista serem os anticorpos humanos não

25 imunogênicos nos macacos Reso (Ehrlich, P. H. et al., Rhesus monkey responses to multiple injections of human monoclonal antibodies. Hybridoma 1987; 6: 151-160), é provável que o contrário seja também aplicável e os anticorpos de primatas sejam não imunogênicos nos seres humanos.

Os primatas evolucionariamente distantes, como os primatas do Novo Mundo, não são apenas suficientemente diferentes dos seres humanos para possibilitar anticorpos contra os antígenos humanos a serem gerados, mas são suficientemente semelhantes aos seres humanos para terem anticorpos semelhantes aos anticorpos humanos, de modo que o hospedeiro não gere uma resposta imune de anticorpos quando tais anticorpos derivados dos primatas sejam introduzidos em um ser humano. Os primatas do Novo Mundo (subordem Platyrrhini) compreendem pelo menos 53 espécies comumente divididas em duas famílias, a Callithricidae e a Cebidae. A Callithricidae consiste de sagüis e tamarins. A Cebidae inclui o macaco-de-cheiro, o japuá, o cuatá, o macaco-cabeludo, caiarara, macaco-da-noite e o macaco-gritador.

Estudos anteriores caracterizaram o repertório de cadeia pesada da imunoglobulina expressa do sagüi *Callithrix jacchus* (von Budingen, H-C et al., Characterization of the expressed immunoglobulin IGHV repertoire in the New World marmoset *Callithrix jacchus*. Immunogenetics 2001; 53: 557-563). Foram identificados seis subgrupos de IGHV que apresentaram um alto grau de similaridade de sequência com suas contrapartes de IGHV humano. As regiões da estrutura foram mais conservadas em comparação com as regiões de determinação da complementaridade (CDRs). O grau de similaridade entre *C. jacchus* e as sequências de IGHV humanas foi menor do que entre os primatas do Velho Mundo e os seres humanos.

ANTICORPOS DE DOMÍNIO

Os anticorpos de domínio (dAb) são as menores unidades de ligação de anticorpos em funcionamento e correspondem às regiões variáveis das cadeias de anticorpos ou pesadas (V_H) ou leves (V_L). Os anticorpos de domínios têm um peso molecular de aproximadamente 13 kDa, ou menos do que um décimo do tamanho de um anticorpo completo.

As cadeias leves de imunoglobulina são referidas como cadeias leves ou capa ou lâmbida, e as cadeias pesadas como gama, mü, delta, alfa ou épsilon. A região variável dá ao anticorpo sua especificidade. Dentro de cada região variável acham-se as regiões de hipervariabilidade, de outra forma conhecidas como regiões determinantes da complementaridade (CDRs) que são flanqueadas por regiões mais conservadas referidas como regiões da estrutura. Dentro de cada região variável acham-se três CDRs e quatro regiões da estrutura.

Ao contrário dos anticorpos convencionais, os anticorpos de domínio são bem expressos nos sistemas bacterianos, de levedura e de mamíferos. Seu pequeno tamanho leva em conta quantidades molares mais elevadas por grama do produto, assim provendo um aumento significativo na potência por dose. Além disso, os anticorpos de domínio podem ser usados como um bloco de construção para criar produtos terapêuticos tais como os dAbs de alvejamento múltiplo, em que uma construção contendo dois ou mais domínios variáveis se ligam a dois ou mais alvos terapêuticos, ou dAbs alvejados para administração pulmonar ou oral.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um anticorpo de domínio (dAb) recombinante que se liga ao TNF- α humano, o dAb compreendendo um domínio variável de cadeia pesada ou leve de imunoglobulina, em que referido domínio variável compreende pelo menos uma região determinante da complementaridade (CDR) tendo uma seqüência derivada de um primata do Novo Mundo, em que a CDR é selecionada do grupo consistindo de AATKLQS (SEQ ID NO: 1), EASSLQS (SEQ ID NO: 2), EASKLQS (SEQ ID NO: 3) e SASNLET (SEQ ID NO: 4).

Em um segundo aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz do dAb de acordo com o primeiro aspecto da invenção, junto com um portador ou diluente

farmaceuticamente aceitáveis.

Em um terceiro aspecto, a presente invenção leva em conta o uso de um dAb de acordo com o primeiro aspecto da invenção, em uma aplicação de diagnóstico para detectar o TNF- α humano.

Em um quarto aspecto, a invenção fornece um método para tratar de um distúrbio caracterizado pela atividade do TNF- α humano em um paciente humano, compreendendo administrar ao paciente uma composição farmacêutica de acordo com o segundo aspecto da invenção.

Em um quinto aspecto, a invenção fornece uma sequência de ácido nucleico codificando o dAb do primeiro aspecto da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra as seqüências de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) e de nucleotídeos (SEQ ID NO: 5) do dAb receptor.

A Figura 2 mostra as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de onze (11) sagüis e seis (6) segmentos de genes V_{κ} de macacos-da-noite.

A Figura 3 mostra as seqüências de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) e de nucleotídeos (ambas as fitas; SEQ ID Nos: 5 e 53) do dAb receptor. Os sítios de restrição da digestão para Kpn I e San DI, que excitam uma região incluindo a CDR2, são indicados na figura. Os resíduos de CDR2 removidos acham-se sublinhados.

A Figura 4 mostra os alinhamentos de seqüências apresentando oligonucleotídeos usados durante a clonagem e a confirmação de seqüência final das seqüências de nucleotídeos (A; SEQ ID Nos: 5, 36, 54-56, 37, 57-59, 14, 60-62, 15, 63-65, respectivamente) e de aminoácidos (B; SEQ ID Nos: 6, 42, 66-68, 43, 69-71, 25, 72-74, 26, 75-77, respectivamente) mostradas na Figura 2.

A Figura 5 demonstra a capacidade dos dAbs enxertados de CDR2 para inibir a ligação do TNF ao receptor de TNF recombinante. Os dAbs testados foram os seguintes: Macaco-da-noite 1 (CDR = AATKLQS; SEQ ID NO: 1), Macaco-da-noite 2 (CDR = EASSLQS; SEQ ID NO: 2), Sagüi 1 (CDR = EASKLQS; SEQ ID NO: 3), Sagüi 2 (CDR = SASNLET;

SEQ ID NO: 4) e dAb Receptor (CDR = SASELQS; SEQ ID NO: 49).

A Figura 6 demonstra a capacidade melhorada dos Compostos 100 e 123 para neutralizar a atividade citotóxica do TNF sobre os fibroblastos L929 de camundongos relativos ao dAb receptor (Composto 145).

5 **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um anticorpo de domínio recombinante (dAb) que se liga ao TNF- α humano, o dAb compreendendo um domínio variável de cadeia pesada ou leve de imunoglobulina, em que referido domínio variável compreende pelo menos
10 uma região determinante da complementaridade (CDR) tendo uma sequência derivada de um primata do Novo Mundo, em que a CDR é selecionada do grupo consistindo de AATKLQS (SEQ ID NO: 1), EASSLQS (SEQ ID NO: 2), EASKLQS (SEQ ID NO: 3), SASNLET (SEQ ID NO: 4).

Preferivelmente, a CDR é CDR2.

15 Em uma forma de realização preferida, o dAb tem uma sequência selecionada dentre:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQK
PGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
QQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (Composto 145; SEQ ID NO: 7)

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQ
KPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY
CQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (Composto 123; SEQ ID NO: 8)

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQK
PGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQ
QVWVRPFTFGQGTKVEIKR (Composto 100; SEQ ID NO: 9)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQ
KPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYC
QQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (Composto 196; SEQ ID NO: 10)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQK

PGKPPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ
QVVWRPFTFGQGTKVEIKR (Composto 134; SEQ ID NO: 50)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQK
PGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGRGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
5 QVVWRPFTFGQGTKVEIKR (Composto 137; SEQ ID NO: 51)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQK
PGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQ
QVVWRPFTFGQGTKVEIKR (Composto 121; SEQ ID NO: 52)

Em um outro aspecto, a invenção fornece uma seqüência de
10 ácido nucléico codificando o dAb do primeiro aspecto da invenção.

A expressão “liga-se a”, como aqui usada, refere-se à ligação
de um antígeno por uma região variável de imunoglobulina com uma
constante de dissociação (K_d) de 1 μ M ou menos, medida pela análise de
ressonância de plasmon de superfície com o uso, por exemplo, de um sistema
15 de ressonância de plasmon de superfície BIAcore[®] e um programa de
avaliação cinética BIAcore[®] (por exemplo, a versão 2.1). A afinidade ou
constante de dissociação (K_d) para uma interação de ligação específica é de
preferência de cerca de 500 nM ou menos, mais preferível de cerca de 300
nM ou menos e, preferivelmente, de pelo menos 300 nM a 50 pM, 200 nM a
20 50 pM, e o mais preferível de pelo menos 100 nM a 50 pM, 75 nM a 50 pM,
10 nM a 50 pM.

A expressão “domínio variável”, como aqui usada, significa
um domínio de polipeptídeo duplicado, que compreende seqüências
características de domínios variáveis de cadeia pesada ou leve de
25 imunoglobulina, e que especificamente se liga a um antígeno. O anticorpo do
domínio ou dAb é equivalente a um polipeptídeo de domínio variável único.

Será observado pelas pessoas versadas na técnica que o
remanescente da seqüência de domínio variável pode ser derivado ou da
seqüência de domínio variável ou de um ser humano, de um primata do Novo

Mundo ou de um primata do Velho Mundo, a qual, por causa de sua associação evolucionária com os seres humanos, compartilham um alto grau de homologia com a sequência de seres humanos. Assim, por exemplo, uma CDR selecionada das sequências acima pode ser enxertada na sequência de região variável humana ou de primata para substituir a CDR do tipo selvagem.

Conseqüentemente, a invenção baseia-se ainda em um método para amplificação dos genes de domínio variável de imunoglobulina de primatas do Novo Mundo, por exemplo por reação em cadeia da polimerase (PCR) de ácido nucléico extraído dos linfócitos de primatas do Novo Mundo, usando iniciadores específicos para as famílias de genes de domínio variável de cadeias pesada e leve. Por exemplo, as informações com respeito aos limites dos domínios variáveis de genes de cadeia pesada e leve (V_H e V_L respectivamente) podem ser usadas para designar os iniciadores de PCR que amplificam o domínio variável de uma sequência codificadora da cadeia pesada ou leve clonada codificando um anticorpo conhecido para ligar um antígeno dado. O domínio variável amplificado é então introduzido ou sozinho ou como uma fusão com outra sequência de polipeptídeos em um vetor de expressão adequado. O domínio variável expresso é então testado quanto à ligação de alta afinidade ao antígeno desejado.

O repertório dos domínios V_H e V_L pode ser um repertório de ocorrência natural das sequências de imunoglobulina ou um repertório sintético. Um repertório de ocorrência natural é aquele preparado, por exemplo, das células que expressam a imunoglobulina colhidas de um ou mais primatas. Tais repertórios podem ser ingênuos, isto é, preparados de células que expressam a imunoglobulina de recém-nascidos, ou redistribuídos, isto é, preparados, por exemplo, de células B de primatas adultos. Se desejável, os clones identificados de um repertório natural, ou de qualquer repertório que ligue o antígeno alvo, ficam então sujeitos à mutagênese e

outros testes de modo a produzir-se e seleccionar-se variantes com características de ligação melhoradas.

Os repertórios sintéticos de domínios variáveis de imunoglobulina única são preparados pela introdução artificial de uma
5 diversidade em um domínio variável clonado.

Um repertório dos domínios V_H e V_L pode ser testado quanto à especificidade de ligação desejada e ao comportamento funcional mediante, por exemplo, apresentação de fago. Métodos para a construção de bibliotecas de apresentação de bacteriófagos e bibliotecas de expressão de fago lâmbida,
10 são bem conhecidos na técnica. A técnica de apresentação de fago foi descrita extensivamente na prática e exemplos de métodos e compostos para gerar e testar tais bibliotecas e amadurecer por afinidade os produtos delas, podem ser encontrados, por exemplo, em Barbas et al. (1991) PNAS 88: 7978-7982; Clarkson et al. (1991) Nature 352: 624-628; Dower et al. PCT. 91/17271,
15 Patente U.S. nº 5.427.908, Patente U.S. 5.580.717 e EP 527.839; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Garrard et al. PCT WO 92/09690; Gram et al. (1992) PNAS 89: 3576-3580; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12: 725-734; Griffiths et al. Patente U.S. nº 5.885.793 e EP 589.877; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol
20 226: 889-896; Hay et al., (1992) Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137; Husc et al. (1989) Science 246: 1275-1281; Knappik et al. (2000) J Mol Biol 296: 57-86; Knappik et al. PCT WO 97/08320; Ladncr et al. Patentes U.S. nº 5.223.409, nº 5.403.484, nº 5.571.698, nº 5.837.500 e EP 436.597; McCafferty et al.
25 (1990) Nature 348: 552-554; McCafferty et al. PCT. WO 92/01047, Patente U.S. nº 5.969.108 e EP 589.877; Salfeld et al. PCT WO 97/29131, Pedido Provisório U.S. nº 60/126.603; e Winter et al. PCT WO 92/20791 e EP 368.684.

Bibliotecas recombinantes expressando o repertório dos

domínios de V_H e V_L podem ser expressas sobre a superfície de microorganismos, por exemplo, de levedura ou bactérias (ver a publicações PCT WO 99/36569 e 98/49286).

O Método de Anticorpos de Linfócitos Seletivos ou SLAM, como é referido no estado da técnica, é outro meio de gerar rapidamente anticorpos de alta afinidade. Ao contrário das abordagens de apresentação de fago, todos os anticorpos são completamente divalentes de modo a gerar anticorpos de primatas do Novo Mundo, os primatas do Novo Mundo são imunizados com um antígeno humano, por exemplo um polipeptídeo de TNF- α . Em seguida à imunização, as células são removidas e seletivamente proliferadas em micro-reservatórios individuais. Os sobrenadantes são removidos dos reservatórios e testados tanto quanto à ligação quanto à função. As seqüências de genes podem ser recuperadas para subseqüentes manipulações, por exemplo humanização, fragmento de Fab, geração de scFv ou dAb. Assim sendo, outro exemplo é a derivação do anticorpo ou espécies de anticorpos da invenção mediante o SLAM e seus derivados (Babcock, J. S. et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93; 7843-7848, Patente U.S. nº 5.627.052 e publicação PCT WO 92/02551). As adaptações do SLAM, tais como o uso de alternativas para testar sobrenadantes tais como a lavagem na bateia, também se situa dentro do escopo desta invenção.

Em um sistema de expressão, a biblioteca de peptídeo/proteína recombinante é apresentada em ribossomas (para exemplos, ver Roberts, R. W. e Szostak, J. W. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 12297 - 123202 e Publicação PCT nº WO 98/31700). Assim, outro exemplo envolve a geração e a transcrição in vitro de uma biblioteca de DNA (por exemplo, de anticorpos ou derivados preferivelmente preparados de células imunizadas, mas não tão limitadas), translação da biblioteca de tal modo que a proteína e os mRNAs “imunizados” permaneçam sobre o ribossoma, seleção de afinidade (por exemplo pela ligação a RSP), isolamento do mRNA, translação reversa e

subseqüente amplificação (por exemplo pela reação em cadeia da polimerase ou tecnologia relacionada). Rodadas adicionais de seleção e amplificação podem ser acopladas, quando necessário para a maturação de afinidade através da introdução de mutação somática neste sistema ou por outros métodos de maturação de afinidade como conhecido no estado da técnica.

Outro exemplo observa a aplicação da tecnologia de compartimentalização da emulsão para a geração dos anticorpos de domínio da invenção. Na compartimentalização da emulsão, métodos de separação in vitro e óptica são combinados com a co-compartimentalização da proteína transladada e sua seqüência codificadora de nucleotídeos na fase aquosa dentro de uma gotícula de óleo em uma emulsão (ver as publicações PCT n^{os} WO 99026711 e WO 0040712). Os elementos principais para a geração e seleção de anticorpos são essencialmente semelhantes ao método in vitro de apresentação de ribossomas.

As seqüências de CDR podem ser obtidas de várias fontes, por exemplo dos bancos de dados como The National Centre for Biotechnology Information, dos bancos de dados de proteínas e nucleotídeos, The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest. Alternativamente, as regiões de CDR podem ser previstas do repertório dos domínios V_H e V_L [ver, por exemplo, Kabat, E. A. e Wu, T. T. Attempts to locate complementarity determining residues in the variable positions of light and heavy chains. Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-393 (1971)]. A seqüência de CDR pode ser um DNA genômico ou um cDNA.

Existem vários meios nos quais a CDR de substituição pode ser enxertada em uma seqüência de domínio variável e tais métodos serão familiares àqueles habilitados na técnica. O método preferido da presente invenção envolve a substituição da CDR2 no domínio de região variável através da mutagênese dirigida ao iniciador. Este método consiste do recozimento de um oligonucleotídeo codificando uma mutação desejada a

uma região alvo onde ela serve como um iniciador para a iniciação da síntese de DNA in vitro, prolongando o oligonucleotídeo por uma DNA polimerase para gerar um DNA de filamento duplo que carregue as mutações desejadas, e ligando e clonando a sequência em um vetor de expressão apropriado.

5 Preferivelmente, o anticorpo do domínio de acordo com a invenção tem baixa imunogenicidade nos seres humanos.

Pela referência à expressão “baixa imunogenicidade” denota-se que o anticorpo de domínio não origina uma resposta do anticorpo, em um ser humano, de suficiente magnitude para reduzir a eficácia da administração
10 continuada do anticorpo por um tempo suficiente para de obter a eficácia terapêutica.

Preferivelmente, a sequência de região variável na qual a CDR é enxertada, é a “sequência do receptor de dAb” (designada Composto 128) fornecida na Figura 1.

15 A sequência do receptor de dAb consiste da sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 5:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLI
YSASELQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVWVRPFT
FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 6).

20 Esta sequência é codificada pela sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 5:

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCT CTG TCT CCA TCT
GTA GGA GAC CGT GTC ACC

ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GAT AGT TAT TTA
25 CAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA

GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AGT GCA TCC GAG
TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA

CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC
ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT

GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT GTG TGG
 CGT CCT TTT ACG TTC GGC CAA
 GGG ACC AAG GTG CAA ATC AAA CGG

Em uma forma de realização preferida da presente invenção,
 5 uma sequência de CDR de sagüi SASNLET (SEQ ID NO: 4) é enxertada na
 sequência do receptor de dAb de modo a substituir a sequência de CDR2
 (SASELQS; SEQ ID NO: 49) da sequência do receptor de dAb para produzir
 o seguinte dAb (designado Composto 145):

Composto 145

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQK
 PGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
 QQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 7)

Assim sendo, em uma forma de realização preferida, o dAb
 que se liga ao TNF- α humano compreende a sequência de aminoácidos de
 15 SEQ ID NO: 7.

Situa-se dentro do escopo da presente invenção, que a
 sequência de dAb pode estar ainda sujeita à maturação de afinidade de modo
 a melhorar suas características de ligação a antígeno. Isto pode necessitar da
 modificação de certos resíduos de aminoácidos dentro da CDR1 e da CDR3.

20 Por exemplo o dAb enxertado com CDR de sagüi apresentado
 na SEQ ID NO: 7 foi amadurecido por afinidade como apresentado em
 Materiais e Métodos, e testado por ligação de TNF. Em uma outra forma de
 realização preferida, o dAb que se liga ao TNF- α humano compreende a
 sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 9. Estas foram
 25 designadas como Composto 123 e Composto 100, respectivamente, e suas
 seqüências são apresentadas abaixo:

Composto 123

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQ
 KPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRPSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY

CQQVW RPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 8)

Composto 100

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQK
PGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLPEDFATYYCQ
5 QVVWRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 9)

Em uma forma de realização particularmente preferida, o dAb que se liga ao TNF- α humano compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Esta foi designada de Composto 196 e a seqüência é fornecida abaixo:

10 Composto 196

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQ
KPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLPEDFATYYC
5 QVVWRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 10)

O dAb de acordo com a invenção pode ainda compreender
15 uma região constante de imunoglobulina (região Fc) a ele conectada. A seqüência de região constante pode ser originada das seqüências humanas ou de primatas. A seqüência de primatas pode ser uma de primata do Novo Mundo ou uma seqüência de primata do Velho Mundo. Os primatas do Velho Mundo adequados incluem o chimpanzé, ou macaco hominídeo, por exemplo
20 um gorila ou um orangotango, o qual, por causa de sua íntima proximidade filogenética aos seres humanos, compartilham de um alto grau de homologia com a seqüência de região constante humana.

O dAb (com ou sem a região constante a ele conectada) pode ser originado ou ligado a outra molécula funcional. Por exemplo, o dAb pode
25 ser funcionalmente ligado mediante acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou, de outra forma, a uma ou mais outras entidades moleculares, tal como a outro anticorpo, um agente detectável, um agente citotóxico, um agente farmacêutico, e/ou uma proteína ou peptídeo que possam mediar a associação do anticorpo com outra molécula (tal como uma

região de núcleo de estreptavidina ou um rótulo de poli-histidina).

Agentes detectáveis úteis com os quais o dAb pode ser derivado, incluem compostos fluorescentes. Agentes exemplares detectáveis fluorescentes incluem a fluoresceína, o isotiocianato de fluoresceína, a rodamina, o cloreto de 5-dimetilamina-1-haftalenossulfonila, a ficoeritrina e outros. O dAb também pode ser derivado com enzimas detectáveis tais como a fosfatase alcalina, a peroxidase de raiz forte, a glicose oxidase etc. Quando um dAb é derivado com uma enzima detectável, ele é detectado pela adição de reagentes adicionais que a enzima usa para produzir um produto de reação detectável. Um dAb pode também ser derivado com biotina, e detectado através de medição indireta da ligação de avidina ou estreptavidina.

A presente invenção também se estende aos dAbs PEGuilados (com ou sem a região constante a eles conectados), os quais proporcionam meia-vida e resistência à degradação aumentadas sem uma perda na atividade (por exemplo, afinidade de ligação) em relação aos polipeptídeos de anticorpos não PEGuilados.

O dAb pode ser acoplado, com o uso de métodos conhecidos na técnica, a moléculas poliméricas (preferivelmente PEG) úteis para se obter as propriedades de meia-vida e resistência à degradação aumentadas. Os componentes poliméricos que podem ser utilizados na invenção podem ser sintéticos e de ocorrência natural e incluem, porém sem limitar, os polímeros de polialquilenos, polialquilenos ou polioialquilenos de cadeia reta ou ramificada, ou um polissacarídeo ramificado ou não ramificado tal como um homo- ou heteropolissacarídeo. Exemplos preferidos de polímeros sintéticos que podem ser usados na invenção incluem os poli(etileno glicol) (PEG), poli(propileno glicol) ou o álcool polivinílico de cadeia reta ou ramificada e seus derivados ou formas substituídas. Polímeros substituídos particularmente preferidos para articulação aos dAbs incluem o PEG substituído, incluindo o metóxi(polietileno glicol). Componentes poliméricos de ocorrência natural

que podem ser usados além do PEG ou no lugar deste incluem a lactose, amilose, dextrano ou glicogênio, bem como os derivados destes que devem ser reconhecidos pelas pessoas habilitadas na técnica.

5 As formas de moléculas poliméricas derivadas incluem, por exemplo, os derivados que possuem componentes adicionais ou grupos reativos neles presentes para permitir a interação com os resíduos de aminoácidos dos polipeptídeos de anticorpos de domínio aqui descritos. Tais derivados incluem os ésteres ativos de N-hidroxilsuccinimida (NHS), os polímeros de propionato de succinimidila, e agentes reativos seletivos de 10 sulfidrila, tais como a maleimida, a vinil sulfona e o tiol. Polímeros de PEG úteis na invenção podem ser moléculas lineares, ou podem ser ramificadas, em que os componentes de PEG múltiplos estejam presentes em um polímero único.

O grupo reativo (por exemplo, MAL, NHS, SPA, VS ou Tiol) 15 pode ser articulado diretamente ao polímero de PEG ou pode ser articulado ao PEG através de uma molécula ligadora.

O tamanho dos polímeros úteis na invenção pode situar-se na faixa entre 500 Da a 60 kDa, por exemplo entre 1000 Da e 60 kDa, 10 kDa e 60 kDa, 20 kDa e 60 kDa, 30 kDa e 60 kDa, 40 kDa e 60 kDa, e até entre 50 20 kDa e 60 kDa. Os polímeros usados na invenção, particularmente o PEG, podem ser polímeros de cadeia reta ou podem possuir uma conformação ramificada.

As moléculas dos polímeros (PEG) úteis na invenção podem ser articuladas a um anticorpo de domínio usando-se métodos que são bem 25 conhecidos na técnica. A primeira etapa na articulação do PEG ou de outros componentes poliméricos, a um monômero de polipeptídeo de anticorpo ou multímero da invenção, é a substituição dos grupos finais hidroxila do polímero de PEG por grupos funcionais contendo eletrófilos. Particularmente, os polímeros de PEG são articulados ou aos resíduos de cisteína ou de lisina

presentes no anticorpo de domínio. Os resíduos de cisteína e de lisina podem ser de ocorrência natural, ou podem ser engendrados na molécula de polipeptídeo de anticorpo. Por exemplo, os resíduos de cisteína podem ser recombinantemente engendrados no término C de um polipeptídeo de dAb, ou os resíduos nas localizações acessíveis de solvente específico em um dAb ou outro polipeptídeo de anticorpo, podem ser substituídos com cisteína ou lisina.

O dAb de acordo com a invenção pode ser articulado a uma ou mais moléculas que possam aumentar sua meia-vida in vivo. Aquelas moléculas podem ser articuladas ao dAb através de um ligador, de modo que elas não interfiram/esticamente liguem o sítio de ligação de antígeno. Alternativamente, elas podem ser articuladas à região constante. Tipicamente, tais moléculas são polipeptídeos que de ocorrência natural in vivo e que resistem à degradação ou remoção por mecanismos endógenos. As moléculas que aumentam a meia-vida podem ser selecionadas do seguinte:

(a) proteínas da matriz extracelular, por exemplo colágeno, laminina, integrina e fibronectina;

(b) proteínas encontradas no sangue, por exemplo a fibrina α -2, macroglobulina, albumina sérica, fibrinogênio A, fibrinogênio B, proteína A amilóide sérica, proteína de heptaglobina, ubiquitina, uteroglobulina, microglobulina β -2, plasminogênio, lisozima, cistatina C, alfa-1-antitripsina e inibidor da tripsina pancreática.

(c) proteínas séricas imunes, por exemplo IgE, IgG, IgM;

(d) proteínas de transporte, por exemplo a proteína de ligação ao retinol, a microglobulina α -1;

(e) defensinas, por exemplo a beta-defensina 1, as defensinas neutrófilas 1, 2 e 3;

(f) as proteínas encontradas na barreira hematoencefálica ou nos tecidos neurais, por exemplo o receptor da melanocortina, mielina,

transportador do ascorbato;

(g)proteínas de fusão do agente neurofarmacêutico do ligando específico do receptor da transferrina (ver a U.S. 5977307); receptor de células endoteliais capilares do cérebro, transferrina, receptor da transferrina, insulina, receptor do fator 1 de crescimento insulinóide (IGF-1), receptor do
5 fator 2 de crescimento insulinóide (IGF-2), receptor da insulina;

(h)proteínas localizadas nos rins, por exemplo a policistina, o colágeno do tipo IV, o transportador K1 de ânion orgânico, o antígeno de Heymann;

10 (i)proteínas localizadas no fígado, por exemplo álcool desidrogenase, G250;

(j)fator X de coagulação do sangue;

(k)antitripsina α -1;

(l)HNF 1 α ;

15 (m)proteínas localizadas nos pulmões, por exemplo o componente secretório (liga a IgA);

(n)proteínas localizadas no coração, por exemplo a HSP 27;

(o)proteínas localizadas na pele, por exemplo a ceratina;

(p)proteína específicas dos ossos, tais como as proteínas
20 morfogênicas dos ossos (BMPs), por exemplo a BMP-2, -4, -5, -6, -7 (também referidas como proteína osteogênicas) (OP-1) e -8 (OP-2);

(q)proteínas específicas dos tumores, por exemplo antígeno trofoblasto humano, o receptor da herceptina, o receptor do estrogênio, catepsinas, por exemplo a catepsina B (encontrada no fígado e no baço);

25 (r)proteínas específicas da doença, por exemplo antígenos expressos apenas sobre as células T ativadas: incluindo LAG-3 (gene de ativação linfocítica); ligando de osteoprotegerina (OPGL) ver Nature 402, 304-309, 1999; OX40 (um membro da família de receptores de TNF, expresso sobre as células T ativadas e a única molécula de células T

coestimuladoras conhecidas como sendo especificamente suprarreguladas nas células produtoras do vírus tipo-1 da leucemia de células T humanas (HTLV-1) - ver J. Immunol. 1 de julho de 2000; 165(61): 263-270; metaloproteases (associadas com artrite/cânceres), incluindo a Drosophila CG6512, paraplegia humana, FtsH humana, AFG3L2 humana, ftsH murina, fatores de crescimento angiogênico, incluindo o fator de crescimento de fibroblasto ácido (FGF-1), o fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-2), o fator de crescimento endotelial vascular/fator de permeabilidade vascular (VEGF/VPF), o fator- α de crescimento transformador (TGF- α), o fator-alfa de necrose tumoral (TNF- α), angiogenina, interleucina-3 (IL-3), interleucina-8 (IL-8), o fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), o fator de crescimento placentado (PIGF), o fator-BB de crescimento derivado de plaquetas de midcina (PDGF), fractalcina;

(s) proteínas de estresse (proteínas de choque térmico);

(t) proteínas envolvidas no transporte de Fc; e

(u) anticorpos, fragmentos ou derivados direcionados contra proteínas endógenas, por exemplo albumina sérica.

Em uma outra forma de realização da presente invenção, o dAb de acordo com o primeiro aspecto pode ser multimerizado, como, por exemplo, hetero- ou homodímeros, hetero- ou homotrímeros, hetero- ou homotetrâmeros, ou hetero- ou homomultímeros de ordem mais elevada. A multimerização pode aumentar a intensidade de ligação do antígeno, em que a intensidade de ligação é relacionada à soma das afinidades de ligação dos sítios de ligação múltipla.

Assim, a invenção fornece um anticorpo de domínio de acordo com o primeiro aspecto, em que o anticorpo de domínio é ligado pelo menos a um outro anticorpo de domínio. Cada dAb pode ligar-se ao mesmo ou a diferentes antígenos.

Os multímeros de dAb podem ainda compreender um ou mais

dAbs que sejam ligados e em que cada dAb se liga a um antígeno diferente, ligandos multiespecíficos incluindo os assim chamados “ligandos específicos duais”. Por exemplo, os ligandos específicos duais podem compreender um par de domínios V_H ou um par de domínios V_L . Tais ligandos específicos duais são descritos na WO 2004/003019 (PCT/GB 2003/002804) no nome de Domantis Ltd.

Em um segundo aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz do dAb de acordo com o primeiro aspecto da invenção, junto com um portador ou diluente farmaceuticamente aceitáveis.

Um “portador farmaceuticamente aceitável” inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de retardamento isotônico e de absorção, e outros, os quais sejam fisiologicamente compatíveis. Exemplos de portadores farmaceuticamente aceitáveis incluem um ou mais dentre água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, dextrose, glicerol, etanol e outros, bem como as combinações destes. Em muitos casos, será preferível incluir os agentes isotônicos, por exemplo açúcares, polialcoóis tais como o manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. Substâncias farmaceuticamente aceitáveis tais como umectantes ou quantidades secundárias de substâncias auxiliares, tais como agentes umectantes ou emulsificantes, preservativos ou tampões.

A composição pode estar em uma variedade de formas, incluindo as formas de dosagem líquidas, semi-sólidas e sólidas, tais como as soluções líquidas (por exemplo, as soluções injetáveis e infusíveis), dispersões ou suspensões, tabletes, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. Preferivelmente, a composição se acha na forma de uma solução injetável para imunização. A administração pode ser intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular, transdérmica, intratecal e intra-arterial.

As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de produção e armazenagem. As composições podem ser formuladas como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para alta concentração de medicamento. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas pela incorporação do composto ativo (isto é, o dAb) na quantidade requerida em um solvente apropriado, com um ou uma combinação dos ingredientes listados acima, seguida pela esterilização de filtração.

A composição pode também ser formulada como um pó estéril para a preparação das soluções injetáveis estéreis. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, mediante o uso de um revestimento tal como a lecitina e/ou tensoativos.

Em certas formas de realização, o composto ativo pode ser preparado com um portador que proteja o composto contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastros transdérmicos, e sistemas microencapsulados de liberação. Polímeros compatíveis podem ser usados, tais como o acetato de etilenovinil, polissacarídeos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático.

A composição pode também ser formulada para administração oral. Nesta forma de realização, o dAb pode ser incluído em uma cápsula de gelatina de casca dura ou macia, comprimido em tabletes, ou incorporado diretamente na dieta do paciente.

A composição também pode ser formulada para administração retal.

Compostos ativos suplementares podem ser incorporados também na composição. O anticorpo de domínio pode ser coformulado e/ou coadministrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, por exemplo compostos antiinflamatórios, receptor de TNF- α solúvel ou um agente

químico que iniba a produção de TNF- α humano, ou anticorpos que liguem outros alvos tais como citocinas ou moléculas superficiais celulares. Alternativamente, pode ser coadministrado com um reagente imunoquímico solúvel, tal como as proteínas A, C, G ou L.

5 Uma quantidade eficaz pode incluir uma quantidade terapeuticamente eficaz ou quantidade profilaticamente eficaz do dAb da invenção. Uma quantidade terapeuticamente eficaz refere-se a uma quantidade eficaz nas dosagens e por períodos de tempo necessários para se obter o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade profilaticamente
10 eficaz refere-se a uma quantidade eficaz nas dosagens e por períodos de tempo necessários para se obter o resultado profilático desejado.

Em uma forma de realização preferida, a composição é administrada a mamíferos, preferivelmente a seres humanos ou primatas.

Em um terceiro aspecto, a presente invenção leva em conta o
15 uso de um dAb de acordo com o primeiro aspecto da invenção, em uma aplicação diagnóstica para detectar o TNF- α humano.

Por exemplo, o dAb do TNF- α anti-humano de acordo com a invenção pode ser usado para detectar o TNF- α humano, por exemplo em uma amostra biológica, tal como soro ou plasma, com o uso de um
20 imunoensaio convencional, tal como um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), um radioimunoensaio (RIA) ou de imuno-histoquímica tecidual. O dAb de TNF- α anti-humano de acordo com a invenção pode ser ensaiado em fluidos biológicos por uma imunoensaio de competição com o uso de padrões de TNF- α humano recombinante rotulados com uma
25 substância detectável e um anticorpo de TNF- α anti-humano não rotulado.

O dAb de TNF- α anti-humano de acordo com a invenção pode também ser usado para detectar o TNF- α de espécies outras que não os seres humanos, por exemplo o chimpanzé, o sagüi, o reso, camundongo, porco.

O dAb de TNF- α anti-humano de acordo com a invenção pode

também ser usado nas aplicações de cultura celular em que se deseje inibir a atividade do TNF- α .

Em um quarto aspecto, a invenção fornece um método para tratar de um distúrbio caracterizado pela atividade do TNF- α humano em um paciente humano, compreendendo administrar ao paciente uma composição farmacêutica de acordo com o segundo aspecto da invenção.

Pretende-se que um distúrbio caracterizado pela atividade do TNF- α humano inclua doenças e outros distúrbios em que a presença do TNF- α em um paciente sofrendo do distúrbio se tenha mostrado ser ou seja suspeita de ser ou responsável pela fisiopatologia do distúrbio ou um fator que contribua para uma piora do distúrbio. Preferivelmente, o distúrbio caracterizado pela atividade do TNF- α humano é selecionado do grupo consistindo de inflamação, doenças inflamatórias, sepse, incluindo choque séptico, choque endotóxico, sepse Gram-negativo e síndrome do choque tóxico; doenças autoimunes, incluindo a artrite reumatóide, a espondilite reumatóide, a osteoartrite e a artrite gotosa, alergia, esclerose múltipla, diabetes autoimune, uveíte autoimune e síndrome nefrótica; doenças infecciosas, incluindo a febre e as mialgias devidas a infecção e caquexia secundária à infecção; doença enxerto-versus-hospedeiro; crescimento tumoral ou metástase; distúrbios pulmonares, incluindo a síndrome da insuficiência respiratória adulta, pulmão de choque, doença inflamatória pulmonar crônica, sarcoidose pulmonar, fibrose pulmonar e silicose; doenças inflamatórias intestinais, incluindo a doença de Crohn e a colite ulcerativa; distúrbios cardíacos, distúrbios inflamatórios dos ossos, hepatite, perturbações da coagulação, queimaduras, lesões de reperfusão, formação de quelóides, e formação de cicatrizes teciduais.

Em todo este relatório descritivo, a palavra “compreender” ou variações tais como “compreende” ou “compreendendo”, serão entendidas como implicando a inclusão de um elemento estabelecido, inteiro ou em

etapas, ou grupo de elementos, inteiro ou em etapas, mas não a exclusão de qualquer outro elemento, inteiro ou em etapas, ou grupo de elementos, inteiros ou em etapas.

Todas as publicações mencionadas neste relatório descritivo ficam aqui incorporadas como referência. Qualquer exame dos documentos, atos, materiais, dispositivos, artigos ou coisa parecida, que tenham sido incluídos no presente relatório descritivo, é unicamente para os fins de fornecer um contexto para a presente invenção. Não se deve considerar como a admissão de que qualquer ou todas estas matérias façam parte da base da técnica anterior, ou que tenham sido de conhecimento geral comum no campo relevante para a presente invenção, como ela existiu na Austrália ou em outra parte, antes da data de prioridade de cada reivindicação deste pedido.

A fim de que a natureza da presente invenção possa ser mais claramente entendida, suas formas preferidas serão agora descritas com referência aos seguintes exemplos não limitativos.

EXEMPLO 1 MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento dos genes VL de primatas do Novo Mundo

Os DNAs genômicos de sagüi (gênero *Callithrix*, espécie desconhecida) e de macaco-da-noite (*Aotus trivirgatus*) foram obtidos da European Collection of Cell Cultures (ECACC), números do catálogo 85011419 e 90110510 respectivamente. O DNA de sagüi foi derivado da linhagem celular B95-8, enquanto o DNA do macaco-da-noite veio da linhagem celular OMK 637-69.

Os iniciadores degenerados com base nas seqüências condutoras V_{κ} e nas seqüências de sinal de recombinação (RSS) foram derivados de Walter e Tomlinson, *Antibody Engineering: A Practical Approach* (1996). Os iniciadores usados para a amplificação do DNA V_{κ} da linha germinal foram os seguintes:

Iniciador VK1BL

AATCKCAGGTKCCAGATG (SEQ ID NO: 11)

Iniciador VK1BL35a

GTTYRGGTKKGTAACT (SEQ ID NO: 12)

Iniciador VK1BL35b

5 ATGMCTTGTWACACTGTG (SEQ ID NO: 13)

A PCR genômica (30 ciclos) foi realizada com o uso da Taq polimerase com qualquer par de iniciadores VK1BLxVK1BL35a ou VK1BLxVK1BL35b. Houve sobreposição entre as seqüências clonadas e os dois conjuntos de iniciadores usados.

10 Os produtos da PCR foram clonados no kit de clonagem TOPO TA da Invitrogen (Catálogo nº K4500-01) e seqüenciados com os iniciadores M13 dianteiro e pUC reverso. A seqüência foi confirmada nas direções dianteira e reversa. De modo a ainda confirmar, as seqüências chave não foram submetidas a erros de PCR, a PCR e o processo de clonagem foram repetidos duas vezes quanto às seqüências dos sagüis. Os nucleotídeos (SEQ ID NOs: 14 a 24 e SEQ ID NOs: 36 a 41) e o aminoácido (SEQ ID NOs: 25 a 35 e SEQ ID NOs: 42 a 47) são dados na Figura 2. As seqüências 1, 2 e 3 de sagüis foram confirmadas. As seqüências 4, 5, 6, 7 e 8 foram observadas apenas na PCR inicial. As seqüências 9, 10 e 11 foram observadas apenas na PCR de repetição (isto é, segunda) e na clonagem.

Síntese Oligo e Clonagem na Seqüência Receptora

25 Quatro seqüências de CDR, a saber AATKLQS (SEQ ID NO: 1) da seqüência 1 do macaco-da-noite (SEQ ID NO: 42), EASSLQS (SEQ ID NO: 2) da seqüência 2 do macaco-da-noite (SEQ ID NO: 43) EASKLQS (SEQ ID NO: 3) da seqüência 1 de sagüi (SEQ ID NO: 25), e SASNLET (SEQ ID NO: 4) da seqüência 2 de sagüi (SEQ ID NO: 26), folha escolhidas das seqüências de aminoácidos apresentadas na Figura 2, como indicado. A seqüência 5 do Macaco-da-Noite, YASSLQS (SEQ ID NO: 48) foi observada ser idêntica a GI6176295, uma seqüência de cDNA de

Aotus nancymase (macaco-da-noite de Ma), todas as outras seqüências foram únicas.

Uma seqüência de região variável receptora (anticorpo de domínio anti-TNF) no vetor de expressão (vetor proprietário Domantis) foi digerida (25 µg) seqüencialmente com KpnI e SanDI que excisa a maioria do FR2 bem como do CDR2, como indicado no mapa de digerido de restrição. O vetor foi então purificado em gel para remover a seqüência de FR2 e cDR2 do tipo selvagem excisada.

O cozimento de oligo foi realizado pela incubação dos pares de oligo (500 pmoles de cada, como mostrado nas Figuras 4A e 4B) em 95 °C por 5 minutos, seguidos por 65 °C por 5 minutos, e depois deixados alcançar a temperatura ambiente lentamente sobre um bloco quente. As sobreposições foram então enchidas durante uma reação de Klenow na presença de dNTPs.

Maturação de Afinidade

O Composto 145 de dAb enxertado com CDR de sagüi (SEQ ID NO: 7) foi amadurecido por afinidade pela construção de 14 bibliotecas separadas, cada uma delas uma diversificação da seqüência de SEQ ID NO: 7 em um resíduo de aminoácido único. Os resíduos selecionados são mostrados sombreados abaixo.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSI (ilegível)
LHWYQQKPGKA PK LIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT (ilegível)
FTLTISLQPEDFATYY CQQVW (ilegível) P (ilegível) TFGQGKVEI
KR

A seleção baseou-se nos resíduos em CDR1 e CDR3 que são conhecidos como sendo diversificados no repertório de Ig humano maduro, e resíduos da estrutura que foram observados produzirem proteínas funcionais após a mutagênese nos dAbs relacionados. Para cada um dos resíduos selecionados, os pares de iniciadores da PCR complementares dianteiros e reverso foram projetados com degenerescência de NKK, e duas reações

iniciais da PCR foram realizadas, cada uma com um iniciador mutagênico único e iniciador de flanqueio. Após a limpeza geral, os dois produtos de PCR foram recozidos e depois amplificados com o uso de iniciadores de flanqueio sozinhos (recomposição por extensão da sobreposição da PCR; Lowman, H. L. e Clackson, T. (eds), Phage Display: A practical approach, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido). Os clones foram inicialmente testados por ELISA com o uso de TNF de fase sólida, e os clones positivos foram seqüenciados. A proteína de dAb foi purificada dos melhores clones e avaliada quanto à potência nos ensaios de ligação de receptor e nos ensaios de citotoxicidade L929. Os compostos 100 (SEQ ID NO: 9) e 123 (SEQ ID NO: 8) foram observados terem neutralização de TNF melhorada em relação ao dAb precursor, o Composto 145 (SEQ ID NO: 7).

A combinação das substituições intensificadoras da afinidade dos Compostos 100 (SEQ ID NO: 9) e 123 (SEQ ID NO: 8) produziu um dAb anti-TNF com potência ainda melhorada no ensaio de citotoxicidade de L929 (Composto 196; SEQ ID NO: 10).

RESULTADOS

POTÊNCIA DOS CLONES DE dAb ANTI-TNF NO ENSAIO DE LIGAÇÃO DO RECEPTOR (RBA) E ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.

A capacidade dos dAbs anti-TNF de inibirem a ligação do TNF ao seu receptor e de neutralizar a citotoxicidade das células L929 mediada pelo TNF, foi conduzida como segue:

Ensaio de Ligação do receptor

dAbs diversificados nas 14 posições selecionadas foram testados quanto à capacidade de inibir a ligação do TNF ao receptor 1 (p55) do TNF recombinante. Resumidamente, placas Maxisorp foram incubadas durante a noite com 30 mg/ml de anticorpo monoclonal de camundongo Fc anti-humano (Zymed, San Francisco, USA). Os reservatórios foram lavados

com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,05 % de Tween-20 e depois bloqueados com 1 % de BSA em PBS antes de serem incubados com 100 ng/ml da proteína de fusão Fc do receptor 1 de TNF (R&D Systems, Minneapolis, USA). Cada dAb foi misturado com TNF, que
5 foi adicionado aos reservatórios lavados em uma concentração final de 10 ng/ml. A ligação do TNF foi detectada com 0,2 mg/ml de anticorpo anti-TNF biotinilado (HyCult Biotechnology, Uben, Países Baixos) seguido por diluição de 1 em 500 de estreptavidina rotulada com peroxidase de raiz forte (Amersham Biosciences, Reino Unido) e depois incubação com substrato de
10 TMB (KPL, Gaithersburg, USA). A reação foi interrompida pela adição de HCl e a absorbância foi lida em 450 nm. A atividade do dAb anti-TNF levou a um decréscimo na ligação do TNF e, portanto, um decréscimo na absorbância, em comparação com o controle com apenas TNF (Figura 5).

Ensaio de Citotoxicidade L929

15 Os dAbs anti-TNF identificados pela abordagem de diversificação de minibibliotecas, incluindo os Compostos 100 (SEQ ID NO: 9) e 123 (SEQ ID NO: 8), também foram testados quanto à capacidade para neutralizar a atividade citotóxica do TNF sobre fibroblastos L929 de camundongos (Evans, T. (2000) Molecular Biotechnology 15, 243-248).
20 Resumidamente, as células L929 plaqueadas nas placas de microtitulação foram incubadas durante a noite com dAb anti-TNF, 100 pg/ml de TNF e 1 mg/ml de actinomicina D (Sigma, Poole, Reino Unido). A viabilidade celular foi medida pela leitura da absorbância em 490 nm, em seguida a uma incubação com [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (Promega, Madison, USA). A atividade do dAb anti-
25 TNF levou a um decréscimo na citotoxicidade do TNF e, portanto, a um aumento na absorbância, em comparação com o controle com apenas TNF. Os resultados, em comparação com o Composto 145 (SEQ ID NO: 7) do dAb precursor, são apresentados na Figura 6.

Será observado pelas pessoas habilitadas na técnica, que numerosas variações e/ou modificações poderão ser feitas na invenção, como mostrado nas formas de realização específicas, sem que se afaste do espírito ou escopo da invenção, como amplamente descrita. As presentes formas de

5 realização devem, portanto, ser consideradas em todos os aspectos como ilustrativas, e não restritivas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110>Peptech Limited
 <120>dAbs antiinflamatórios
 <130>WJP GHE 03 1410 3416
 <160>52
 <170>PatentIn versão 3.3

<210>1
 <211>8
 <212>PRT
 <213>Aotus trivirgatus

<400>1

Tyr Ala Ala Thr Lys Leu Gln Ser
 1 5

<210>2
 <211>8
 <212>PRT
 <213>Aotus trivirgatus
 <400>2

Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210>3
 <211>7
 <212>PRT
 <213>Callithrix, espécie desconhecida
 <400>3

Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln
 1 5

<210>4
 <211>8
 <212>PRT
 <213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>4
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210>5
 <211>324
 <212>DNA
 <213>Sintético
 <400>5

gacatccaga tgacccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtca gaggattgat agttatttac attggtacca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatagt gcatccgagt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
cgtttcagtg gcagtggaac tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg ctacgtacta cgtgcaacag gttgtgtggc gtctttttac gttcggccaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg	324

<210>6
 <211>108
 <212>PRT
 <213>Sintético

<400>6

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
20      25      30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35      40      45
Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100     105

```

<210>7
 <211>108
 <212>PRT
 <213>Sintético

<400>7

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
20      25      30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35      40      45
Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100     105

```

<210>8
 <211>108
 <212>PRT
 <213>Sintético

<400>8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210>9

<211>108

<212>PRT

<213>Sintético

<400>9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Leu Pro
 65 70 75 80
 3
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210>10

<211>108

<212>PRT

<213>Sintético

<400>10

Asp Ile Gln Met Thr Gln ser Pro ser Ser Leu ser Ala ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala ser Gln Ala Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Leu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val val Trp Arg Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210>11

<211>18

<212>DNA

<213>Sintético

<400>11

aatckcaggt kccagatg18

<210>12

<211>18

<212>DNA

<213> Sintético

<400>12

gttyrggtkk gtaacact18

<210>13

<211>18

<212>DNA

<213>Sintético

<400>13

atgmcttgtw acactgtg18

<210>14

<211>267

<212>DNA

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>14

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc	60
atcacttgcc gggcgagtc gacattaac aagtggtag cctgggtatca gcagaaacca	120
gggacagtcc ctaagccccc gatcrtgag gcatccaaat tgcagaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggtac tgggacatat tttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagatgctg caacttatta ctgtcag	267

<210>15

<211>267

<212>DNA

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>15

gacatccaga tgatccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgct gggcaagtca ggggtattagc cactgggttag cctgggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatagt gcatcaaatt tagaaacagg ggtcccatca	180
agggttcagtg gaagtggatc caggacagat tttactctca ccattcagcag cctgcagcct	240
gaagatattg caacatatta ctgtcaa	267

<210>16

<211>267

<212>DNA

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>16

gacatccaga tgaccagac tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtca ggggtattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatagg gcatcaaatt tggaaacagg ggtcccatca	180
agattcagcg gaagtggatc tgggacagat tttactctca ccattcagcag tctgcagcct	240
gaagatattg caacatatta ctgtcaa	267

<210>17

<211>267

<212>DNA

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400> 17	
gacatccaga tgatccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgct gggcaagtca ggggtattagc cactgggttag cctgggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatagt gcatcaaatt taggaacagg ggtcccatca	180
agggttcagtg gaagtggatc caggacagat tttactctca ccattcagcag cctgcagcct	240
gaagatattg caacatatta ctgtcaa	267

<210>18

<211>267

<212>DNA

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>18

gacatccaga tgaccagtc tccatctctc ctgactgcat ctgtaggaga caagtcacc	60
atcacttgcc gggcgtgca ggcattaac aagtgggttag cctgggtatca gcagaaacca	120
gggacagtc ctaagccct gatctatag gcatcaaatt tgcgaagtgg ggtcccatca	180
agggttcagcg gcaptggatc tgggacarat tttactctca ccattcagcag cctgcagcct	240
gaagatgctg caacttatta ctgtcag	267

<210>19

<211>267

<212>DNA

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>19

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagttacc	60
atcacttgcc gggcgagtc ggcatttag aattatttag cctgggtatca gcagaaacca	120
gggaaaactc ctaggctcct gatctatgct gcattcagtt tacaactgg gattccctct	180
cggttcagcg gcagtggatc tgggacagac tacactetca ccatcagcag cctgcagttc	240
gaagatgttg caatttatta ctgtcaa	267

<210>20

<211>267

<212>DNA

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>20

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc	60
atcacttgcc gggcgagtc ggcattaac aagtggtag cctgggtatca gcagaaacca	120
gggacagtcc ctaagccct gatctatgag gcattcaaat tgcagaagtgg ggtcccatca	180
aggctcagcg gcagtggatc tgggacatat ttcactetca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagatgttg caacttatta ctgtcag	267

<210>21

<211>267

<212>DNA

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>21

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc	60
atcacttgcc gggcgagtc ggcattaac aagtggtag cctgggtatca gcagaaacca	120
gggacagtcc ctaagccct gatctatgag gcattcaaat tgcagaagtgg ggtcccatca	180
aggctcagcg gcagtggatc tgggacatat ttcactetca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagatgttg caacttatta ctgtcag	267

<210>22

<211>267

<212>DNA

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>22

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc	60
gtcacttgcc gggcgagtc ggcattaac aagtggtag cctgggtatca gcagaaacca	120
gggacagtcc ctaagccct gatctatgag gcattcaaat tgcagaagtgg ggtcccatca	180
aggctcagcg gcagtggatc tgggacatat ttcactetca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagatgttg caacttatta ctgtcag	267

<210>23

<211>267

<212>DNA

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>23

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc      60
atcacttgcc gggcgagtcg ggacattaac aagtgggttag cctgggtatca gcagaaacca    120
gggacagtcg ttaagccctt gatctatgag gcatccaaat tgc aaagtgg ggtcccatca    180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat tttactctca ccacagcag cctgcagcct     240
gaagatgctg caacttatta ctgtcag                                           267

```

<210>24

<211>267

<212>DNA

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>24

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc      60
atcacttgcc gggcgagtcg ggacattaac aagtgggttag cctgggtatca gcagaaacca    120
gggacagtcg ttaagccctt gatctatgag gcatccaaat tgc aaagtgg ggtcccatca    180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat tttactctca ccacagcag cctgcagcct     240
gaagatgctg caacttatta ctgtcag                                           267

```

<210>25

<211>89

<212>PRT

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>25

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
1       5       10      15
Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
20      25      30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
35      40      45
Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
85

```

<210>26

<211>89

<212>PRT

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>26

Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser His Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>27

<211>89

<212>PRT

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 8

<210>28

<211>89

<212>PRT

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>28

Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser His Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>29
 <211>89
 <212>PRT
 <213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>29

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Cys Gln Asp Ile Asn Lys Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>30

<211>89

<212>PRT

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>31

<211>89

<212>PRT

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Leu Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>32

<211>89

<212>PRT

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
 20 25 30
 Ser Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>33

<211>89

<212>PRT

<213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>34
 <211>89
 <212>PRT
 <213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
 20 25 30

11

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Leu Lys Pro Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>35
 <211>89
 <212>PRT
 <213>Callithrix, espécie desconhecida

<400>35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Leu Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>36
 <211>267
 <212>DNA
 <213>Aotus trivirgatus

<400>36

<400> 36	60
gacatccaga tgaccagtc tccatccttc ctgtcrgcat ctgcaggaga cagagtcacc	
atcacctgcc aggtgagtc ggaattagc agtgaattac tctggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctatgctctt gatctatgct gcaaccaat tgcagtcggg aatcccatcc	180
cggttcagtg gccatgpatc tgggacagat ttactctca ccacagcag cctgcagcct	240
qatgattctg ctacttatta ctgtcaa	267

<210>37
 <211>267
 <212>DNA
 <213>Aotus trivirgatus

<400>37

```

gacatccaga tgaccacgac tgcattctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc    60
attacttgcc aggcgagtcg gggcattacc agtgatttag cctgggtatca gcagaaacca    120
gggaaagcct ctaagctcct gatctatgag gcatccagtt tacaaagcga ggtcccatca    180
aggttcagcg gcagtggaac tgggagagat ttactctca ccacagcag cctgcagcct    240
gagatatttg caacttatta ctgtcaa                                           267

```

<210>38
 <211>267
 <212>DNA
 <213>Aotus trivirgatus

<400>38

```

gacatccaga tgaccacgac tgcattctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc    60
attacttgcc aggcgagtcg agcattttac aattatttag cctgggtatca gcagaaacca    120
gggaaagcct ctaggctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaaactgg gattccctct    180
cgggttcagtg gcagtggaac tgggacagac tacactctca ccacagcag cctgcagcct    240
gatgattttg caacttatta ctgtcaa                                           267

```

<210>39
 <211>267
 <212>DNA
 <213>Aotus trivirgatus

<400>39

```

gacatccaga tgaccacgac tgcattctcc ctgcttgcac ctgtaggaga caaagtcacc    60
attacttgcc gggcaagtcg gggcatttag agctggtrag cctgggtatca gcagaaacca    120
gggaaagccc ctaagctcct gatccataag gcatcaaat tggaaacagg ggtcccatca    180
aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttactctca ccacagcag cctgcagcct    240
gaagatattg caacttatta ctgtcaa                                           267

```

<210>40
 <211>267
 <212>DNA
 <213>Aotus trivirgatus

<400>40

```

gacatccaga tgaccacgac tgcattctcc ctgactgcat ctgtaggaga caaagtcacc    60
attacttgcc gggcaagtcg gggcatttag aataatttag cctgggtatca gcagaaacca    120
gggaaagccc ctaagccctt gatctattat gcatccagtt tgcaaagcgg ggtcccatca    180
aggttcagcg gcagtggaac tggggcagat tacactctca ccacagcag cctgcagcct    240
gaagatattg caacttatta ctgtcaa                                           267

```

<210>41
 <211>267
 <212>DNA
 <213>Aotus trivirgatus

<400>41

gacaaccaga tgatccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagccagtc gagtattagc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggacagtc ctaagcctct gatctargac gcatccaaat tgctaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gctgtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaa 267

<210>42

<211>89

<212>PRT

<213>Aotus trivirgatus

<400>42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Glu
 20 25 30
 Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Met Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Thr Lys Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 His Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>43

<211>89

<212>PRT

<213>Aotus trivirgatus

<400>43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Glu
 20 25 30
 Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Met Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Thr Lys Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 His Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85
 Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>44

<211>89

<212>PRT

<213>Aotus trivirgatus

<400>44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>45

<211>89

<212>PRT

<213>Aotus trivirgatus

<400>45

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 His Lys Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>46

<211>89

<212>PRT

<213>Aotus trivirgatus

<400>46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Thr Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>47
 <211>89
 <212>PRT
 <213>Aotus trivirgatus

<400>47

Asp Asn Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Lys Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Cys Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210>48
 <211>8
 <212>PRT
 <213>Aotus trivirgatus

<400>48

Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

16

<210>49
 <211>8
 <212>PRT
 <213>Sintético

<400>49

Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser
 1 5

<210>50
 <211>108
 <212>PRT
 <213>Sintético

<400>50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210>51
 <211>108
 <212>PRT
 <213>Sintético

<400>51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210>52
 <211>108
 <212>PRT
 <213>Sintético

<400>52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Leu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo de domínio recombinante (dAb) que se liga ao TNF- α humano, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio variável de cadeia pesada ou leve de imunoglobulina, em que referido domínio variável compreende pelo menos uma região determinante da complementaridade (CDR) tendo uma sequência derivada de um primata do Novo Mundo, em que a CDR é selecionada do grupo consistindo de AATKLQS (SEQ ID NO: 1), EASSLQS (SEQ ID NO: 2), EASKLQS (SEQ ID NO: 3) e SASNLET (SEQ ID NO: 4).

2. dAb recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a CDR é CDR2.

3. dAb recombinante de acordo com a reivindicação 1 ou com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que tem uma sequência selecionada das seqüências consistindo de:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLI
YSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWRPFT
FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 7);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLI
YSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWRPFT
FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 8);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLI
YSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWRPFT
FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 9);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLI
YSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWRPFT
FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 10);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKPPKLLIY
SASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWRPFTF
GQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 50);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLI
YSASNLETGVPSRFSGRGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVVRPFT
TFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 51); e

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLI
YSASNLETGVPSRFSGRGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVVRPFT
FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 52).

4. dAb recombinante de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que tem a sequência:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLI
YSASNLETGVPSRFSGRGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVVRPFT
FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 10).

5. dAb recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a CDR1 e/ou a CDR3 são modificadas para melhorar a ligação ao antígeno.

6. dAb recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que tem baixa imunogenicidade nos seres humanos.

7. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que codifica o dAb como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo de domínio recombinante (dAb) como definido nas reivindicações 1 a 6, junto com um carreador ou diluente farmacêuticamente aceitáveis.

9. Método para detectar o TNF- α humano em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende o contato da amostra com uma quantidade eficaz de um dAb recombinante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e a detecção da quantidade de dAb ligado.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado

pelo fato de que a amostra é uma amostra biológica.

11. Método para tratar de um distúrbio distinguido pela atividade do TNF- α humano em um indivíduo humano, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 8.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o distúrbio distinguido pela atividade do TNF- α humano é selecionado do grupo consistindo de inflamação, doenças inflamatórias, sepse, incluindo o choque séptico, o choque endotóxico, a sepse Gram-negativa e a síndrome do choque tóxico; a doença autoimune, incluindo a artrite reumatóide, a espondilite reumatóide, a osteoartrite e a artrite de gota, alergia, esclerose múltipla, diabetes autoimune, uveíte autoimune e síndrome nefrótica; doença infecciosa, incluindo febre e mialgias devidas à infecção e caquexia secundária à infecção; enxerto versus doença hospedeira; crescimento tumoral ou metástase; distúrbios pulmonares, incluindo a síndrome da insuficiência respiratória em adulto, pulmão de choque, doença inflamatória pulmonar crônica, sarcoidose pulmonar, fibrose e silicose pulmonares; distúrbios inflamatórios intestinais incluindo a doença de Crohn e a colite ulcerativa; distúrbios cardíacos; distúrbios inflamatórios ósseos, hepatite, distúrbios da coagulação, queimaduras, lesão de reperfusão, formação de quelóides e formação de cicatrizes teciduais.

FIGURA 1

1	GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT GCA TCC TCT CTG TCT GCA TCT GTA	45
1	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val	15
46	GGA GAC CGT CTC ACC ATC ACT TGC CCG GCA AGT CAG AGC ATT GAT	90
16	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp	30
91	AGT TAT TTA CAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGC AAA CCC CCT AAG	135
31	Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	45
136	CTC CTG ATC TAT AGT GCA TCC CAG TTG CAA AGT GGC GTC CCA TCA	180
46	Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser	60
181	CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGC ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC	225
61	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	75
226	AGC AGT CTC CAA CCT GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG	270
76	Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	90
271	GTT GTG TGG CGT CCT TTT ACG TTC GGC CAA GGC ACC AAG GTG GAA	315
91	Val Val Trp Arg Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu	105
316	ATC AAA CGG	324
106	Ile Lys Arg	

FIGURA 2

Seqüências de sagüis

Seqüência 1 de nucleotídeos de sagüis (SEQ ID NO: 14)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
 ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
 GTCCCTAAGCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
 ACTTATTACTGTCAG

Seqüência 4 de nucleotídeos de sagüis (SEQ ID NO: 15)

GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
 ACTTGCTGGGCAAGTCAGGGTATTAGCCACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
 GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAGTGCATCAAATTTAGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT
 GGAAGTGGATCCAGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
 ACATATTACTGTCAA

Seqüência 3 de nucleotídeos de sagüis (SEQ ID NO: 16)

GACATCCAGATGACCCAGACTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
 ACTTGCCGGGCAAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
 GCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGGGCATCAAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGATTTCAGC
 GGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
 ACATATTACTGTCAA

Seqüência 4 de nucleotídeos de sagüis (SEQ ID NO: 17)

GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
 ACTTGCTGGGCAAGTCAGGGTATTAGCCACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
 GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAGTGCATCAAATTTAGGAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT
 GGAAGTGGATCCAGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
 ACATATTACTGTCAA

Seqüência 5 de nucleotídeos de sagüis (SEQ ID NO: 18)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
 ACTTGCCGGGCGTGTGAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
 GTCCCTAAGCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
 ACTTATTACTGTCAG

Seqüência 6 de nucleotídeos de sagüis (SEQ ID NO: 19)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGCTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTTACCATC
 ACTTGCCGGGCGAGTCAGGGCATTAGTAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
 ACTCCTAGGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTACAACTGGGATTCCCTCTCGGTTTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACAGACTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATGTTGCA
 ATTTATTACTGTCAA

Seqüência 7 de nucleotídeos de sagüis (SEQ ID NO: 20)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
 ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
 GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGCTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACATATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
 ACTTATTACTGTCAG

Seqüência 8 de nucleotídeos de sagüis (SEQ ID NO: 21)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
 ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTCAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
 GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
 ACTTATTACTGTCAG

Seqüência 9 de nucleotídeos de sagüis (SEQ ID NO: 22)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCGTC
 ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
 GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
 ACTTATTACTGTCAG

Seqüência 10 de nucleotídeos de sagüis (SEQ ID NO: 23)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
 ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
 GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
 ACTTATTACTGTCAG

Seqüência 11 de nucleotídeos de sagüis (SEQ ID NO: 24)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
 ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
 GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATTAAGGTTTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
 ACTTATTACTGTCAG

Seqüência 1 de aminoácidos de sagüis (SEQ ID NO: 25)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
 GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Seqüência 2 de aminoácidos de sagüis (SEQ ID NO: 26)

DIQMIQSPSSLSASVGDRVTTITCWSAQGISHWLAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS
 GSGSRTDFTLTISSLQPEDATYYCQ

Seqüência 3 de aminoácidos de sagüis (SEQ ID NO: 27)

DIQMTQTPSSLSASVGDRVTTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLETGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDATYYCQ

Seqüência 4 de aminoácidos de sagüis (SEQ ID NO: 28)

DIQMIQSPSSLSASVGDRVTTITCWSAQGISHWLAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLTGVPSRFS
 GSGSRTDFTLTISSLQPEDATYYCQ

Seqüência 5 de aminoácidos de sagüis (SEQ ID NO: 29)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRACQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
 GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Seqüência 6 de aminoácidos de sagüis (SEQ ID NO: 30)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKTPRLLIYAASSLOTGIPSRFS
 GSGSGTDYTLTISSLQSEDVAIYYCQ

Seqüência 7 de aminoácidos de sagüis (SEQ ID NO: 31)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
 GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Seqüência 8 de aminoácidos de sagüis (SEQ ID NO: 32)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWSAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
 GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Seqüência 9 de aminoácidos de sagüis (SEQ ID NO: 33)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
 GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Seqüência 10 de aminoácidos de sagüis (SEQ ID NO: 34)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVLKPLIYEASKLQSGVPSRFS
 GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Seqüência 11 de aminoácidos de sagüis (SEQ ID NO: 35)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPLRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Seqüências de macacos-da-noite**Seqüência 1 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 36)**

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTTCTGTCTGCATCTGCAGGAGACAGAGTCACCATC
ACCTGCCAGGTGAGTCAGGGAATTAGCAGTGAATTACTCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCATATGCTCTTGATCTATGCTGCAACCAAATTGTCAGTCGGGAATCCCATCTCGGTTTCAGT
GGCCATGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCT
ACTTATTACTGTCAA

Seqüência 2 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 37)

GACATCCAGATGACCCAGTCTGCATTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATT
ACTTGCCAGGCGAGTCAGGGCATTACCAGTGATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAGCCAGGGAAC
GCCTCTAAGCTCCTGATCTATGAGGCATCCAGTTTACAAAGCGAGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGAGAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGTA
ACTTATTACTGTCAA

Seqüência 3 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 38)

GACATCCAGATGACCCAGACTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAAGACATTTACAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
ACTCCTAGGCTCTTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGATTCCCTCTCGGTTTCAGT
GGCAGTGGATCTGGGACAGACTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCC
ACTTATTACTGTCAA

Seqüência 4 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 39)

GACATCCAGATGACCCAGACTCCATCCTCCCTGCCTGCATCTGTAGGAGACAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCAAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCAAGCTCCTGATCCATAAGGCATCAAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT
GGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATCGCA
ACATATTACTGTCAA

Seqüência 5 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 40)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGACAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAATAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCAAGCCCCCTGATCTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGCGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGGCAGATTACACTCTCACCACCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA
ACTTATTACTGTCAA

Seqüência 6 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 41)

GACAACCAGATGATCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
 ACTTGCCGAGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
 GTCCCTAAGCCTCTGATCTATGACGCATCCAAATTGCTAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACT
 GGCTGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA
 ACTTATTACTGTCAA

Seqüência 1 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 42)

DIQMTQSPSFLSASAGDRVTTTCQVSQGISSELLWYQQKPGKAPMLLIYAATKLQSGIPSRFS
 GHGSGTDFTLTISLQPDDEFATYYCQ

Seqüência 2 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 43)

DIQMTQSAFSLSASVGDRVTTTCQASQGITSDLAWYQQKPGNASKLLIYEASSLQSEVPSRFS
 GSGSGRDFTLTISLQPEDFVTTYCQ

Seqüência 3 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 44)

DIQMTQTPSSLSASVGDRVTTTCRASQDIYNLAWYQQKPGKTPRLLIYAASSLQTGIPSRFS
 GSGSGTDYTLTISLQPDDEFATYYCQ

Seqüência 4 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 45)

DIQMTQTPSSLPASVGDKVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIHKASNLETGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ

Seqüência 5 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 46)

DIQMTQSPSSLTASVGDKVTITCRASQGISNNLAWYQQKPGKAPKPLIYYASSLQSGVPSRFS
 GSGSGADYTLTTSSLQPEDFATYYCQ

Seqüência 6 de nucleotídeos de macacos-da-noite (SEQ ID NO: 47)

DNQMIQSPSSLTASVGDRVTTTCRASQSISSWLAWYQQKPGTVPKPLIYDASKLLSGVPSRFS
 GCGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ

FIGURA 3

D T Q M T Q S P S S L S A S V G U R V T I T C R A S U
 1 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCCCTGTCAACATCACTTGCCTGGGCAAGTCA 80
 1 CTGTAGGCTCTACTGCGTCACAGGTAGGAGAGACAGACGTAGACATCCTCTGCCACAGTGGTGTGTGAACGGGCCCTTTCAGT 80

 S I D S Y L H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S W
 81 GACCATTTGATAGTTTATACATTGCTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATACTCCATCCGAGT 160
 81 CTCGTAACTATCAATAAATGTAACCATGCTCGTCTTTGGTCCCTTTCCGGGATTCGACCACTAGATATCACTAGGCTCA 160

 KpnI

L G S G V P S R P S O S G S G T D F T L T I S S L Q P
 161 TGCAAAAGTGGGGTCCCATCACCTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAOCAGTCTGCNACCT 240
 161 ACGTTTCACCTCCACCTAGTGC AAA GTCAACCTACCTAGACCCCTGTCTAAACTCAGAGTGGTGTGTCTCAGACGTTCGA 240

 SmaDI

 E D F A T Y Y C Q Q V V W R P P T F G U G T K V E I R
 241 GAAGATTTTGCTACCTACTACTGTCAACAGCTTCTCTGGGTCCCTTTTACGTTCGGCCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA 320
 241 CTTCTAAAACGATGCATGATGACAGTTGTCCAACACACCCGAGGAAAATGC AA GCGGTTCCTTGGGTTCACCTTTAGTT 320

 R
 321 ACCG 324
 321 TGCC 324

FIGURA 4A

Sequência do dAb receptor
Sequência 1 de macaco-da-noite
Genômico 1 da noite
Reverso 1 genômico de macaco-da-noite
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite
Sequência 2 de macaco-da-noite
Genômico 2 da noite
Reverso 2 genômico de macaco-da-noite
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite
Sequência 1 de sagüi
Genômico 1 de sagüi
Reverso 1 genômico de sagüi
Confirmação de abstinência de sagüi
Sequência 2 de sagüi
Genômico 2 de sagüi
Reverso 2 genômico de sagüi
Confirmação de abstinência de sagüi

[The page contains several lines of extremely faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document.]

Sequência do dAb receptor
Sequência 1 de macaco-da-noite
Genômico 1 da noite
Reverso 1 genômico de macaco-da-noite
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite
Sequência 2 de macaco-da-noite
Genômico 2 da noite
Reverso 2 genômico de macaco-da-noite
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite
Sequência 1 de sagüi
Genômico 1 de sagüi
Reverso 1 genômico de sagüi
Confirmação de abstinência de sagüi
Sequência 2 de sagüi
Genômico 2 de sagüi
Reverso 2 genômico de sagüi
Confirmação de abstinência de sagüi

[illegible]

Sequência do dAb receptor
Sequência 1 de macaco-da-noite
Genômico 1 da noite
Reverso 1 genômico de macaco-da-noite
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite
Sequência 2 de macaco-da-noite
Genômico 2 da noite
Reverso 2 genômico de macaco-da-noite
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite
Sequência 1 de sagüi
Genômico 1 de sagüi
Reverso 1 genômico de sagüi
Confirmação de abstinência de sagüi
Sequência 2 de sagüi
Genômico 2 de sagüi
Reverso 2 genômico de sagüi
Confirmação de abstinência de sagüi

```

      179      180      181      182      183      184      185      186      187      188      189      190      191      192      193      194
CCCAACAGCGGTTCCGATGACGTTTTCAGTGGTATGTGGATCTGGGACACATACCACTCTCCACACACACCAATCTGCAACCT
.....G..A.....T..G.....CA.....
...
GTCG.....
GTCG.....
A.....A..G.....C.....C.....E.....C.....G.....
A.....
A.....C.....
A.....C.....
A.....A..G.....C.....T.....T.....C.....G.....
...
.....
AG.....CA.....A..C.....A.....CA.....T.....C.....G.....
AG
AG.....CA.....
AG.....CA.....

```

Sequência do dAb receptor
Sequência 1 de macaco-da-noite
Genômico 1 da noite
Reverso 1 genômico de macaco-da-noite
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite
Sequência 2 de macaco-da-noite
Genômico 2 da noite
Reverso 2 genômico de macaco-da-noite
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite
Sequência 1 de sagüi
Genômico 1 de sagüi
Reverso 1 genômico de sagüi
Confirmação de abstinência de sagüi
Sequência 2 de sagüi
Genômico 2 de sagüi
Reverso 2 genômico de sagüi
Confirmação de abstinência de sagüi

.....⁷⁶⁸⁰⁷⁸⁸⁰⁷⁹⁷⁹⁸¹⁸²
GAGGATTTTCACCACTACTCTCACAACGGTCTGTACCGCCCTTTACGTTGCCCLBGGACCAGGTGGAAATCAA
..T.....T..

.....
.....EA.F.E.....

.....
.....GC.A.T.Z.G.....

.....
.....A.A.A.Q.....

.....

Sequência do dAb receptor
Sequência 1 de macaco-da-noite
Genômico 1 da noite
Reverso 1 genômico de macaco-da-noite
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite
Sequência 2 de macaco-da-noite
Genômico 2 da noite
Reverso 2 genômico de macaco-da-noite
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite
Sequência 1 de sagüi
Genômico 1 de sagüi
Reverso 1 genômico de sagüi
Confirmação de abstinência de sagüi
Sequência 2 de sagüi
Genômico 2 de sagüi
Reverso 2 genômico de sagüi
Confirmação de abstinência de sagüi

1000

FIGURA 4B

Sequência do dAb receptor	
Sequência 1 de macaco-da-noite	
Genômico 1 da noite	
Reverso 1 genômico de macaco-da-noite	
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite	
Sequência 2 de macaco-da-noite	
Genômico 2 da noite	
Reverso 2 genômico de macaco-da-noite	
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite	
Sequência 1 de sagüí	
Genômico 1 de sagüí	
Reverso 1 genômico de sagüí	
Confirmação de abstinência de sagüí	
Sequência 2 de sagüí	
Genômico 2 de sagüí	
Reverso 2 genômico de sagüí	
Confirmação de abstinência de sagüí	

Sequência do dAb receptor	
Sequência 1 de macaco-da-noite	
Genômico 1 da noite	
Reverso 1 genômico de macaco-da-noite	
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite	
Sequência 2 de macaco-da-noite	
Genômico 2 da noite	
Reverso 2 genômico de macaco-da-noite	
Confirmação de abstinência de macacos-da-noite	
Sequência 1 de sagüí	
Genômico 1 de sagüí	
Reverso 1 genômico de sagüí	
Confirmação de abstinência de sagüí	
Sequência 2 de sagüí	
Genômico 2 de sagüí	
Reverso 2 genômico de sagüí	
Confirmação de abstinência de sagüí	

FIGURA 5

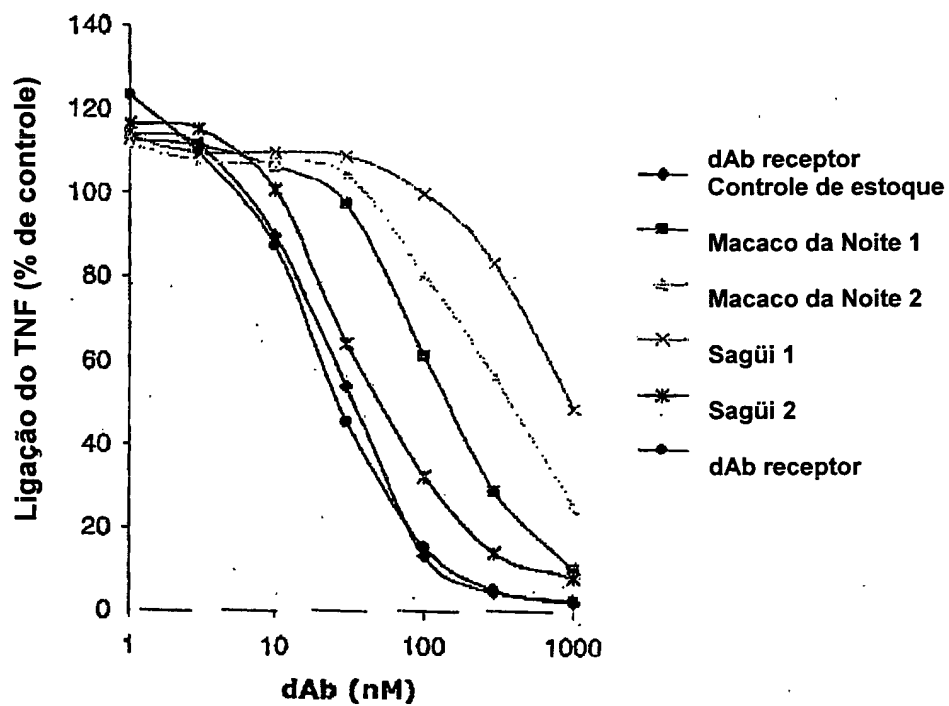
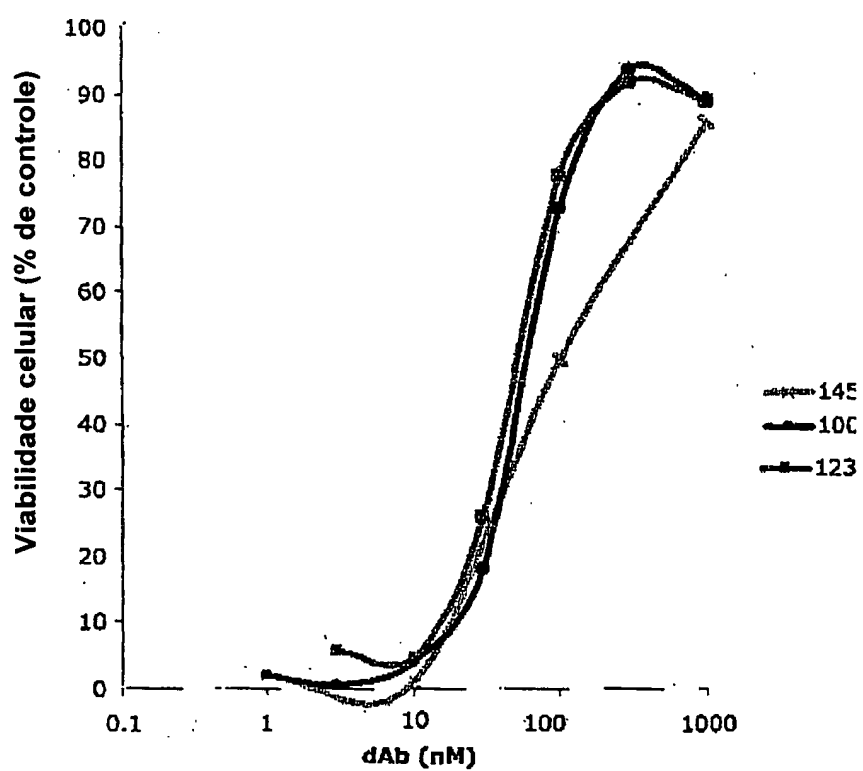


FIGURA 6



RESUMO

“ANTICORPO DE DOMÍNIO RECOMBINANTE, MOLÉCULA DE
ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E,
MÉTODOS PARA DETECTAR O TNF-ALFA HUMANO EM UMA
5 AMOSTRA E PARA TRATAR DE UM DISTÚRPIO DISTINGUIDO
PELA ATIVIDADE DO TNF-ALFA HUMANO EM UM INDIVÍDUO
HUMANO”

A presente invenção fornece um anticorpo de domínio
recombinante (dAb) que se liga ao TNF- α humano, o dAb compreendendo o
10 domínio variável de cadeia pesada ou leve de imunoglobulina, em que
referido domínio variável compreende pelo menos uma região determinante
da complementaridade (CDR) tendo uma sequência derivada de um primata
do Novo Mundo, em que a CDR é seleccionada do grupo consistindo de
YAATKLQS (SEQ ID NO: 1), YEASSLQS (SEQ ID NO: 2), YEASKLQS
15 (SEQ ID NO: 3) e YSASNLET (SEQ ID NO: 4). O anticorpo de domínio
recombinante é usado para detectar o TNF- α humano em uma amostra, e para
tratar de um distúrbio caracterizado pela atividade do TNF- α humano.