

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2006.05.17	(73) Titular(es): MORPHOSYS AG	
(30) Prioridade(s): 2005.05.18 US 682009 P	LENA-CHRIST-STRASSE 48 82152	DE
(43) Data de publicação do pedido: 2008.02.20	MARTINSRIED/MÜNCHEN	
(45) Data e BPI da concessão: 2014.10.29 009/2015	(72) Inventor(es):	
	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO	PT
	R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA	

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-FEC-GM E AS RESPECTIVAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO TEM POR OBJECTO REGIÕES RECOMBINANTES DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO, ANTICORPOS E OS RESPECTIVOS FRAGMENTOS FUNCIONAIS, QUE SÃO ESPECÍFICOS PARA FEC-GM, QUE DESEMPENHAM UM PAPEL ESSENCIAL EM VÁRIOS DISTÚRBIOS OU ESTADOS CLÍNICOS. ESTES ANTICORPOS, DE ACORDO COM ISTO, PODEM SER UTILIZADOS PARA TRATAR, POR EXEMPLO, DOENÇAS INFLAMATÓRIAS, TAIS COMO ARTRITE REUMATÓIDE. OS ANTICORPOS DA PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM PODEM SER UTILIZADOS NO DOMÍNIO DOS DIAGNÓSTICOS, ASSIM COMO, PARA A INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO FEC-GM NA PROGRESSÃO DE VÁRIOS DISTÚRBIOS. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM TEM POR OBJECTO AS SEQUÊNCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM OS ANTICORPOS ANTERIORES, OS VECTORES QUE OS CONTÊM, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E ESTOJOS COM INSTRUÇÕES PARA A RESPECTIVA UTILIZAÇÃO.

DESCRIÇÃO

ANTICORPOS ANTI-FEC-GM E AS RESPECTIVAS UTILIZAÇÕES

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O factor de estimulação de colónias de granulócitos-macrófagos, FEC-GM, foi originalmente identificado como um factor de crescimento hemopoiético. É produzido por um certo número de tipos de células, incluindo linfócitos, monócitos, células endoteliais, fibroblastos e algumas células malignas (Metcalf et al., 1986; Clark e Kamen, 1987; Hart et al., 1988; Metcalf et al., 1986). Para além de terem uma função de estimulação do crescimento e diferenciação de células hemopoiéticas precursoras, também se descobriu que o FEC-GM tem uma variedade de efeitos sobre as células do sistema imunitário que expressam o receptor de FEC-GM (para revisão ver: Hamilton, 2002; de Groot et al., 1998). A mais importante destas funções é a activação de monócitos, macrófagos e granulócitos em vários processos imunitários e inflamatórios (Gasson et al., 1990b; Gasson et al., 1990a; Hart et al., 1988; Rapoport et al., 1992).

O FEC-GM maduro é uma proteína monomérica com 127 aminoácidos e com dois sítios de glicosilação. O grau variável de glicosilação resulta numa gama de peso molecular entre 14 kDa e 35 kDa. O FEC-GM glicosilado e não glicosilado exibe uma actividade semelhante *in vitro* (Cebon et al., 1990). A análise cristalográfica de FEC-GM revelou uma estrutura em forma de barril composta por quatro hélices alfa curtas (Diederichs et al., 1991). A estrutura global é semelhante a outros factores de crescimento, como a hormona de crescimento, a interleucina 1 e a interleucina 4.

O FEC-GM exerce a sua actividade biológica por meio da ligação ao seu receptor (Kastelein e Shanafelt, 1993; Sisson e Dinarello, 1988). Os sítios mais importantes da expressão do receptor de FEC-GM (R-FEC-GM) estão na superfície celular das células mielóides e das células endoteliais, enquanto os linfócitos são negativos para R-FEC-GM. O receptor natural é composto, pelo menos, por duas subunidades, alfa e beta. A subunidade alfa confere especificidade ao ligando e liga FEC-GM com uma afinidade nanomolar (Gearing et al., 1989; Gasson et al., 1986). A subunidade beta faz também parte dos complexos dos receptores de interleucina 3 e de interleucina 5 e, em associação com a subunidade alfa do receptor de FEC-GM e FEC-GM, leva à formação de um complexo com uma afinidade de ligação picomolar (Hayashida et al., 1990). Os domínios de ligação para o receptor em FEC-GM já foram mapeados: o FEC-GM interage com a subunidade beta do seu receptor, por via de uma região muito restrita, na primeira hélice alfa de FEC-GM (Shanafelt et al., 1991b; Shanafelt et al., 1991a; Lopez et al., 1991). A ligação à subunidade alfa pode ser mapeada com até à terceira hélice alfa, a hélice C, os resíduos iniciais do anel que reúne as hélices C e D e até à cauda do terminal carboxi de FEC-GM (Brown et al., 1994).

A formação do complexo trimérico do receptor de FEC-GM leva à activação de cascatas de sinalização do complexo, que envolvem moléculas das famílias JAK/STAT, Shc, Ras, Raf, as cinases MAP, fosfatidilinositol-3-cinase e NFkB, levando finalmente à transcrição de c-mic, c-fos e c-jun. A activação é induzida principalmente pela subunidade beta do receptor (Hayashida et al., 1990; Kitamura et al., 1991; Sato et al., 1993). A subunidade beta partilhada é também responsável pela sobreposição das funções exercidas por IL-3, IL-5 e FEC-GM (para revisão ver: de Groot et al., 1998).

Independentemente do seu crescimento hemopoiético e da actividade de estimulação da diferenciação, o FEC-GM funciona especialmente como uma citocina pró-inflamatória. Os macrófagos e os monócitos, assim como os neutrófilos e os eosinófilos, tornam-se activos por meio de FEC-GM, resultando na libertação de outras citocinas e quimiocinas, proteases de degradação da matriz, numa expressão acrescida de HLA e numa expressão acrescidas das moléculas de adesão de células ou dos receptores para quimiocinas CC. Estas últimas, por sua vez, levam a um aumento da quimiotaxia das células inflamatórias em tecidos inflamados (Chantry et al., 1990; Hamilton, 2002; Sisson e Dinarello, 1988; Zhang et al., 1998; Hamilton et al., 1993; Lopez et al., 1986; Cheng et al., 2001; Gomez-Cambronero et al., 2003). Muitas vezes, o FEC-GM exerce a sua actividade em sinergia com outros factores de estimulação inflamatória como outras citocinas ou LPS, por exemplo, neutrófilos tratados com FEC-GM, em combinação, por exemplo, com LPS, vão exhibir uma proliferação oxidativa acrescida (Kaufman et al., 1989; Rapoport et al., 1992).

FEC-GM como alvo para uma terapêutica anti-inflamatória:

Devido às suas diferentes funções de activação no sistema imunitário, pode considerar-se o FEC-GM como um alvo para uma terapêutica anti-inflamatória. As doenças inflamatórias crónicas e agudas, como a artrite reumatóide (AR), a esclerose múltipla (EM), a doença de Crohn, a psoríase, a asma, a dermatite atópica ou o choque, podem beneficiar da actividade de bloqueio de FEC-GM e da subsequente redução de actividades prejudiciais das células que respondem a FEC-GM (Hamilton, 1993; Zhang et al., 1998; Hamilton, 2002).

Artrite:

Vários grupos demonstraram que o FEC-GM assim como o seu receptor estão presentes nas articulações sinoviais de doentes com artrite (Alvaro-Gracia et al., 1991; Xu et al., 1989; Haworth et al., 1991). Além disso, o FEC-GM tem demonstrado causar erupções de artrite reumatóide em doentes tratados com FEC-GM para neutropénia na síndrome de Felty (Hazenbergh et al., 1989) ou após quimioterapia (de Vries et al., 1991).

As primeiras alusões à utilidade dos anticorpos que bloqueiam FEC-GM para o tratamento de artrite resultaram de estudos *in vivo* em murganhos (Campbell et al., 1997; Campbell et al., 1998; Cook et al., 2001). Especificamente, Cook et al. mostraram que os anticorpos de neutralização de FEC-GM demonstraram eficácia num modelo de artrite induzida por colagénio. O bloqueio de FEC-GM levou a uma redução da gravidade da doença no que respeita à inflamação, à destruição da cartilagem e à progressão da doença em membros inicialmente afectados ou à progressão para outros membros.

Há vários efeitos da terapêutica anti-FEC-GM dos quais os doentes com artrite reumatóide ou com outras doenças inflamatórias podem beneficiar.

Espera-se que o bloqueio de FEC-GM iniba ou reduza:

a) a activação e o número de monócitos, macrófagos e neutrófilos maduros. Especialmente os neutrófilos e os macrófagos são abundantes no fluido sinovial e na membrana. O número de macrófagos na sinóvia tem demonstrado estar relacionado com o grau de erosão nas articulações na AR (Mulherin et al.,

1996; Burmester et al., 1997). Os macrófagos são a fonte de uma variedade de outras citocinas pró-inflamatórias e das proteases da degradação da matriz. A produção de H_2O_2 pelos neutrófilos faz parte dos processos destrutivos que têm lugar nas articulações artríticas (Babior, 2000).

b) a diferenciação de células dendríticas (CD) mielóides e a activação de CD sinoviais (= sinoviócitos). O FEC-GM desregula e mantém a expressão da classe II de HLA nas CD e nos sinoviócitos da AR (Alvaro-Gracia JM et al., 1991). As CD estão instruídas, dentro da articulação, para adquirir funções associadas com a activação selectiva de células T inflamatórias. Os alelos específicos de HLA-DR têm sido ligados a uma susceptibilidade para a AR e à activação de células T por via da presença dos antigénios das CD, que podem desempenhar um papel crucial neste tipo de doenças imunitárias (Santiago-Schwarz et al., 2001).

Esclerose múltipla:

Na esclerose múltipla, os níveis elevados de FEC-GM estão relacionados com a fase activa de EM (Carrieri et al., 1998; McQualter et al., 2001) e ratos com FEC-GM -/- falharam no desenvolvimento da doença, no sistema de modelo para EM, encefalomielite experimental, EAE (McQualter et al., 2001).

Asma:

Na asma, têm sido relatadas quantidades acrescidas de FEC-GM no pulmão (Broide e Firestein, 1991). Ao mesmo tempo, os eosinófilos estão elevados, em que o FEC-GM, em sinergia com interleucina 5, actua de três maneiras: i) estimula a

diferenciação das células progenitoras em eosinófilos, ii) estimula a sua activação funcional e iii) prolonga a sobrevivência dos eosinófilos no pulmão (Broide et al., 1992; Yamashita et al., 2002). Assim, a redução da sobrevivência dos eosinófilos nas vias aéreas asmáticas por meio do bloqueio de FEC-GM é provável que melhore a doença. A utilidade dos anticorpos de neutralização anti-FEC-GM também foi demonstrada num modelo de asma de murino, em que a administração desses anticorpos levou a uma redução significativa da hiper-resposta das vias aéreas e da inflamação das vias aéreas (Yamashita et al., 2002).

Num modelo diferente de murganhos, a inflamação do pulmão, dependente de LPS, podia ser reduzida por meio da aplicação em murganhos do anticorpo anti-FEC-GM, 22E9 (Bozinovski et al., 2003).

Efeitos tóxicos:

Murganhos homozigóticos para um gene com disrupção de um factor de estimulação de colónias de granulócitos/macrófagos (FEC-GM) desenvolveram-se normalmente e não mostraram perturbações significativas da hematopoiese até às 12 semanas de idade. Embora a maior parte dos murganhos deficientes em FEC-GM sejam superficialmente saudáveis e férteis, todos desenvolvem uma matriz vascular extracelular desorganizada com pacotes de colagénio reduzidos e em disrupção e pulmões anormais, com uma depuração dos tensioactivos pulmonares defeituosa e uma resistência reduzida a agentes patogénicos microbianos no pulmão. As características desta última patologia parecem-se com o distúrbio humano de proteinose alveolar pulmonar (PAP). O FEC-GM não parece ser essencial para a manutenção dos níveis normais dos principais tipos de células hematopoiéticas maduras e dos seus precursores no

sangue, na medula e no baço. Contudo, implicam FEC-GM como sendo essencial para o desenvolvimento vascular normal, a fisiologia pulmonar e para a resistência a infecções locais (Stanley et al., 1994; Dranoff et al., 1994; Plenz et al., 2003; Shibata et al., 2001). Recentemente, uma forte associação de auto-anticorpos a FEC-GM com PAP tem sido adicionalmente implicada em anomalias da sinalização de FEC-GM na patogénese de PAP em seres humanos. Em conjunto, estas observações demonstram que FEC-GM tem um papel crítico na regulação da homeostase de tensioactivos e nas funções imunitárias inatas dos macrófagos alveolares no pulmão (Bonfield et al., 2002; Trapnell e Whitsett, 2002; Uchida et al., 2004; Kitamura et al., 1999).

Já foram descritos títulos elevados de auto-anticorpos com actividade de bloqueio de FEC-GM em doentes com miastenia grave. Estes doentes não revelaram qualquer outro fenómeno auto-imune ou deficiências hemopoiéticas ou "outros sintomas clínicos óbvios correlacionados" (Meager et al., 1999).

O composto E21R, uma forma modificada de FEC-GM que antagoniza com a função de FEC-GM, tem sido avaliada num ensaio de segurança da fase I e verificou-se que tem um bom perfil de segurança em doentes com cancro (Olver et al., 2002).

Assim, independentemente da função pulmonar, que seria monitorizada de uma forma insistente, não se esperam outros efeitos secundários quando se aplica uma terapêutica anti-FEC-GM.

Assim, apenas anticorpos derivados de espécies não humanas com uma função de neutralização de FEC-GM, têm sido gerados. Por exemplo, a patente EP 0499161 A1 descreve um

anticorpo gerado por imunização de murganhos com oligopéptidos, cuja sequência deriva de um FEC-GM. Além disso, o pedido de patente descreve um processo para aliviar, em mamíferos com necessidade desse tratamento, um efeito indesejável de FEC-GM, que compreende a administração ao referido mamífero de uma quantidade de uma imunoglobulina que inibe FEC-GM. Contudo, esse anticorpo é um anticorpo de murino, tornando-o assim inapropriado para a administração a seres humanos.

Adicionalmente, a patente WO 03/068920 descreve um anticorpo quimérico de murganho/humano, IgG1, referido aí como anticorpo quimérico 19/2, que é relatado para demonstrar a actividade de neutralização do crescimento de células estimulado por FEC-GM. Os anticorpos que contêm sequências não humanas, provavelmente provocam uma resposta imunitária em doentes humanos e não são apropriados para uma administração terapêutica. Por exemplo, em doenças que é necessário um tratamento a longo prazo (por exemplo, doenças inflamatórias crónicas, como artrite reumatóide, asma e esclerose múltipla), a administração continuada de um agente terapêutico não humano aumenta a probabilidade de uma reacção inflamatória grave e a produção de anticorpos humanos que podem neutralizar o agente terapêutico.

Da mesma forma, à luz do grande potencial da terapêutica com anticorpos anti-FEC-GM, há uma grande necessidade de anticorpos humanos anti-FEC-GM, com uma elevada afinidade que bloqueiem eficazmente a interacção FEC-GM/receptor de FEC-GM. Além disso, seria vantajoso ter um ou mais anticorpos que possam reticular com FEC-GM de uma ou mais espécies não humanas, de modo a ensaiar a sua eficácia em modelos *in vivo* à base de animais.

Os anticorpos descritos satisfazem estas e outras necessidades providenciando anticorpos anti-FEC-GM com uma eficácia altamente completa, que vão ser descritos a seguir.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por objecto as modalidades definidas nas reivindicações.

Constitui um objecto da presente invenção providenciar anticorpos humanos e humanizados que possam bloquear eficazmente a interacção de FEC-GM/receptor de FEC-GM.

Constitui outro objecto da presente invenção providenciar anticorpos que sejam seguros para administração a seres humanos.

Constitui também um objecto da presente invenção providenciar processos para o tratamento de doenças e/ou estados clínicos associados com a presença de FEC-GM, por meio da utilização de um ou mais dos anticorpos aqui descritos. Estes e outros objectos serão completamente descritos aqui.

Num aspecto, a presente invenção providencia uma região de ligação do antigénio, que é específica para o FEC-GM humano, em que o anticorpo humano ou humanizado isolado ou um seu fragmento funcional é capaz de (i) bloquear a interacção de 0,5 µg/mL de FEC-GM humano com a cadeia alfa do receptor humano de FEC-GM expresso em cerca de 2×10^5 células de OHC-K1, em pelo menos 50 %, nas seguintes condições: (a) a concentração da cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano, expresso nas células de OHC-K1, é semelhante à concentração da cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano expresso em cerca

de 2×10^5 células de OHC-GMRa#11, e (b) a concentração do anticorpo humano ou humanizado isolado ou de um seu fragmento funcional é de cerca de 5 µg/mL; e (ii) neutralizar 0,25 ng/mL de FEC-GM humano num ensaio de proliferação de TF-1 com pelo menos um valor de cerca de CI_{50} cinco vezes inferior ao do anticorpo de referência BVD2-21C11 e/ou ao anticorpo de referência MAB215. Tal como se utiliza aqui, um "ensaio de proliferação de TF-1" define-se como o ensaio praticamente descrito no exemplo 5B. Um especialista nesta técnica pode obter células de OHC-K1 que expressam a cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano numa concentração semelhante à que é expressa em cerca de 2×10^5 células de OHC-GMRa#11, seguindo os ensinamentos dados aqui.

A presente invenção ainda tem por objecto um anticorpo humano ou humanizado isolado ou um fragmento funcional do anticorpo, que contém uma região de ligação do antigénio, tal como aqui descrito. Esse anticorpo ou o seu fragmento funcional podem conter uma região de ligação do antigénio que contém uma região RDC3-P descrita nas SEQ ID Nº. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 49, 50, 51 ou 52; a região de ligação do antigénio pode incluir ainda incluir uma região RDC2-P descrita nas SEQ ID Nº. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 49, 50, 51 ou 52; e a região de ligação do antigénio também pode conter uma região RDC1-P descrita nas SEQ ID Nº. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 49, 50, 51 ou 52. Esse anticorpo ou o seu fragmento funcional podem conter uma região de ligação do antigénio que contém uma cadeia pesada variável descrita nas SEQ ID Nº. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 49, 50, 51 ou 52. Esse anticorpo específico de FEC-GM pode conter uma região de ligação do antigénio que contém uma região RDC3-L descrita nas SEQ ID Nº. 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 58, 59, 60 ou 61; a região de ligação do antigénio pode incluir ainda incluir

uma região RDC2-L descrita nas SEQ ID N°. 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 58, 59, 60 ou 61; e a região de ligação do antigénio também pode conter uma região RDC1-L descrita nas SEQ ID N°. 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 58, 59, 60 ou 61. Esse anticorpo ou o seu fragmento funcional podem conter uma região de ligação do antigénio que contém uma cadeia leve variável descrita nas SEQ ID N°. 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 58, 59, 60 ou 61.

As variantes de péptidos das sequências aqui descritas também estão englobadas na presente invenção. De acordo com isto, a presente invenção inclui anticorpos anti-FEC-GM com uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada com: pelo menos 60 por cento de identidade de sequências nas regiões RDC com as regiões RDC descritas nas SEQ ID N°. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 49, 50, 51 ou 52; e/ou pelo menos 80 por cento de homologia de sequências nas regiões RDC com as regiões RDC descritas nas SEQ ID N°. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 49, 50, 51 ou 52. Ainda se incluem os anticorpos anti-FEC-GM com uma sequência de aminoácidos de cadeia leve com: pelo menos 60 por cento de identidade de sequências nas regiões RDC com as regiões RDC descritas nas SEQ ID N°. 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 58, 59, 60 ou 61; e/ou 80 por cento de homologia de sequências nas regiões RDC com as regiões RDC descritas nas SEQ ID N°. 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 58, 59, 60 ou 61.

Um anticorpo da presente invenção pode ser uma IgG (por exemplo, IgG₁), enquanto um fragmento do anticorpo pode ser, por exemplo, um Fab ou um scFv. De acordo com isto, um fragmento de anticorpo pode ser ou pode conter uma região de ligação ao antigénio que se comporta de uma ou de várias das formas aqui descritas.

A presente invenção também tem por objecto sequências de ácidos nucleicos isoladas, cada uma das quais pode codificar uma região de ligação ao antigénio, de um anticorpo humano ou humanizado ou de um seu fragmento de anticorpo funcional, que é específico para FEC-GM. Essa sequência de ácidos nucleicos pode codificar uma cadeia pesada variável de um anticorpo humano ou humanizado isolado ou de um seu fragmento funcional compreendendo as SEQ ID Nº. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 44, 45, 46, 47 ou 48 ou uma sequência de ácidos nucleicos que hibrida, em condições altamente severas, com a hélice complementar das SEQ ID Nº. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 44, 45, 46, 47 ou 48. O ácido nucleico pode codificar uma cadeia leve variável de um anticorpo humano ou humanizado isolado ou de um seu fragmento funcional compreendendo as SEQ ID Nº. 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 53, 54, 55, 56 ou 57 ou uma sequência de ácidos nucleicos que hibrida, em condições altamente severas, com a hélice complementar das SEQ ID Nº. 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 53, 54, 55, 56 ou 57.

A sequência de ácidos nucleicos pode codificar uma região de ligação ao antigénio de um anticorpo humano ou humanizado ou de um fragmento funcional do anticorpo que é específico para FEC-GM humano, enquanto o anticorpo ou o seu fragmento funcional são capazes de (i) bloquear a interacção de 0,5 µg/mL de FEC-GM humano com a cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano expresso em 2×10^5 células de OHC-K1, em pelo menos 50 %, nas seguintes condições: (a) a concentração da referida cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano expresso nas referidas células de OHC-K1 é semelhante à concentração da cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano expresso em cerca de 2×10^5 células de OHC-GMRa#11, e (b) a concentração do referido anticorpo humano ou humanizado isolado ou de um seu fragmento funcional é de cerca de 5 µg/mL; e (ii)

neutralizado 0,25 ng/mL de FEC-GM humano num ensaio de proliferação de TF-1 com pelo menos um valor de cerca de CI_{50} cinco vezes inferior ao do anticorpo de referência BVD2-21C11 e/ou ao anticorpo de referência MAB215.

Os ácidos nucleicos da presente memória descritiva são apropriados para a produção recombinante. Assim, a presente invenção também tem por objecto vectores e células hospedeiras contendo uma sequência de ácidos nucleicos.

Essas células hospedeiras podem ser células bacterianas ou eucarióticas.

As composições da presente invenção podem ser utilizadas para aplicações terapêuticas ou profilácticas. A presente invenção inclui assim uma composição farmacêutica contendo um anticorpo (ou um fragmento funcional do anticorpo) e um veículo ou excipiente aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. Num aspecto relacionado, a presente invenção tem por objecto um processo para o tratamento de um distúrbio ou um estado clínico associado com a presença indesejada de FEC-GM ou células que expressam FEC-GM. Esse processo inclui as etapas de administração, a um indivíduo com essa necessidade, de uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica, que contém um anticorpo tal como aqui descrito ou contemplado. Esse distúrbio ou estado clínico pode ser uma doença inflamatória, tal como artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença de Crohn, psoríase, asma, dermatite atópica e choque.

Os anticorpos humanos ou humanizados (e os seus fragmentos funcionais) da presente invenção podem reticular com FEC-GM de rato e/ou de macacos rhesus (macaca), conforme

determinado por titulação em equilíbrio de uma solução (SET) e/ou por ensaio de proliferação de TF1.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1a mostra sequências de ácidos nucleicos de várias regiões novas de cadeia pesada variável de anticorpos.

A figura 1b mostra sequências de ácidos nucleicos de várias regiões novas de cadeia pesada variável de anticorpos. As regiões RDC, RDC1-P, RDC2-P e RDC3-P são designadas desde o terminal N ao terminal C a negrito.

A figura 2a mostra sequências de ácidos nucleicos de várias regiões novas de cadeia leve variável de anticorpos.

A figura 2b mostra sequências de ácidos nucleicos de várias regiões novas de cadeia leve variável de anticorpos. As regiões RDC, RDC1-L, RDC2-L e RDC3-L são designadas desde o terminal N ao terminal C a negrito.

A figura 3 mostra sequências de aminoácidos de regiões variáveis de cadeia pesada das sequências do gene-matriz do anticorpo HuCAL[®] tendo por base o consenso. As regiões RDC, RDC1-P, RDC2-P e RDC3-P são designadas desde o terminal N ao terminal C a negrito (SEQ ID N^o. 41).

A figura 4 mostra sequências de aminoácidos de regiões variáveis de cadeia leve das sequências do gene-matriz do anticorpo HuCAL[®] tendo por base o consenso. As regiões RDC, RDC1-L, RDC2-L e RDC3-L são designadas

desde o terminal N ao terminal C a negrito (SEQ ID N°. 42).

A figura 5 mostra um exemplo de uma sequência de ADN do vector de expressão pMORPH®X9_MOR03929_FH (SEQ ID N°. 43).

A figura 6 mostra o nível de expressão do receptor alfa de FEC-GM, conforme determinado por uma análise de SCAF, utilizando o anticorpo específico do receptor alfa de FEC-GM, MAB1006. OHC-GMRa#11 (linha a cheio) é ilustrado em comparação com OHC-K1 (linha a tracejado). O eixo dos xx representa o valor relativo de fluorescência (RFL), medido no canal FL2; o eixo dos yy representa a contagem de células.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente memória descritiva baseia-se na descoberta de novos anticorpos que são específicos ou têm uma elevada afinidade para FEC-GM e têm uma ou mais propriedades novas. Preferencialmente, um anticorpo da presente invenção pode exibir um benefício terapêutico para um indivíduo. Os anticorpos da presente invenção, que podem ser humanos ou humanizados, podem ser utilizados em muitos contextos que vão ser descritos aqui de uma forma mais completa.

Um anticorpo "humano" ou um fragmento funcional de um anticorpo humano é definido aqui como aquele que não é quimérico (por exemplo, não é "humanizado") e não deriva de uma espécie não-humana (quer na sua totalidade, quer em parte). Um anticorpo humano ou um fragmento funcional do anticorpo podem derivar de um anticorpo humano ou podem ser um anticorpo humano sintético. Um "anticorpo humano

sintético" define-se aqui como o anticorpo que tem uma sequência derivada, no todo ou em parte, *in silico*, de sequências sintéticas que se baseiam na análise de sequências conhecidas de anticorpos humanos. A concepção *in silico* de uma sequência de um anticorpo humano ou de um seu fragmento pode ser conseguida, por exemplo, analisando uma base de dados de sequências de anticorpos humanos ou de fragmentos de anticorpos e descobrindo uma sequência de polipéptidos utilizando os dados obtidos a partir daí. Outro exemplo de um anticorpo humano ou de um fragmento funcional do anticorpo é aquele que é codificado por um ácido nucleico isolado a partir de uma biblioteca de sequências de anticorpos de origem humana (isto é, sendo essa biblioteca baseada em anticorpos colhidos de uma fonte humana natural).

Um "anticorpo humanizado" ou um fragmento funcional de um anticorpo humanizado define-se aqui como aquele em que (i) deriva de uma fonte não humana (por exemplo, um murganho transgênico que é portador de um sistema imunitário heterólogo), anticorpo esse que se baseia numa sequência de uma linha germinal humana; ou (ii) quimérico, em que o domínio variável deriva de uma origem não humana e o domínio constante deriva de uma origem humana ou (iii) enxertado numa RDC, em que as RDC do domínio variável são de origem não humana, enquanto uma ou mais das estruturas do domínio variável são de origem humana e o domínio constante (se existir) é de origem humana.

Tal como se utiliza aqui, um anticorpo "liga-se especificamente a", é "específico de/para" ou "reconhece especificamente" um antigénio (aqui, FEC-GM) se esse anticorpo for capaz de discriminar entre esse antigénio e um ou mais antigénios de referência, dado que a especificidade de ligação não é uma propriedade absoluta mas relativa. Na

sua forma mais geral (e quando não for mencionada nenhuma referência definida), "ligação específica" refere-se à capacidade do anticorpo para discriminar entre o antigénio de interesse e um antigénio não relacionado, conforme determinado, por exemplo, de acordo com um dos seguintes métodos. Esses métodos compreendem, mas não se limitam a ensaios de "Western blot", ELISA, RIA, ECL, IRMA e rastreio de péptidos. Por exemplo, pode realizar-se um ensaio-padrão de ELISA. A pontuação pode ser feita por um desenvolvimento-padrão da cor (por exemplo, um anticorpo secundário com peróxido de rábano silvestre e tetrametil-benzidina com peróxido de hidrogénio). A reacção, em certos poços, é pontuada pela densidade óptica, por exemplo, a 450 nm. O antecedente típico (= reacção negativa) pode ser de 0,1 de DO; a reacção positiva típica pode ser de 1 DO. Isto significa que a diferença entre positivo/negativo pode ser superior a 10 vezes. Normalmente, realiza-se a determinação da especificidade de ligação utilizando não apenas um antigénio de referência mas um conjunto de cerca de três a cinco antigénios não relacionados, tais como leite em pó, ASB, transferrina ou similares.

Contudo, "ligação específica" também se pode referir à capacidade de um anticorpo para discriminar entre o antigénio-alvo e um ou mais antigénios fortemente relacionados, que são utilizados como ponto de referência, por exemplo, entre FEC-GM e IL3, IL5, IL-4, IL13 ou FEC-M. Além disso, a "ligação específica" pode estar relacionada com a capacidade de um anticorpo para discriminar entre partes diferentes do seu antigénio-alvo, por exemplo, domínios diferentes ou regiões diferentes de FEC-GM ou entre um ou mais resíduos de aminoácidos-chave ou extensões de resíduos de aminoácidos de FEC-GM.

Tal como se utiliza aqui, também uma "imunoglobulina" (Ig) é definida aqui como uma proteína que pertence à classe das IgG, IgM, IgE, IgA, ou IgD (ou qualquer das suas subclasses) e inclui todos os anticorpos conhecidos convencionalmente e os seus fragmentos funcionais. Um "fragmento funcional" de um anticorpo/imunoglobulina define-se aqui como um fragmento de um anticorpo/imunoglobulina (por exemplo, uma região variável de uma IgG) que retém a região de ligação ao antígeno. Uma "região de ligação ao antígeno" de um anticorpo encontra-se normalmente numa ou em mais regiões hipervariáveis de um anticorpo, isto é, as regiões RDC-1, 2, e/ou 3; contudo, as regiões "estruturais" variáveis podem também desempenhar um papel importante na ligação do antígeno, tal como, providenciando uma estrutura para as RDC. Preferencialmente, a "região de ligação ao antígeno" compreende pelo menos 4 a 103 resíduos de aminoácidos da cadeia variável leve (VL) e 5 a 109 resíduos de aminoácidos da cadeia variável pesada (VP), mais preferencialmente, 3 a 107 resíduos de aminoácidos de VL e 4 a 111 de VP e, particularmente preferidas são as cadeias completas de VL e de VP (posições 1 a 109 dos aminoácidos de VL e 1 a 113 dos aminoácidos de VP; a numeração é feita de acordo com a patente WO 97/08320). Uma classe preferida de imunoglobulinas para serem utilizadas na presente invenção é a das IgG. Os "fragmentos funcionais" incluem o domínio de um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento Fab, scFv ou estruturas que compreendem domínios únicos variáveis de imunoglobulina ou domínios únicos de polipéptidos de anticorpo, por exemplo, domínios únicos variáveis de cadeia pesada ou domínios únicos variáveis de cadeia leve. Os $F(ab')_2$ ou Fab podem ser tratados por engenharia para minimizar ou remover completamente as interacções de dissulfureto intermoleculares que ocorrem entre os domínios C_{P1} e C_L .

Um anticorpo da presente invenção pode derivar de uma biblioteca de anticorpos recombinantes, que se baseia nas sequências de aminoácidos que foram concebidas *in silico* e codificadas por ácidos nucleicos que são criados sinteticamente. A concepção *in silico* de uma sequência de anticorpo consegue-se, por exemplo, analisando uma base de dados de sequências humanas e desenvolvendo uma sequência de polipéptidos utilizando os dados assim obtidos. Os processos para a concepção e a obtenção de sequências criadas *in silico* estão descritos, por exemplo, em Knappik et al., J. Mol. Biol. (2000) 296:57; Krebs et al., J. Immunol. Methods. (2001) 254:67; e na patente norte americana Nº. 6.300.064, criada por Knappik et al.

Anticorpos da presente invenção

Ao longo deste documento faz-se referência aos seguintes anticorpos representativos: "anticorpos Nº." ou "MOR" 03684, 04251, 03929, 04252, 04287, 04290, 04302, 04350, 04354, 04357, 03682, 04283, 04297 e 04342. MOR03684 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 1 (ADN)/SEQ ID Nº. 11 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 21 (ADN)/SEQ ID Nº. 31 (proteína). MOR04251 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 2 (ADN)/SEQ ID Nº. 12 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 22 (ADN)/SEQ ID Nº. 32 (proteína). MOR03929 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 3 (ADN)/SEQ ID Nº. 13 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 23 (ADN)/SEQ ID Nº. 33 (proteína). MOR04252 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 4 (ADN)/SEQ ID Nº. 14 (proteína)

e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 24 (ADN)/SEQ ID Nº. 34 (proteína). MOR04287 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 5 (ADN)/SEQ ID Nº. 15 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 25 (ADN)/SEQ ID Nº. 35 (proteína). MOR04290 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 6 (ADN)/SEQ ID Nº. 16 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 26 (ADN)/SEQ ID Nº. 36 (proteína). MOR04302 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 7 (ADN)/SEQ ID Nº. 17 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 27 (ADN)/SEQ ID Nº. 37 (proteína). MOR04350 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 8 (ADN)/SEQ ID Nº. 18 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 28 (ADN)/SEQ ID Nº. 38 (proteína). MOR04354 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 9 (ADN)/SEQ ID Nº. 19 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 29 (ADN)/SEQ ID Nº. 39 (proteína). MOR04357 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 10 ou 48 (ADN)/SEQ ID Nº. 20 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 30 ou 57 (ADN)/SEQ ID Nº. 40 (proteína). MOR03682 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 44 (ADN)/SEQ ID Nº. 49 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 53 (ADN)/SEQ ID Nº. 58 (proteína). MOR04283 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID Nº. 45 (ADN)/SEQ ID Nº. 50 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID Nº. 54 (ADN)/SEQ ID Nº.

59 (proteína). MOR04297 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID N°. 46 (ADN)/SEQ ID N°. 51 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID N°. 55 (ADN)/SEQ ID N°. 60 (proteína). MOR04342 representa um anticorpo que tem uma região variável de cadeia pesada correspondente à SEQ ID N°. 47 (ADN)/SEQ ID N°. 52 (proteína) e uma região variável de cadeia leve correspondente à SEQ ID N°. 56 (ADN)/SEQ ID N°. 61 (proteína).

Num aspecto, a presente invenção tem por objecto anticorpos com uma região de ligação ao antigénio que se pode ligar especificamente ou que tem uma afinidade elevada para FEC-GM. Diz-se que um anticorpo tem uma "afinidade elevada" para um antigénio se a medição da afinidade for pelo menos de 100 nM (afinidade monovalente do fragmento Fab). Um anticorpo ou uma região de ligação ao antigénio liga-se, preferencialmente, a FEC-GM com uma afinidade inferior a cerca de 100 nM, mais preferencialmente, inferior a cerca de 60 nM e ainda mais preferencialmente, inferior a cerca de 30 nM. Mais preferidos são os anticorpos que se ligam a FEC-GM com uma afinidade inferior a cerca de 10 nM e, mais preferencialmente, inferior a cerca de 3 nM. Por exemplo, a afinidade de um anticorpo aqui descrito contra FEC-GM pode ser de cerca de 10,0 nM ou 1 pM (afinidade monovalente do fragmento Fab).

O quadro 1 ilustra um resumo das afinidades de anticorpos representativos, conforme foram determinadas por ressonância plasmónica de superfície (Biacore) e análise por titulação de uma solução em equilíbrio (TSE):

Quadro 1: Afinidades dos anticorpos

	Biacore	TSE
MOR0	K _D (pM)	K _D (pM)
3684	6420	16000
4251	70	7,4
3929	4260	2000
4302	174	63,5
4287	nd	17,9
4252	55	6
4290	122	11,1
4350	19	1,1
4354	21	2,8
4357	7	0,4
3682	nd	11406
4283	nd	113
4297	nd	49,2
4342	nd	4,9
"nd": não determinado		

Com referência ao quadro 1, a afinidade de MOR03684, 04251, 03929, 04252, 04357, 04290, 04302, 04350 e 04354 foi medida por ressonância plasmônica de superfície (Biacore) em FEC-GM recombinante imobilizado. O formato de Fab de MOR03684, 04251, 03929, 04252, 04357, 04290, 04302, 04350 e 04354 exibiu uma gama de afinidades monovalentes entre cerca de 6 420 e 7 pM.

O formato Fab foi também utilizado para a determinação das afinidades por titulação de uma solução em equilíbrio (TSE). A coluna da direita do quadro 1 indica a força de ligação entre cerca de 16000 e 0,4 pM dos MOR neste processo.

Um anticorpo da presente invenção é, preferencialmente, uma espécie reticulada com espécies humanas e pelo menos uma

de outras espécies, que pode ser uma espécie de roedor ou de um primata não humano. O primata não humano pode ser macaco rhesus. A espécie de roedor pode ser um rato. Um anticorpo que reticule com pelo menos uma espécie de roedor pode providenciar, por exemplo, uma maior flexibilidade e maiores benefícios em relação aos anticorpos anti-FEC-GM conhecidos, para a finalidade de realizar estudos *in vivo* em várias espécies com o mesmo anticorpo.

Preferencialmente, um anticorpo da presente invenção não é só capaz de se ligar a FEC-GM, mas também é capaz de bloquear a interação de FEC-GM humano com a cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano expresso em células de OHC-K1 em pelo menos 25 %, preferencialmente, pelo menos 50 %, mais preferencialmente, pelo menos 60 %, mais preferencialmente, pelo menos 70 %, preferencialmente pelo menos 85 % e, mais preferencialmente, pelo menos 100 %. Numa modalidade preferida, um dos anticorpos aqui descritos é capaz de bloquear a interação de 0,5 µg/mL de FEC-GM humano com a cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano, expresso em cerca de 2×10^5 células de OHC-K1 em pelo menos 50 %, nas seguintes condições: a concentração da cadeia alfa do receptor de FEC-GM expressa em células de OHC-K1 é semelhante à concentração da cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano expresso em cerca de 2×10^5 células de OHC-GMRa#11 e a concentração do anticorpo é de cerca de 5 µg/mL.

Neste aspecto, um técnico desta matéria pode obter células de OHC-K1 que expressam a cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano numa concentração semelhante à que é expressa em cerca de 2×10^5 células de OHC-GMRa#11, por exemplo, transfectando uma população de células de OHC-K1 com um vector de expressão apropriado que codifica a cadeia alfa do receptor de FEC-GM para gerar diferentes linhas de células

estáveis, que expressam níveis definidos de receptor alfa de FEC-GM; depois, analisam-se as linhas de células estáveis em análise por SCAF para determinar os níveis de expressão da cadeia alfa do receptor de FEC-GM, de acordo com o protocolo praticamente descrito no exemplo 3C; uma linha de células que expressa a cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano numa concentração semelhante à que é expresso em cerca de 2×10^5 células de OHC-GMRa#11, em comparação com o valor mediano de fluorescência (MFL) dessas células transfectadas em relação ao valor de MFL estabelecido no exemplo 3C. Tal como se utiliza aqui, define-se uma linha de células que expressa a cadeia alfa do receptor de FEC-GM, a uma concentração "semelhante" à que é expressa em cerca de 2×10^5 células de OHC-GMRa#11, se o valor de MFL da linha de células transfectadas não se desviar mais do que um factor de duas vezes em relação ao valor de MFL da célula de OHC-GMRa#11, conforme estabelecido no exemplo 3C.

Além disso, um anticorpo da presente invenção é capaz de neutralizar FEC-GM humano num ensaio de proliferação de TF-1, com um valor de CI_{50} inferior ao do anticorpo de referência BVD2-21C11 e/ou a MAB215, preferencialmente pelo menos um valor de CI_{50} 5 vezes inferior, mais preferencialmente, com pelo menos um valor de CI_{50} 10 vezes inferior ao do anticorpo de referência BVD2-21C11 e/ou a MAB215, mais preferencialmente, com pelo menos um valor de CI_{50} 15 vezes inferior ao do anticorpo de referência BVD2-21C11 e/ou a MAB215, mais preferencialmente, com pelo menos um valor de CI_{50} 20 vezes inferior ao do anticorpo de referência BVD2-21C11 e/ou a MAB215, mais preferencialmente, com pelo menos um valor de CI_{50} 30 vezes inferior ao do anticorpo de referência BVD2-21C11 e/ou a MAB215, mais preferencialmente, com pelo menos um valor de CI_{50} 50 vezes inferior ao do anticorpo de referência BVD2-21C11 e/ou a MAB215, mais

preferencialmente, com pelo menos um valor de CI_{50} 100 vezes inferior ao do anticorpo de referência BVD2-21C11 e/ou a MAB215 e, ainda mais preferencialmente, com pelo menos um valor de CI_{50} 120 vezes inferior ao do anticorpo de referência BVD2-21C11 e/ou a MAB215.

Variantes de péptidos

Os anticorpos da presente invenção não se limitam às sequências peptídicas específicas providenciadas aqui. Em vez disso, a presente invenção também engloba variantes destes polipéptidos. No que se refere à presente memória descritiva e às tecnologias e referências convencionalmente disponíveis, um técnico na matéria será capaz de preparar, ensaiar e utilizar variantes funcionais dos anticorpos aqui descritos, embora entendendo que as variantes que têm a capacidade de bloquear a interação de FEC-GM na cadeia alfa do receptor de FEC-GM, caem dentro do âmbito da presente invenção. Tal como utiliza, neste contexto, "capacidade para bloquear a interação de FEC-GM com a cadeia alfa do receptor de FEC-GM" significa uma característica funcional adstrita a um anticorpo anti-FEC-GM da presente memória descritiva.

Uma variante pode incluir, por exemplo, um anticorpo que tem pelo menos uma região de determinação de complementaridade (RDC) alterada (híper-variável) e/ou uma domínio/posição de estrutura (ES) (variável), face à sequência de péptidos descrita aqui. Para ilustrar melhor este conceito, segue-se uma pequena descrição da estrutura do anticorpo.

Um anticorpo é composto por duas cadeias peptídicas, cada uma delas contendo um domínio constante (de cadeia leve) ou três domínios constantes (de cadeias pesadas) e uma região

variável (VL, VP), a última das quais, em cada caso, produzida a partir de quatro regiões ES e três RDC inter-espaçadas. O sítio de ligação ao antigénio é formado por uma ou mais RDC, ainda as regiões da FR providenciam a matriz estrutural para as RDC e podem também desempenhar um papel importante na ligação ao antigénio. Alterando um ou mais resíduos de aminoácidos numa RDC ou numa região FR, um técnico na matéria pode gerar, por rotina, sequências de anticorpos diversificadas ou mutadas, que podem ser rastreadas em função do antigénio, por exemplo, em relação a propriedades novas ou melhoradas.

Os quadros 2a (VP) e 2b (VL) delineiam as regiões da RDC e da FR para certos anticorpos da presente descrição e comparam os aminoácidos numa dada posição com cada um dos outros correspondendo em sequências de consenso ou de "gene master" (conforme descrito na patente norte-americana Nº. 6 300 064):

Quadro 2a: Sequências VP

VP		Ligantes de FEC-QM das sequências VP		Entrada 1		Entrada 2		Saída	
Posição	VP	Entrada 1		Entrada 2		Saída		Saída	
		1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-01	1-400-01	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-11	1-400-11	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-12	1-400-12	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-13	1-400-13	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-14	1-400-14	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-15	1-400-15	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-16	1-400-16	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-17	1-400-17	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-18	1-400-18	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-19	1-400-19	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-20	1-400-20	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-21	1-400-21	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-22	1-400-22	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-23	1-400-23	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-24	1-400-24	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-25	1-400-25	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-26	1-400-26	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-27	1-400-27	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-28	1-400-28	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-29	1-400-29	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-30	1-400-30	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-31	1-400-31	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-32	1-400-32	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-33	1-400-33	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-34	1-400-34	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-35	1-400-35	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-36	1-400-36	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-37	1-400-37	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-38	1-400-38	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-39	1-400-39	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-40	1-400-40	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-41	1-400-41	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-42	1-400-42	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-43	1-400-43	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-44	1-400-44	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-45	1-400-45	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-46	1-400-46	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-47	1-400-47	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-48	1-400-48	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-49	1-400-49	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-50	1-400-50	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-51	1-400-51	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-52	1-400-52	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-53	1-400-53	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-54	1-400-54	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-55	1-400-55	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-56	1-400-56	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-57	1-400-57	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-58	1-400-58	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-59	1-400-59	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-60	1-400-60	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-61	1-400-61	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-62	1-400-62	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-63	1-400-63	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-64	1-400-64	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-65	1-400-65	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-66	1-400-66	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-67	1-400-67	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-68	1-400-68	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-69	1-400-69	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-70	1-400-70	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-71	1-400-71	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-72	1-400-72	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-73	1-400-73	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-74	1-400-74	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-75	1-400-75	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-76	1-400-76	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-77	1-400-77	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-78	1-400-78	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-79	1-400-79	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-80	1-400-80	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-81	1-400-81	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-82	1-400-82	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-83	1-400-83	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-84	1-400-84	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-85	1-400-85	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-86	1-400-86	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-87	1-400-87	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-88	1-400-88	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-89	1-400-89	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-90	1-400-90	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-91	1-400-91	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-92	1-400-92	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-93	1-400-93	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-94	1-400-94	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-95	1-400-95	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-96	1-400-96	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-97	1-400-97	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-98	1-400-98	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-99	1-400-99	1	2	3	4	5	6	7	8
1-400-100	1-400-100	1	2	3	4	5	6	7	8

Quadro 2a: continuação

VP

Ponto 22

VP		Estação 2		Estação 4	
P		R		R	
Exp		Exp		Exp	
C		C		C	
S		S		S	
T		T		T	
R		R		R	
E		E		E	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L		L	
M		M		M	
S		S		S	
L		L			

Quadro 2b: Sequências VL

[illegible]

Quadro 2b: continuação

		ESTADÍSTICA 1										ESTADÍSTICA 2										ESTADÍSTICA 3										
		Y										B										F										
Posición		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		Barra 1										Barra 2										Barra 3										
100 NO 42	VL43	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
		[REDACTED]										[REDACTED]										[REDACTED]										
100 NO 43	VL44	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 44	VL45	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 45	VL46	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 46	VL47	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 47	VL48	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 48	VL49	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 49	VL50	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 50	VL51	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 51	VL52	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 52	VL53	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 53	VL54	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 54	VL55	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 55	VL56	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 56	VL57	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 57	VL58	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 58	VL59	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 59	VL60	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 60	VL61	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C
100 NO 61	VL62	1	P	E	R	F	S	C	E	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	T	Y	C

Os genes de matriz originais HuCAL[®] têm sido produzidos com os seus terminais N autênticos, por exemplo, VL lambda 3 contém os aminoácidos "SY" na posição 1 e 2; e VP3 contém o aminoácido "E" na posição 1. Durante a preparação de bibliotecas de Fab de HuCAL[®], incluindo a biblioteca HuCAL GOLD[®], os primeiros dois aminoácidos foram mudados para "DI" na cadeia VL lambda 3; e o primeiro aminoácido foi alterado para "Q" na cadeia VP3.

Um técnico na matéria pode utilizar os dados dos quadros 2a e 2b para conceber variantes de péptidos que estão dentro do âmbito da presente invenção. Prefere-se que as variantes sejam preparadas alterando os aminoácidos dentro de uma ou mais regiões RDC; uma variante pode também ter uma ou mais regiões estruturais alteradas. No que se refere a uma comparação dos novos anticorpos uns com os outros, os resíduos candidatos que podem ser alterados incluem, por exemplo, os resíduos 27 ou 51 da cadeia leve variável e, por exemplo, os resíduos 32 ou 56 das cadeias pesadas variáveis de MOR04251, dado que se trata de posições de variância em frente umas das outras. As alterações também podem ser feitas nas regiões estruturais. Por exemplo, um domínio de um péptido FR pode ser alterado e para isso precisa de se fazer um desvio num resíduo em comparação com a sequência das linhas germinais.

No que se refere a uma comparação dos novos anticorpos com as correspondentes sequências de "genes master" ou de consenso, os resíduos candidatos que podem ser alterados incluem, por exemplo, os resíduos 27, 50 ou 90 da cadeia leve variável de MOR04251 em comparação com VLλ3 e, por exemplo, os resíduos 33, 52 ou 96 da cadeia pesada variável de MOR04251 em comparação com VP3. Alternativamente, um técnico na matéria pode fazer a mesma análise comparando as

sequências de aminoácidos aqui descritas com sequências conhecidas da mesma classe desses anticorpos, utilizando, por exemplo, os procedimentos descritos por Knappik et al. (2000) e na patente norte-americana N°. 6 300 064 registada por Knappik et al.

Além disso, as variantes podem ser obtidas utilizando um MOR como ponto inicial para a optimização por diversificação de um ou mais resíduos de aminoácidos em MOR, preferencialmente, resíduos de aminoácidos em uma ou mais RDC e por rastreio da colecção de variantes de anticorpos resultante para encontrar variantes com as propriedades melhoradas. Particularmente preferida é a diversificação de um ou mais resíduos de aminoácidos na RDC-3 de VL, na RDC-3 de VP, na RDC-1 de VL e/ou na RDC-2 de VP. A diversificação pode ser feita por síntese de uma colecção de moléculas de ADN utilizando a tecnologia da mutagénese de tri-nucleótidos (MTRIN) (Virnekäs et al., 1994).

Variantes conservadoras de aminoácidos

As variantes de polipéptido podem ser preparadas de modo a conservarem toda a estrutura molecular de uma sequência de péptidos de anticorpos aqui descrita. Considerando as propriedades dos aminoácidos individuais, um técnico na matéria pode reconhecer algumas substituições racionais. As substituições de aminoácidos, isto é, "as substituições conservadoras" podem ser preparadas, por exemplo, com base na semelhança, na polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e/ou natureza anfipática dos resíduos envolvidos.

Por exemplo, (a) aminoácidos não-polares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina,

fenilalanina, triptofano e metionina; (b) aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina; (c) aminoácidos carregados positivamente (básicos) incluem arginina, lisina e histidina; e (d) aminoácidos carregados negativamente (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. As substituições podem ser feitas, normalmente, dentro dos grupos (a)-(d). Além disso, a glicina e a prolina podem ser substituídas uma pela outra com base na sua capacidade para fazer a disrupção das hélices α . Do mesmo modo, alguns aminoácidos, tais como alanina, cisteína, leucina, metionina, ácido glutâmico, glutamina, histidina e lisina são encontrados facilmente em hélices α , enquanto a valina, a isoleucina, a fenilalanina, a tirosina, o triptofano e a treonina encontram-se mais vulgarmente em folhas β dobradas. A glicina, a serina, o ácido aspártico, a asparagina e a prolina são, por sua vez, facilmente encontradas. Algumas substituições preferidas podem ser feitas entre os seguintes grupos: (i) S e T; (ii) P e G; e (iii) A, V, L e I. Considerando que o código genético é conhecido e as técnicas de síntese de ADN recombinante, um cientista na matéria pode rapidamente construir ADN codificando as variantes conservadoras de aminoácidos.

Tal como se utiliza aqui, "identidade de sequência" entre duas sequências de polipéptidos, indica a percentagem de aminoácidos que são idênticos entre as sequências. "Homologia de sequência" indica a percentagem de aminoácidos que ou são idênticos ou representam substituições conservadoras de aminoácidos. As sequências de polipéptidos preferidas da presente invenção têm uma identidade de sequência nas regiões de RDC de pelo menos 60 %, mais preferencialmente, pelo menos 70 % ou 80 %, ainda mais preferencialmente, pelo menos 90 % e, ainda mais preferencialmente, pelo menos 95 %. Os anticorpos preferidos

da presente invenção têm uma homologia de sequências nas regiões de RDC de pelo menos 80 %, mais preferencialmente, 90 % e, ainda mais preferencialmente, 95 %.

Moléculas de ADN da presente invenção

A presente invenção também tem por objecto moléculas de ADN que codificam um anticorpo da presente invenção. Estas sequências incluem, mas não se limitam às moléculas de ADN estabelecidas nas figuras 1a e 2a.

As moléculas de ADN da presente invenção não estão limitadas às sequências aqui descritas, mas também incluem as suas variantes. As variantes de ADN podem ser descritas com referência às suas propriedades físicas na hibridação. Um técnico na matéria reconhecerá que o ADN pode ser utilizado para identificar o seu ADN complementar e uma vez que o ADN é de ligação dupla, o seu equivalente ou homólogo, utilizando técnicas de hibridação de ácidos nucleicos. Também se reconhecerá que a hibridação pode ocorrer com pelo menos 100 % de complementaridade. Contudo, dada a escolha apropriada das condições, as técnicas de hibridação podem ser utilizadas para diferenciar várias sequências de ADN com base na sua estrutura referida a uma sonda particular. Para uma orientação no que respeita a essas condições ver, Sambrook et al., 1989 (Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, EUA) e Ausubel et al., 1995 (Ausubel, F. M., Brent, R, Kingston, R E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. eds. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. Nova Iorque: John Wiley and Sons).

A semelhança estrutural entre duas sequências de polinucleótidos pode ser expressa em função do "rigor" das condições em que as duas sequências irão hibridar uma com a outra. Tal como se utiliza aqui, o termo "rigor" refere-se ao grau em que as condições desfavorecem a hibridação. Condições rigorosas desfavorecem muitíssimo a hibridação e apenas moléculas que estão mais relacionadas estruturalmente irão hibridar umas com as outras nessas condições. Inversamente, condições menos rigorosas favorecem a hibridação das moléculas exibindo um grau menor de relação estrutural. O rigor da hibridação está por isso directamente correlacionado com as relações estruturais das duas sequências de ácidos nucleicos. As relações que se seguem são úteis na correlação da hibridação e da relatividade (em que T_m representa a temperatura de fusão de um duplex de ácidos nucleicos):

a. $T_m = 69,3 + 0,41 (G+C) \%$

b. a T_m de um ADN de um duplex diminui de 1 °C cada vez que se aumenta 1 % o número de pares de bases desemparelhados.

c. $(T_m)_{\mu 2} - (T_m)_{\mu 1} = 18,5 \log_{10} \mu 2/\mu 1$

em que $\mu 1$ e $\mu 2$ são as forças iónicas das duas soluções.

O rigor da hibridação é função de muitos factores incluindo a concentração global de ADN, a força iónica, a temperatura, a dimensão da sonda e a presença de agentes que vão causar disrupção na ligação de hidrogénio. Os factores que promovem a hibridação incluem concentrações elevadas de ADN, forças iónicas elevadas, baixas temperaturas, dimensão da sonda maior e ausência de agentes que vão provocar disrupção da ligação de hidrogénio. A hibridação normalmente

realiza-se em duas fases: a fase de "ligação" e a fase de "lavagem".

Primeiro, na fase de ligação, a sonda liga-se ao alvo em condições que favorecem a hibridação. O rigor é normalmente controlado nesta fase alterando a temperatura. Para condições altamente rigorosas, a temperatura está normalmente entre 65 °C e 70 °C, a menos que se utilizem sondas de oligonucleótidos mais curtas (< 20 nt). Uma solução de hibridação representativa compreende 6x SSC, SDS a 0,5 %, 5x solução de Denhardt e 100 µg de ADN veicular não específico. Ver Ausubel *et al.*, secção 2.9, suplemento 27 (1994). Obviamente que se conhecem muitas condições de tampão diferentes e que são contudo funcionalmente equivalentes. Quando o grau de relação é baixo, pode-se escolher uma temperatura mais baixa. As temperaturas de ligação de baixa severidade estão entre cerca de 25 °C e 40 °C. Um grau de rigor médio está entre pelo menos cerca de 40 °C e menos do que cerca de 65 °C. Uma elevada severidade é, pelo menos, de cerca de 65 °C.

Em segundo lugar, elimina-se a sonda em excesso por meio de lavagem. É nesta fase que se aplicam, normalmente, as condições mais rigorosas. Assim, é este estágio de "lavagem" que é o mais importante na determinação da afinidade por via da hibridação. As soluções de lavagem contêm normalmente concentrações de sal mais baixas. Um exemplo de uma solução mediantemente severa contém 2x SSC e SDS a 0,1 %. Uma solução de lavagem de elevada severidade contém o equivalente (em força iónica) a menos de cerca de 0,2 x SSC, com uma solução severa preferida contendo cerca de 0,1 x SSC. A temperatura associada com os vários graus de rigor são as mesmas que foram discutidas antes para a "ligação". A solução de lavagem é também normalmente substituída um certo número de vezes

durante a lavagem. Por exemplo, em condições normais, altamente severas, a lavagem inclui duas lavagens, durante 30 minutos, a 55 °C e três lavagens, durante 15 minutos, a 60 °C.

De acordo com isto, a presente invenção inclui moléculas de ácidos nucleicos que hibridam com as moléculas indicadas nas figuras 1a e 2a, em condições de ligação e de lavagem altamente rigorosas, em que essas moléculas de ácidos nucleicos codificam um anticorpo ou um seu fragmento funcional com as propriedades aqui descritas. As moléculas preferidas (de um ponto de vista do ARNm) são aquelas que têm pelo menos 75 % ou 80 % (preferencialmente, pelo menos 85 %, mais preferencialmente, pelo menos 90 % e, mais preferencialmente, pelo menos 95 %) de homologia ou de identidade de sequência com uma das moléculas de ADN aqui descritas.

Variantes funcionalmente equivalentes

Reconhece-se que as variantes de moléculas de ADN aqui providenciadas podem ser preparadas de várias maneiras diferentes. Por exemplo, podem ser preparadas sob a forma de ADN completamente sintético. Os processos para sintetizar, com eficácia, os oligonucleótidos na gama de 20 a cerca de 150 nucleótidos, estão amplamente disponíveis. Ver Ausubel *et al.*, secção 2.11, suplemento 21 (1993). Os oligonucleótidos que se sobrepõem podem ser sintetizados e ligados de uma maneira que foi pela primeira vez referida por Khorana *et al.*, J. Mol. Biol. 72:209-217 (1971); ver também, Ausubel *et al.*, *supra*, secção 8.2. Os ADN sintéticos são concebidos, preferencialmente, com sítios de restrição convenientes tratados por engenharia nas extremidades 5' e 3' do gene, para facilitar a clonagem num vector apropriado.

Tal como se indicou, um processo para gerar variantes começa com um dos ADN aqui descritos e depois é levado à mutagénese dirigida ao sítio. Ver Ausubel et al., *supra*, capítulo 8, suplemento 37 (1997). Num processo típico, faz-se a clonagem de um ADN-alvo, num veículo bacteriófago de ADN de hélice simples. Isola-se o ADN de hélice simples e faz-se a sua hibridação com um oligonucleótido contendo as alterações desejadas dos nucleótidos. Sintetiza-se a hélice suplementar e introduz-se o fago de hélice dupla num hospedeiro. Alguma da progenia resultante irá conter o mutante desejado, que pode ser confirmado utilizando a sequenciação do ADN. Além disso, estão disponíveis vários processos que aumentam a probabilidade do fago da progenia ser o mutante desejado. Estes processos são bem conhecidos neste domínio e estão comercialmente disponíveis estojos para gerar esses mutantes.

Estruturas e expressão de ADN recombinante

A presente invenção tem ainda por objecto estruturas de ADN recombinante, que contêm uma ou mais das sequências de nucleótidos da presente invenção. As estruturas recombinantes são utilizadas em ligação com um vector, tal como um plasmido, um fagemido, um fago ou um vector viral, em que se insere a molécula de ADN que codifica um anticorpo da presente invenção.

O gene codificado pode ser produzido por técnicas descritas em Sambrook et al., 1989, e Ausubel et al., 1989. Alternativamente, as sequências de ADN podem ser sintetizadas quimicamente utilizando, por exemplo, sintetizadores. Ver, por exemplo, as técnicas descritas em OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (1984, Gait, ed., IRL Press, Oxford).

As estruturas recombinantes da presente invenção estão contidas em vectores de expressão, que são capazes de expressar o ARN e/ou os produtos de proteína do ADN codificado. O vector pode ainda compreender sequências reguladoras, incluindo um promotor ligado operacionalmente ao quadro de leitura aberta (QLA). O vector pode ainda compreender uma sequência marcadora seleccionável. A iniciação específica e os sinais secretórios bacterianos também podem ser necessários para uma tradução eficaz das sequências inseridas que codificam o gene-alvo.

A presente invenção ainda tem por objecto células hospedeiras contendo pelo menos um dos ADN da presente invenção. A célula hospedeira pode ser virtualmente qualquer célula para a qual o vector de expressão esteja disponível. Pode ser, por exemplo, uma célula hospedeira eucariótica superior, tal como uma célula de mamífero, uma célula hospedeira eucariótica inferior, tal como uma célula de levedura, ou uma célula procariótica, tal como uma célula bacteriana. A introdução da estrutura recombinante na célula hospedeira pode ser efectuada por meio da transfecção de fosfato de cálcio, DEAE, transfecção mediada por dextrano, electroporação ou infecção por fagos.

Expressão bacteriana

Os vectores de expressão úteis para utilização bacteriana são preparados inserindo uma sequência estrutural de ADN que codifica uma proteína desejada, em conjunto com os sinais de iniciação e determinação da tradução apropriados, em fases de leitura operacional com um promotor funcional. O vector vai conter um ou mais marcadores seleccionáveis fenotípicos e uma origem de replicação para assegurar a manutenção do vector e, se desejável, para providenciar a

amplificação dentro do hospedeiro. Os hospedeiros procarióticos apropriados para a transformação incluem *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* e várias espécies dentro do género de *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Staphylococcus*.

Os vectores bacterianos podem ser, por exemplo, à base de bacteriófagos, plasmidos ou fagemidos. Estes vectores podem conter um marcador seleccionável e uma origem de replicação bacteriana, derivados de plasmidos comercialmente disponíveis e que contêm normalmente elementos do vector de clonagem bem conhecido pBR322 (ATCC 37017). No seguimento de uma transformação de uma estirpe apropriada de hospedeiro e do crescimento da estirpe do hospedeiro até a uma densidade de células apropriadas, o promotor seleccionável é descomprimido/induzido por meios apropriados (por exemplo, alteração da temperatura ou indução química) e as células são postas em cultura durante um período adicional. As células são normalmente colhidas por centrifugação, submetidas a disrupção por meios físicos ou químicos e o extracto impuro resultante fica retido para posterior purificação.

Em sistemas bacterianos, pode-se seleccionar, com vantagem, um certo número de vectores de expressão, consoante a utilização pretendida para a proteína a ser expressa. Por exemplo, quando se produz uma grande quantidade dessa proteína, para a geração de anticorpos ou para rastrear bibliotecas de péptidos, por exemplo, podem ser desejáveis vectores que dirigem a expressão de níveis elevados de produtos de proteína de fusão, que são facilmente purificados.

Processos terapêuticos

Os processos terapêuticos envolvem a administração, a um indivíduo que disso tenha necessidade, de uma quantidade eficaz sob o ponto de vista terapêutico de um anticorpo contemplado na presente invenção. Uma quantidade "eficaz sob o ponto de vista terapêutico" é definida como a quantidade de anticorpo que é suficiente, em termos quantitativos, para bloquear eficazmente a interação entre FEC-GM e o seu receptor, numa área tratada de um indivíduo, quer com uma dose simples ou de acordo com o regime de doses múltiplas, isoladamente ou em combinação com outros agentes, o que leva ao alívio de um estado clínico adverso e considerando que essa quantidade é ainda tolerável sob o ponto de vista toxicológico. O indivíduo pode ser um ser-humano ou um animal não humano (por exemplo, um rato ou um macaco rhesus).

Um anticorpo da presente invenção pode ser co-administrado com medicamentos conhecidos e, nalguns casos, o próprio anticorpo pode estar modificado. Por exemplo, um anticorpo pode ser conjugado com uma imunotoxina ou com um radioisótopo para aumentar ainda potencialmente a eficácia.

Os anticorpos descritos podem ser utilizados como um instrumento terapêutico ou de diagnóstico, numa variedade de situações em que FEC-GM é expresso de forma indesejável ou que se encontra numa forma indesejável. Os distúrbios e os estados clínicos particularmente apropriados para serem tratados com um anticorpo aqui descrito são doenças inflamatórias, tais como artrite reumatóide (AR), esclerose múltipla, doença de Crohn, psoríase, asma, dermatite atópica ou choque.

Para tratar qualquer um dos distúrbios anteriores, as composições farmacêuticas que se irão utilizar de acordo com a presente invenção podem ser formuladas de uma forma convencional, utilizando um ou mais veículos ou excipientes aceitáveis sob o ponto de vista fisiológico. Um anticorpo aqui descrito pode ser administrado por meios apropriados, que variam consoante o tipo de distúrbio a ser tratado. As possíveis vias de administração incluem a administração parentérica (por exemplo, intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea), intrapulmonar e intranasal e, se desejado, para um tratamento imunossupressor local, administração intralesional. Além disso, pode-se administrar um anticorpo aqui descrito por infusão por impulso, por exemplo, com doses decrescentes do anticorpo. Preferencialmente, a dosagem é dada em injeções, mais preferencialmente, injeções intravenosas ou subcutâneas, consoante, em parte, se a administração é breve ou crónica. A quantidade a ser administrada vai depender de uma variedade de factores, tais como sintomas clínicos, peso do indivíduo, situação de estarem a ser administrados outros fármacos. Um técnico na matéria reconhecerá que a via de administração vai variar consoante o distúrbio ou o estado clínico a ser tratado.

A determinação de uma quantidade do novo polipéptido, eficaz sob o ponto de vista terapêutico, de acordo com a presente invenção, vai depender, em grande parte, das características particulares do doente, da via de administração e da natureza do distúrbio a ser tratado. A orientação geral pode-se encontrar, por exemplo, nas publicações da International Conference on Harmonisation e em REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, capítulos 27 e 28, pp. 484-528 (18ª ed., Alfonso R. Gennaro, Ed., Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990). Mais especificamente, a determinação de uma

quantidade eficaz sob o ponto de vista terapêutico irá depender de factores, tais como toxicidade e eficácia do medicamento. A toxicidade pode ser determinada utilizando processos bem conhecidos na técnica e encontrados nas referências anteriores. A eficácia pode ser determinada utilizando a mesma orientação, em conjunto com os processos que se descrevem a seguir nos exemplos.

Processos de diagnóstico

O FEC-GM é expresso por vários tipos de células incluindo linfócitos, monócitos, células endoteliais, fibroblastos e algumas células malignas; assim, um anticorpo anti-FEC-GM aqui descrito pode ser utilizado de modo a permitir a imagiologia ou a visualização de um sítio possível de acumulação de FEC-GM em diferentes tecidos num doente. A este respeito, um anticorpo pode ser marcado de forma detectável, através da utilização de radioisótopos, marcadores de afinidade (tais como biotina, avidina, etc.), marcadores fluorescentes, átomos para-magnéticos, etc. Os procedimentos para realizar essa marcação são bem conhecidos na técnica. A aplicação clínica de anticorpos em imagiologia de diagnóstico foi revista por Grossman, H. B., Urol. Clin. North Amer. 13: 465-474 (1986)), Unger, E. C. et al., Invest. Radiol. 20: 693-700 (1985)) e Khaw, B. A. et al., Science 209: 295-297 (1980)).

A detecção dos focos desses anticorpos marcados de forma detectável pode ser indicativa, por exemplo, de um sítio de inflamação. Numa modalidade, este exame é feito removendo as amostras de tecido ou de sangue e fazendo a sua incubação na presença de anticorpos marcados de forma detectável. Numa modalidade preferida, esta técnica é feita de uma forma não invasiva, através da utilização de imagiologia magnética,

fluorografia, etc. Esse ensaio de diagnóstico pode ser utilizado na monitorização do sucesso do tratamento de doenças em que a presença ou a ausência de FEC-GM é um indicador relevante. A presente invenção também contempla a utilização de um anticorpo anti-FEC-GM, tal como aqui descrito, para diagnósticos feitos *ex vivo*.

Composições terapêuticas e de diagnóstico

Os anticorpos aqui descritos podem ser formulados de acordo com processos conhecidos para preparar composições úteis sob o ponto de vista farmacêutico, em que se combina um anticorpo (incluindo qualquer dos seus fragmentos funcionais) numa mistura com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. Os veículos apropriados e a sua formulação estão descritos, por exemplo, em REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (18ª ed., Alfonso R. Gennaro, Ed., Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990). Para formar uma composição, aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, apropriada para uma administração eficaz, essa composição irá conter uma quantidade eficaz de um ou mais dos anticorpos aqui descritos, em conjunto com uma quantidade apropriada de um veículo.

As preparações podem ser formuladas de forma apropriada para originar uma libertação controlada do composto activo. As preparações de libertação controlada podem conseguir-se através da utilização de polímeros para complexar ou absorver o anticorpo anti-FEC-GM. A libertação controlada pode ser exercida seleccionando macromoléculas apropriadas (por exemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, acetato de etilenovinilo, metil-celulose, carboximetil-celulose ou sulfato de protamina) e a concentração das macromoléculas, assim como, os processos de

incorporação, de modo a controlar a libertação. Outro processo possível para controlar a duração da acção por meio de preparações de libertação controlada, consiste em incorporar um anticorpo anti-FEC-GM em partículas de um material polimérico, tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogéis, copolímeros de poli(ácido láctico) ou acetato de etilenovinilo. Alternativamente, em vez de incorporar estes agentes em partículas poliméricas, é possível reter estes materiais em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de conservação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetil-celulose ou microcápsulas de gelatina e de poli(metacrilato de metilo), respectivamente ou em sistemas coloidais de libertação de fármacos, por exemplo, lipossomas, microsferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas ou em macroemulsões. Estas técnicas estão descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences (1980).

Os compostos podem ser formulados para administração parentérica por injeção, por exemplo, por injeção em bólus ou por infusão contínua. As formulações para injeção podem apresentar-se em formas farmacêuticas unitárias, por exemplo, em ampolas ou em embalagens com várias doses, com a adição de um conservante. As composições podem tomar formas tais como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos e podem conter agentes de formulação, tais como, agentes de suspensão, de estabilização e/ou de dispersão. Alternativamente, o princípio activo pode estar sob a forma de um pó para reconstituição, antes da sua utilização, com um veículo apropriado, por exemplo, água esterilizada isenta de pirogénio.

As composições, se desejado, podem apresentar-se numa embalagem ou num dispositivo para administração, que pode

conter uma ou mais formas farmacêuticas unitárias, contendo o princípio activo. A embalagem pode conter, por exemplo, uma folha de metal ou plástico, tal como uma embalagem em "blister". A embalagem ou o dispositivo de administração pode estar acompanhado das instruções para administração.

A presente memória descritiva deve ser entendida como uma referência para os exemplos de trabalho que se seguem, que pretendem ser ilustrativos e não limitativos da presente invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Geração de anticorpos de FEC-GM humano específicos a partir de uma biblioteca de HuCAL GOLD®

A. Recuperação de fagemidos, amplificação e purificação de fagos

Amplificou-se a biblioteca de HuCAL GOLD® em 2x meio YT, contendo 34 µg/mL de cloranfenicol e glicose a 1 % (2x YT-CG). Depois de uma infecção auxiliar com fagos (VCSM13), a uma DO₆₀₀ de 0,5 (30 min, a 37 °C, sem agitação; 30 min, a 37 °C, com agitação a 250 rpm), as células foram centrifugadas (4 120 g; 5 min; 4 °C), fez-se uma nova suspensão em 2x YT/34 µg/mL de cloranfenicol/50 µg/mL de canamicina/IPTG 0,25 mM e cresceram, durante a noite, a 22 °C. Os fagos precipitaram em PEG a partir do sobrenadante, fez-se uma nova suspensão em STF/glicerol a 20 % e armazenou-se, a -80 °C. Realizou-se a amplificação dos fagos entre dois ciclos de centrifugação tal como se segue: na fase média logarítmica as células TG1 de *E. coli* foram infectadas com fagos eluídos e colocadas em placa de LB-agar, complementada com glicose a 1 % e 34 µg/mL de cloranfenicol. Depois da

incubação, durante a noite, a 30 °C, raspam-se as colónias e utilizaram-se para inocular 2x YT-CG até se atingir uma DO_{600nm} de 0,5 e adicionaram-se os fagos auxiliares, tal como descrito antes.

B. Centrifugações com HuCAL GOLD®

Para a selecção dos anticorpos que reconhecem FEC-GM humano aplicaram-se várias técnicas de centrifugação. Em resumo, dividiram-se os anticorpos-fagos de HuCAL GOLD® em três conjuntos compreendendo diferentes genes-matriz de VP. Estes conjuntos foram submetidos individualmente quer a) a uma centrifugação em fase sólida numa proteína de FEC-GM humano biotinilado (customizada pela R&D Systems, Minneapolis, MN), foram directamente revestir placas de 96 poços revestidas com neutravidina (Pierce, Rockford, IL), como suporte sólido para três ciclos ou b) uma solução de centrifugação em proteína de FEC-GM humano biotinilado, capturada em Dynabeads revestidas com estreptavidina (Dynal, Oslo, Noruega), para três ciclos.

Em detalhe, para a centrifugação em FEC-GM biotinilado imobilizado, lavaram-se os poços da placa de neutravidina, três vezes, com 300 µL de STF. Diluiu-se o antigénio até a uma concentração de 3 µg/mL (200 nM) em STF e revestiu-se com 0,1 mL por poço, durante 2 h, à temperatura ambiente. Após duas etapas de lavagem com 300 µL de STF, fez-se a incubação dos poços em tampão de bloqueio contendo 2x Chemiblocker (Chemicon, Temecula, CA), diluído em STF a 1:1.

Antes das selecções, fez-se a pré-absorção de 100 µL dos fagos de HuCAL GOLD® em 100 µL em tampão de bloqueio contendo 0,4 µL de Tween 20, a 25 %, durante 0,5 h, à TA. Os fagos bloqueados foram transferidos, em alíquotas de 100 µL, para

os poços de uma placa de neutravidina, durante 0,5 h, à TA. Esta etapa foi repetida, duas vezes, para a pré-absorção.

Após a lavagem (2x 300 µL de STF) da placa microtituladora de neutravidina revestida e bloqueada, adicionou-se, aos postos revestidos, 0,1 mL dos fagos pré-absorvidos e fez-se a incubação, durante 1,5 h, à TA, com agitação ligeira. Esta incubação foi seguida de 10 ciclos de lavagem com STF/Tween 20, a 0,05 %, à TA.

Eluíram-se os fagos ligados pela adição de 120 µL de DTT 20 mM, em Tris 10 mM, a pH 8,0, por poço, durante 10 min, à TA. O produto eluído foi retirado e adicionou-se a 14 mL de TG1 de *E. coli*, que cresceu até a uma DO_{600nm} de 0,6-0,8. Depois, ainda se lavaram os poços com 200 µL de STF e também se adicionou esta solução às células TG1. A infecção de fagos de *E. coli* foi feita, durante 45 min, a 37 °C, sem agitação. Adicionalmente, adicionou-se 200 µL de células TG1, que cresceram até a uma DO_{600nm} de 0,6-0,8 aos poços da selecção, durante 45 minutos, a 37 °C, sem agitação. Adicionaram-se estas células TG-1 a 14 ml da cultura que já continha os fagos da primeira etapa de eluição. Após centrifugação, durante 10 min, a 5 000 rpm, os péletes bacterianos foram novamente suspensos em 500 µL de meio 2x YT, colocados em placas de 2x YT-CG-agar e incubados, durante a noite, a 30 °C. Depois raspavam-se as colónias das placas e recuperaram-se os fagos e amplificaram-se, tal como se descreveu antes.

O segundo e o terceiro ciclos da selecção foram realizados de uma forma idêntica ao primeiro ciclo de selecção com uma única diferença de as condições de lavagem, após a ligação dos fagos, serem mais severas. Adicionalmente, no terceiro ciclo de selecção, submeteram-se os fagos a uma

etapa adicional de pré-absorção, em pérolas revestidas com estreptavidina (Dynabeads M-280; Dynal). Bloquearam-se tubos de Eppendorf com uma solução Chemiblocker por incubação, durante 30 min, à TA. De cada conjunto de fagos, misturou-se 0,3 mL, a 1:1, com uma solução 2x Chemiblocker, contendo Tween 20 a 0,05 % e incubou-se, durante 1 h, à TA, nos tubos de Eppendorf bloqueados, numa centrífugadora. Depois os fagos bloqueados foram transferidos para tubos de Eppendorf novamente bloqueados e adicionou-se 50 µL de Dynabeads M-280, durante mais 30 min, para uma pré-absorção. Retiraram-se as pérolas utilizando um dispositivo magnético (Dynal MPC-E). Transferiram-se alíquotas de 150 µL de fagos para placas de neutravidina, para uma posterior pré-absorção, tal como no ciclo 1 e no ciclo 2 (ver antes).

Para a centrifugação da solução, utilizando FEC-GM biotinilado com Dynabeads, aplicou-se o seguinte protocolo: bloquearam-se tubos de Eppendorf de 1,5 mL com 1,5 mL de 2x Chemiblocker diluído a 1:1 com STF, durante a noite, a 4 °C. Lavaram-se 200 µL de pérolas magnéticas revestidas com estreptavidina (Dynabeads M-280; Dynal), 1x com 200 µL de STF e fez-se novamente a suspensão em 200 µL de 1x Chemiblocker (diluído em 1x STF). Realizou-se o bloqueio das pérolas em tubos de pré-bloqueio, durante a noite, a 4 °C. Diluíram-se os fagos em 500 µL de STF para cada condição de centrifugação e misturaram-se com 500 µL de 2x Chemiblocker/Tween a 0,1 %, durante 1 h, à TA (centrífugadora). Realizou-se, duas vezes, a pré-absorção dos fagos: adicionou-se 50 µL pérolas magnéticas de estreptavidina bloqueadas aos fagos bloqueados e incubou-se, durante 30 min, à TA, numa centrífugadora. Após a separação das pérolas por via de um dispositivo magnético (Dynal MPC-E) transferiu-se o sobrenadante de fagos (~1 mL) para um novo tubo bloqueado e repetiu-se a pré-absorção em pérolas de 50 µL bloqueadas, durante 30 min. Depois,

adicionou-se FEC-GM humano biotinilado 200 nM aos fagos bloqueados num novo tubo de 1,5 mL bloqueado e incubou-se, durante 1 h, à TA, numa centrífugadora. Adicionou-se 100 µL de pérolas magnéticas de estreptavidina bloqueadas a cada um dos conjuntos de fagos da centrifugação e incubaram-se, durante 10 min, à TA, numa centrífugadora. Recolheram-se os fagos ligados ao FEC-GM biotinilado e depois imobilizaram-se com as pérolas magnéticas que se recolheram com um separador magnético de partículas (DynaL MPC-E). Depois, lavaram-se as pérolas 7x em STF/Tween a 0,05 %, utilizando uma centrífugadora, seguido de lavagem, mais três vezes, com STF. A eluição dos fagos das Dynabeads foi feita adicionando 300 µL de DTT 20 mM, em Tris/HCl 10 mM, a pH 8, a cada um dos tubos, durante 10 min. Retiram-se as Dynabeads por meio de um separador magnético de partículas e adicionou-se o sobrenadante a 14 mL de uma cultura de TG-1 de *E. coli*, que cresceu até a uma DO_{600nm} de 0,6-0,8. Depois, lavaram-se as pérolas, uma vez, com 200 µL de STF e adicionou-se STF contendo mais fagos removidos a 14 mL da cultura de TG-1 de *E. coli*.

Após a centrifugação, durante 10 min, a 5 000 rpm, os péletes bacterianos foram novamente suspensos em 500 µL de 2x meio YT, foram colocados em placas de 2x YT-CG-agar e incubados, durante a noite, a 30 °C. Rasparam-se as colónias das placas e recuperaram-se os fagos e amplificaram-se, tal como se descreveu antes.

O segundo e o terceiro ciclos da centrifugação da solução, em FEC-GM biotinilado, foi feito de acordo com o protocolo do primeiro ciclo excepto no facto de se ter aumentado a severidade dos procedimentos de lavagem.

C. Subclonagem de fragmentos Fab seleccionados e expressão de fragmentos Fab solúveis

Fez-se uma subclonagem do Fab que codifica as inserções dos fagemidos seleccionados de HuCAL GOLD® no vector de expressão pMORPH®X9_Fab_FH (fig. 5) para facilitar uma rápida expressão de Fab solúvel. O ADN dos clones seleccionados foi digerido com *XbaI* e *EcoRI*, cortando assim a inserção que codifica o Fab (ompA-VLCL e phoA-Fd) e clonou-se no vector digerido por *XbaI/EcoRI*, pMORPH®X9_Fab_FH. Os Fab expressos nestes vectores comportavam dois marcadores do terminal C (FLAG™ e 6 x His, respectivamente) para a detecção e a purificação.

D. Microexpressão dos anticorpos de Fab de HuCAL GOLD® em *E. coli*

As colónias simples obtidas após a subclonagem em pMORPH®X9_Fab_FH foram utilizadas para inocular poços de uma placa microtituladora esterilizada, com 96 poços, contendo 100 µL de 2x meio TY/Cm/Glu a 1 %, por poço e deixou-se crescer, durante a noite, a 37 °C. Transferiu-se 5 µL de cada cultura de TG-1 de *E. coli* para uma nova microplaca tituladora esterilizada, de 96 poços, contendo 100 µL de 2x meio TY/Cm/Glu a 0,1 % por poço. Incubaram-se as placas microtituladoras, a 30 °C, com agitação a 400 rpm, num agitador de microplacas, até as culturas ficarem ligeiramente turvas (~2-4 h), com uma DO_{600nm} de 0,5.

Adicionaram-se a estas placas de expressão, 20 µL de 2x YT/Cm/IPTG 3 mM por poço (concentração final de IPTG 0,5 mM), selaram-se com um cartucho permeável ao gás e incubaram-se, durante a noite, a 30 °C, com agitação a 400 rpm.

Geração de lisados de células completos (extractos de BEL)

Adicionou-se a cada poço das placas de expressão, 40 µL de tampão BEL (2x BBS/EDTA: 24,7 g/L de ácido bórico, 18,7 g de NaCl/L, 1,49 g de EDTA/L, a pH 8), contendo 2,5 mg/mL de lisozima e incubou-se, durante 1 h, a 22 °C, num agitador de placas microtituladoras (400 rpm). Utilizaram-se os extractos de BEL para análise de ligação por ELISA ou por um analisador BioVeris M-series® 384 (ver exemplo 2).

E. Expressão dos anticorpos de Fab de HuCAL GOLD® em *E. coli* e purificação

A expressão dos fragmentos de Fab codificados por pMORPH®X9_Fab_FH, em células de TG1, foi feita num frasco de agitação com 1 L de 2 x meio YT complementado com 34 µg/mL de cloranfenicol. Após a indução com IPTG 0,5 mM, as células cresceram, a 22 °C, durante 16 h. Os extractos completos de células dos péletes de células foram preparados com uma French Press e isolaram-se os fragmentos Fab por cromatografia em níquel/NTA (Qiagen, Hilden, Alemanha). Determinaram-se as concentrações por espectometria de UV (Krebs et al., 2001).

Exemplo 2: Identificação de anticorpos específicos de FEC-GM humano

Analísaram-se os extractos de BEL dos clones individuais de *E. coli* seleccionados pelas estratégias de centrifugação mencionadas antes, por meio de ELISA ou BioVeris (analisador BioVeris M-series® 384), de modo a identificar os clones que codificam FAB específicos de FEC-GM humano.

A. Técnicas de ensaios imunoabsorventes ligados a enzimas (ELISA)

Revestiram-se com FEC-GM biotinilado recombinante humano (R&D Systems), a 1,5 µg/mL em STF, placas microtituladoras de neutravidina, durante 2 h, à TA.

Depois do revestimento do antigénio, bloquearam-se os poços com STF/Tween 0,05 % (STF-T), com ASB a 1 %, durante 1 h, à TA. Depois das lavagens dos poços com STF-T BEL-extracto, diluiu-se o Fab de HuCAL® purificado ou as IgG de controlo, em STF, adicionou-se aos poços e incubou-se, durante 1 h, à TA. Para a detecção dos anticorpos primários, aplicaram-se os anticorpos secundários que se seguem: fosfatase alcalina (AP) conjugada com fragmento F(ab')₂ AffiniPure, IgG de cabra anti-humana, anti-murganho ou anti-rato (Jackson Immuno Research). Para a detecção dos substratos fluorogénicos conjugados com AP, utilizou-se AttoPhos (Roche), de acordo com as instruções do fabricante. Entre todas as etapas de incubação, os poços das placas microtituladoras foram lavados, três vezes, com STF-T e três vezes depois da incubação final com anticorpo secundário. Mediu-se a fluorescência num leitor de placas Spectrafluor da TECAN.

B. Electroquimioluminescência com base na análise de ligação para a detecção de Fab ligado a FEC-GM em lisados

Em alternativa às experiências por ELISA para a detecção dos anticorpos Fab de ligação a FEC-GM em lisados de *E. coli* (extractos de BEL), analisou-se a ligação num analisador BioVeris M-SERIES® 384, BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, RU).

Com esta finalidade, diluiu-se o extracto de BEL pelo menos a 1:50 e maximizou-se a 1:1000 num tampão de ensaio (STF/Tween 20 a 0,05 %/ASB a 0,5 %), para se utilizar no rastreio por BioVeris. Acoplou-se FEC-GM biotinilado (R&D Systems) a pérolas magnéticas revestidas com estreptavidina, Dynabeads (Dyna), a uma concentração de 0,1 µg/mL. Para cada poço de uma placa de 96 ou 384 poços, utilizou-se 25 ou 15 µL de uma diluição a 1:25 de uma solução concentrada de Dynabead. Lavaram-se, três vezes, as pérolas com um tampão de ensaio antes da adição de FEC-GM biotinilado, durante 30 min, à TA, num agitador. Depois, lavaram-se, três vezes, as pérolas com tampão de ensaio e finalmente suspenderam-se novamente num tampão de ensaio fresco. Marcou-se com ruténio o (Fab)'₂ anti-humano (Dianova) utilizando o marcador BV-tagTM (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, RU). Adicionou-se este anticorpo secundário às pérolas acopladas com FEC-GM, a uma concentração de 6 µg/mL, imediatamente antes da sua utilização. Encheram-se os poços da placa microtituladora, com 96 ou 384 poços, com 100 µL ou 60 µL de extracto de BEL diluído (ver antes) das culturas de expressão de *E. coli* contendo anticorpos Fab, com 25 ou 15 µL das pérolas acopladas com FEC-GM, mais a mistura de anticorpo secundário anti-Fab-BV-tagTM, respectivamente a cada poço e incubou-se, durante 2 h, à TA, num dispositivo de agitação de placas. Analisaram-se as placas num analisador BioVeris M-SERIES[®] 384.

Depois da análise das sequências, identificaram-se setenta e quatro (74) clones únicos que mostraram uma ligação suficientemente forte (proporção de sinal: ruído superior a 10:1 em ELISA ou 50:1 em BioVeris). Estes clones foram expressos, purificados e analisados em ensaios funcionais.

C. Determinação da especificidade molecular e da reticulação das espécies dos Fab anti-FEC-GM humano seleccionados

Determinou-se a reticulação dos anticorpos anti-FEC-GMh com os analitos que se seguem: FEC-GM de rato e de murganho, IL-3 humana, IL-4 humana, IL-5 humana, IL-13 humana, FEC-M humano (todos da Peprotech, London, RU). Realizou-se num conjunto de captura por ressonância plasmónica de superfície (Biacore 3000, Uppsala, Suécia).

Revestiram-se chips de CM5 (Biacore, Suécia) com 5 000-6 000 UR anti-F(ab)₂ (Dianova, fragmento Affinipure F(ab)₂ de IgG de cabra anti-humana, fragmento F(ab)₂ específico); 80 µg/mL de tampão de acetato 10 mM, a pH 4, nos 4 fluxos de células, utilizando a química-padrão das aminas ECD-NHS. Nas células do fluxo, capturaram-se 2-4 Fab específicos de FEC-GM (20 µL de Fab 500 nM a uma velocidade de fluxo de 5 µL/mL, 300-400 UR). Após a captura do Fab específico, injectou-se tampão para determinar a dissociação da interacção anti-Fab/Fab. Num ciclo seguinte, injectou-se um factor de crescimento do analito (20 µL, velocidade de fluxo de 20 µL/min), numa gama de concentração entre 15 e 2 000 nM, para a determinação do sinal específico. Depois de se ter conseguido o sensograma do tampão, subtraiu-se manualmente do específico. Depois de cada ciclo, regeneraram-se as células do fluxo com HCl 100 mM (5 µL).

Analysaram-se sete anticorpos anti-FEC-GMh de HuCAL[®], incluindo MOR03684 e MOR03682 e eram específicos para FEC-GM humano e não se ligaram a nenhuma das outras citocinas ou FEC-GM de murganho ou de rato. Pelo contrário, o Fab MOR03929 mostrou uma reticulação significativa com FEC-GM de rato.

Exemplo 3: Identificação de candidatos de Fab anti-FEC-GM anti-humano que inibem a interação entre FEC-GM e o receptor alfa de FEC-GM

Seleccionaram-se 74 anticorpos diferentes específicos de FEC-GMh a partir da biblioteca de HuCAL GOLD® e ensaiaram-se quanto à potência para inibir a interação entre FEC-GMh e o seu receptor. Analisou-se a interação de duas formas, (i) sendo uma delas um ensaio de proliferação utilizando uma linha de células TF-1 dependente de FEC-GM (Kitamura et al., 1989) e (ii) sendo a outra a análise por SCAF com uma linha de células recombinante de OHC, que expressa a cadeia alfa do receptor de FEC-GM. No ensaio de proliferação de TF-1, analisou-se a capacidade dos anticorpos anti-FEC-GM para bloquear a interação de FEC-GM com o receptor endógeno de FEC-GM de cadeias alfa e beta, conduzindo à redução da proliferação das células. No ensaio por SCAF, determinou-se a inibição específica da interação entre FEC-GM e a cadeia alfa do receptor de FEC-GM.

A. Clonagem e expressão de *macaca mulatta* e FEC-GM humano

Sintetizou-se ADNc de comprimento completo de FEC-GM de *macaca mulatta* (GenBank com o nº. de acesso: AY007376) por síntese de genes (geneART GmbH, Regensburg, Alemanha) e clonou-se no vector pCR-Script-Amp (Stratagene, LaJolla, CA, EUA). Em seguida, clonou-se o ADNc no vector de expressão eucariótico ADNpc3.1(+) (Invitrogen, Paisley, RU) obtendo-se ADNpc-FEC-GMmac. O ADNc de FEC-GM humano (Genbank com o nº. de acesso NP_000749) foi clonado pela técnica de RCP-TI, a partir de ARN isolado de 1×10^7 células TF-1 utilizando o estojo RNeasy da Qiagen (Hilden, Alemanha). Realizou-se a transcrição inversa com o estojo Superscript II utilizando hexâmeros aleatórios (Gibco) seguido da amplificação do ADNc

de FEC-GM por RCP. O produto de RCP obtido foi clonado no vector de expressão ADN-pc3.1(+), obtendo-se ADNpc-FEC-GM humano.

As células HEK293 foram transfectadas transientemente com estes vectores de expressão utilizando, respectivamente, lipofectamina (Stratagene, LaJolla, EUA). Recolheu-se o meio contendo FEC-GM recombinante segregado de macaca ou de seres humanos, 4 dias após a transfecção.

B. Inibição da proliferação de células de TF-1 dependente de FEC-GM, por meio de Fab anti-FEC-GMh, utilizando FEC-GM humano ou de macaca

As células TF-1 (Kitamura et al., 1989) cresceram de acordo com o protocolo do fornecedor (DSMZ, Braunschweig, Alemanha; DSMZ N.º. ACC 334). Lavaram-se, duas vezes, as células de TF-1 com meio RPMI1640 (FCS a 10 %) e depois semearam-se a uma concentração de 2×10^5 células/mL, em 50 µL por poço de um prato de cultura de células de fundo plano com 96 poços. Misturou-se FEC-GM recombinante humano ("Leucomax", ESSEX Pharma, Munique), a 0,5 ng/mL e anticorpos Fab HuCAL® (200 ng/mL - 200 µg/mL diluído em meio RPMI1640, FCS a 10 %), durante 30 min. e adicionou-se 50 µL da mistura a células TF-1, de modo a que a concentração final de FEC-GM fosse de 0,25 ng/mL. Mediu-se a proliferação máxima das células (inibição de 0 %), incubando-se células TF-1 a uma concentração final de FEC-GM de 0,25 ng/mL, sem a adição do anticorpo. Mediu-se a inibição de 100 % da proliferação de TF-1 omitindo FEC-GM do ensaio e conservando as células apenas em meio RPMI1640 (FCS a 10 %). Depois, incubaram-se as células TF-1, durante 72 horas, a 37 °C, com CO₂ a 5 %, numa câmara humidificada. Mediu-se a vitalidade das células adicionando o reagente MTT ou XTT (Roche, Mannheim,

Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Identificaram-se no total 19 Fab, que demonstraram uma inibição significativa da proliferação de células TF-1. Os ligantes MOR03682, MOR03684 e MOR03929 mostraram uma consistência de inibição da proliferação das células TF-1 maior do que 50 %, a uma concentração de 2 μ M. A actividade inibidora destes Fab não otimizados não foi suficientemente forte para determinar a dose de CI₅₀, porque não se conseguiu atingir a inibição total. Em comparação, os anticorpos monoclonais BVD2-21C11 (BD Biosciences Pharmingen; Cat#554503) e MAB215 (R&D Systems Cat#MAB215) foram capazes de inibir completamente a proliferação de TF-1.

Adicionalmente, a ligação de MOR03682 e MOR03684 a FEC-GM humano natural foi ensaiada no ensaio de proliferação de TF-1. Em vez de se adicionar FEC-GM recombinante humano purificado às células TF-1, utilizou-se um sobrenadante de células 5637 (DSMZ N°. ACC 35) que segrega FEC-GM humano natural no meio. A partir de uma curva de resposta à dose, comparando o efeito de FEC-GM humano recombinante com diferentes diluições do sobrenadante de 5637, determinou-se que o meio continha ~5 ng/mL de FEC-GM humano natural. Por pré-incubação do sobrenadante de 5637 com os Fab MOR03682 ou MOR03684 de FEC-GM anti-humano, bloqueou-se a ligação de FEC-GM humano natural às células TF-1, de modo que se reduziu comparavelmente a viabilidade das células em comparação com a experiência com FEC-GM humano recombinante. MOR03684 e MOR03682 ligam-se assim a FEC-GM humano natural. O Fab MOR03929 não foi ensaiado neste ensaio.

Adicionalmente, ensaiou-se a reticulação de FEC-GM de macaca no ensaio de proliferação de TF-1. Em vez de se adicionar FEC-GM humano purificado às células TF-1, utilizou-

se um sobrenadante de células HEK293 transfectadas que segrega FEC-GM recombinante de macaca no meio.

As células TF-1 proliferaram na presença de sobrenadante contendo FEC-GM de macaca mas não proliferaram na presença de sobrenadante de células HEK293 não transfectadas. A partir da curva de resposta à dose e comparando o efeito de FEC-GM humano recombinante com diferentes diluições do meio de HEK293, determinou-se que o meio de células transfectadas continha ~2 µg/mL de FEC-GM de macaca. Por pré-incubação do sobrenadante de FEC-GM de macaca com os Fab de FEC-GM anti-humanos MOR03682 ou MOR03684, bloqueou-se a ligação de FEC-GM de macaca às células TF-1, de tal modo que a viabilidade das células foi significativamente reduzida. MOR03682 e MOR03684 reticulam assim com FEC-GM de macaca. Não se ensaiou o Fab MOR03929 neste ensaio.

C. Bloqueio da ligação de FEC-GM ao receptor alfa de FEC-GM por Fab anti-FEC-GMh

Para ensaiar a ligação de FEC-GM à superfície celular expressa pela cadeia alfa do receptor de FEC-GM, clonou-se o ADNc num vector de expressão e transfectou-se de forma estável em células de OHC-K1 (DSMZ ACC 110).

Clonagem de uma linha de células estável de OHC-K1 que expressa a cadeia alfa do receptor de FEC-GM

Clonou-se o ADNc da cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano (Genbank, número de acesso M64445) por técnicas de RCP-II, a partir de ARN isolado de um 1×10^7 células TF-1 utilizando o estojo RNeasy da Qiagen (Hilden, Alemanha). Fez-se a transcrição inversa com o estojo de SuperscriptII utilizando hexâmeros aleatórios (Gibco). Depois, amplificou-

se o ADNc da cadeia alfa do receptor de FEC-GM utilizando os seguintes iniciadores:

5': N-GCRa-plusSS: TTCTCTGGATCCGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCC e

3': C-flGCRa: ACCCTCCAATTGTCAGGTAATTCCTTCACGGTC.

A reacção de RCP originou um produto de ~1 250 pb, que foi digerido com *EcoRI* e *BamHI* (New England BioLabs). O vector de expressão ADNpc3.1(+) (Invitrogen, Paisley, RU) foi digerido com as mesmas enzimas. Após a purificação do vector digerido e do produto de RCP, ligaram-se os fragmentos transformados por electroporação em células DH10B de *E. coli*. Identificaram-se os clones correctos após a preparação do ADN do plasmido e a sequenciação. Os clones correctos (ADNpc3.1(+)-R alfa de FEC-GM) continham o ADNc do receptor alfa de FEC-GM humano de comprimento completo.

As células de OHC-K1 cresceram de acordo com o protocolo do fornecedor (DSZM, Braunschweig, Alemanha; DSMZ Nº. ACC 110). Para a transfecção, as células cresceram até a uma confluência de 80 %, numa placa de 6 poços e foram incubadas com 5 µg de ADN de ADNpc3.1(+)-Ralfa de FEC-GM misturado com 10 µL do reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Passadas 48 h, alimentaram-se as células com 1 mg/mL de G418 (Gibco) e, passadas mais 24 h, substituiu-se o meio com um meio contendo 2 mg/mL de G418. Passadas duas semanas, semearam-se células simples em poços de um prato de cultura de 96 poços. Os clones simples cresceram e fez-se a análise de 5×10^5 células de cada clone quanto à expressão de R alfa de FEC-GM, por análise de SCAF, utilizando o MAB1006 de IgG de murino (Chemicon International, Temecula, CA) como anticorpo primário, numa concentração de 1 µg/mL e (R-PE-AffiniPure (Fab')₂ IgG de cabra anti-murganho (Dianova) como segundo

anticorpo, numa diluição de 1:200. Incubaram-se os anticorpos primário e secundário com as células, durante 1 h, sequencialmente, enquanto se lavaram as células num tampão de SCAF (STF, FCS a 3 %) entre estas etapas. Quantificou-se a fluorescência das células coradas no canal de FL2, utilizando um sistema FACScalibur (Becton Dickinson).

Entre os clones analisados, o clone OHC-GMRa#11 mostrou a mais elevada intensidade de fluorescência mediana. Um valor de fluorescência mediana (valor de LFM) de 157 foi determinado para OHC-GMRa#11 (fig. 6).

Análise por SCAF da ligação de FEC-GM ao receptor alfa de FEC-GM expresso em OHC-GMRa#11:

Antes da adição às células, co-incubaram-se os anticorpos, com concentrações crescentes (0,1 a 100 µg/mL) com FEC-GM biotinilado (0,5 µg/mL) em tampão de SCAF (STF/FBS a 3 %/NaN₃ a 0,05 %), durante 30 min, à TA.

Todas as colorações foram realizadas em placas de cultura de fundo redondo, de 96 poços (Nalge Nunc), com 1-5 x 10⁵ células por poço. Retirou-se 2 x 10⁵ células de OHC-GMRa#11 para 50 µL do tampão de SCAF contendo anticorpo/FEC-GM e fez-se a sua incubação, a 4 °C, durante 1 h. Depois, lavaram-se as células, uma vez, com 150 µL de tampão de SCAF/poço e recolheram-se em 100 µL de estreptavidina marcada com ficoeritrina (BD Biosciences Pharmingen), que tinha sido diluída a 1:400, em tampão de SCAF. Passada 1 h de incubação, a 4 °C, lavaram-se as células, duas vezes, com tampão de SCAF, suspenderam-se novamente em 100 µL de tampão de SCAF e mediu-se a ligação de FEC-GM biotinilado, por via da intensidade da fluorescência de FL2 das células em FACScalibur (Becton Dickinson). Determinaram-se os valores de

CI₅₀ a partir das curvas de resposta à dose obtidas utilizando o programa informático GraphPad Prism v3.03 aplicando um ajustamento da curva de regressão não linear.

Os anticorpos Fab MOR03682, MOR03684 e MOR03929 mostraram uma inibição significativa da ligação de FEC-GM à superfície das células que expressam o receptor alfa de FEC-GM.

Exemplo 4: Afinidade de maturação de Fab seleccionado por uma permuta em etapas de cartuchos de RDC

A. Geração de bibliotecas de Fab de maturação por afinidade e aderência a uma superfície sólida

Para aumentar a afinidade e a actividade inibidora dos fragmentos Fab anti-FEC-GM submeteram-se os clones MOR03682, MOR03684 e MOR03929 a uma maturação por afinidade. Nesta circunstância, optimizaram-se as regiões RDC por mutagénese de cassetes, utilizando a mutagénese dirigida a trinucleótidos (Virnekäs et al., 1994; Nagy et al., 2002). A análise das sequências não revelou homologia de sequências entre as RDC dos três clones parentais analisados. Os quadros 2a e 2b ilustram as seis sequências de péptidos de RDC para os clones parentais MOR03682, MOR03684 e MOR03929.

Em seguida, descreve-se, de forma reduzida, o protocolo utilizado para a optimização de Fab. Clonaram-se os fragmentos Fab do vector de expressão pMORPH®X9Fab_FH num vector de fagemido (patente norte-americana 6 753 136). Depois, aplicaram-se duas estratégias diferentes para optimizar a afinidade e a eficácia dos Fab parentais.

Primeiro, gerou-se uma biblioteca de Fab de anticorpos de fagos, em que a RDC3-L de cada Fab parental foi substituída por um reportório de sequências individuais de RDC3 de cadeia leve lambda. Numa segunda biblioteca, a região RDC2-P foi substituída por um reportório de sequências individuais de RDC2 de cadeia pesada.

Geraram-se bibliotecas de maturação por afinidade transformando os clones diversificados em TOP10F' de *E. coli* (Invitrogen). Prepararam-se os fagos tal como descrito no exemplo 1A. Reuniram-se ambas as bibliotecas RDC3-L de MOR03684 e MOR03682 e ambas as bibliotecas de RDC2-P derivadas de MOR03684 e MOR03682, enquanto as bibliotecas de RDC3-L e RDC2-P, derivadas de MOR03929, foram conservadas separadamente durante o procedimento de selecção. A aderência a uma superfície sólida foi realizada em FEC-GM biotinilado em solução, durante três ciclos, descritos de forma essencial no exemplo 1B e aplicando condições de selecção mais rigorosas.

B. Análise da ligação à base de electroquimioluminescência (BioVeris) para a detecção da melhoria da ligação de Fab a FEC-GM em lisados

Para a detecção dos anticorpos Fab de ligação a FEC-GM em lisados de *E. coli* (extractos BEL), analisou-se a ligação em BioVeris M-384 SERIES® Workstation (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, RU), praticamente tal como descrito no exemplo 2B.

Os Fab com os valores mais elevados de ECL foram purificados e submetidos à medição da afinidade por meio da titulação de uma solução de equilíbrio (TSE; Haenel et al.,

2005) e ressonância plasmónica de superfície (Biacore) (ver exemplo 4D).

C. Clonagem de X de VL (RDC3-L) com uma melhoria de VP (RDC2-P)

Para uma melhoria da afinidade, combinaram-se as RDC2-P e RDC3-L, optimizadas independentemente, a partir de Fab maturados, que derivaram do mesmo clone parental, porque havia uma elevada probabilidade de que esta combinação levasse a um maior ganho de afinidade (Yang et al., 1995; Schier et al., 1996; Chen et al., 1999). Este procedimento, designado por clonagem X, foi aplicado para ligantes que derivaram do clone parental MOR03929, sob a forma de Fab com maiores afinidades, que foram identificados a partir de ambas as bibliotecas de RDC2-P e RDC3-L. Conseguiu-se isto transferindo todas as cadeias leves (fragmento de XbaI/SphI) do clone dador optimizado de RDC3-L para o clone receptor optimizado de RDC2-P.

Quadro 3: Combinações da clonagem de X

Parental	Dador de VP		Dador de VL	Fab com afinidade melhorada após a clonagem de X
MOR03929	MOR04287	x	MOR04302	MOR04350
	MOR04290			MOR04354
	MOR04252			MOR04357
MOR03682	MOR04283	x	MOR04297	MOR04342

Para os 4 Fab resultantes, sequenciou-se VL e VP para confirmar a transferência da VL correcta para a respectiva estrutura melhorada do vector de RDC2-P. O quadro 2a e 2b mostra as sequências das proteínas de VP e de VL de todos os derivados de MOR03929 e 3682, que estão listados no quadro 3.

D. Determinação de afinidades picomolares utilizando a titulação da solução de equilíbrio (TSE) e a ressonância plasmónica de superfície (Biacore)

Para a determinação de K_D , utilizaram-se fracções de monómeros (um teor de monómero de pelo menos 90 %, analisado por SEC analítica; Superdex75, Amersham Pharmacia) de Fab. A determinação da afinidade com base na electroluminiscência (ECL) em solução e a avaliação dos dados foram realizados basicamente, tal como descrito por Haenel et al., 2005: equilibrizou-se uma quantidade constante de Fab com diferentes concentrações (diluições em série 5^n) de FEC-GM humano (*Leucomax*) em solução. Adicionou-se o FEC-GM humano biotinilado (R&D Systems), acoplado a pérolas magnéticas (estreptavidin M-280, Dynal) e (Fab) $'_2$ anti-humano (Dianova) marcado com BV-tagTM (BioVeris Europe, Witney, Oxforfshire, RU) e incubou-se, durante 15 - 30 min. Em seguida, quantificou-se a concentração de Fab não ligado, por via da detecção por ECL, utilizando um analisador M-SERIES[®] 384 (BioVeris Europe).

De acordo com Friguet et al., 1985, deve-se tomar cuidado para evitar um deslocamento significativo do equilíbrio para a fase sólida durante a detecção.

Utilizando as condições de ensaio descritas antes, determinaram-se as afinidades dos Fab que estão ilustradas no quadro 4.

Adicionalmente, realizou-se uma análise cinética por SPR num chip F1 (Biacore, Suécia), que estava revestido com uma densidade de ~100 UR de FEC-GM humano recombinante (Peprotech), em acetato de Na 10 mM, a pH 4,5, utilizando a química-padrão de acoplamento de aminas ECD-NHS. Imobilizou-

se a respectiva quantidade de HSA na célula de fluxo de referência. Utilizou-se como tampão de passagem STF (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, a pH 7,4) + Tween 20 a 0,005 %. Aplicou-se o Fab em concentrações em série de 6,3-200 nM, a uma velocidade de fluxo de 20 µL/min. Estabeleceu-se a fase de associação aos 60 s e a fase de dissociação aos 120 s (parental) ou até aos 600 s (afinidade otimizada). Para monitorizar a fase de dissociação, ao longo de um período mais longo, utilizaram-se as condições que se seguem, basicamente de acordo com Drake et al., (2004): aplicou-se Fab numa única concentração de 200 nM; fixou-se a velocidade de fluxo em 100 µL/min e a fase de dissociação aos 6 000-18 000 s. Com base nas taxas determinadas nestas condições de ensaio, estimaram-se as afinidades para os Fab, que estão ilustradas no quadro 4.

Quadro 4: Afinidade dos Fab anti-FEC-GM humanos determinada por Biacore e titulação de uma solução de equilíbrio (TSE)

	Biacore	TSE
MOR0	K_D (pM)	K_D (pM)
3684	6 420	16 000
4251	70	7,4
3929	4 260	2 000
4302	174	63 5
4287	nd	17,9
4252	55	6
4290	122	11 1
4350	19	1,1
4354	21	2 8
4357	7	0,4
3682	nd	11 406
4283	nd	113
4297	nd	49,2
4342	nd	4,9

E. Determinação das afinidades de FEC-GM de rato utilizando a titulação de uma solução de equilíbrio (TSE)

A determinação da afinidade com FEC-GM de rato foi feita praticamente como descrito no exemplo 4D, utilizando como analito FEC-GM de rato (Peprotech) em solução, em vez de FEC-GM humano. Calcularam-se as afinidades de acordo com Haenel *et al.* (2005). Neste ensaio, determinou-se a afinidade do Fab MOR04357 com FEC-GM de rato, como sendo $K_D = 1,0$ nM.

Exemplo 5: Caracterização de Fab otimizados anti-FEC-GM humanos que inibem a interação entre FEC-GM e a cadeia alfa do receptor de FEC-GM. Ensaio de ligação do receptor alfa de FEC-GM

Realizou-se o ensaio de ligação do receptor de FEC-GM tal como descrito antes (Exemplo 3C), utilizando 0,5 µg/mL (35 nM) de FEC-GM biotinilado. Mediu-se a ligação máxima de FEC-GM a células de OHC-GMRa#11 (0 % de inibição), por meio da incubação das células, numa concentração final de FEC-GM de 0,5 µg/mL de FEC-GM biotinilado, sem a adição de anticorpo. A inibição de 100 % da ligação de FEC-GM foi medida omitindo FEC-GM do ensaio. Determinaram-se os valores de CI_{50} a partir das curvas de resposta à dose obtidas utilizando o programa informático GraphPad Prism v3.03, aplicando o ajustamento da curva de regressão não linear.

Os Fab com maiores afinidades, os Fab parentais e as IgG monoclonais de referência foram todos analisados. O quadro 5 resume os valores de CI_{50} obtidos nestes ensaios. A % de inibição alcançada para uma concentração de anticorpo de 5 µg/mL está também indicada no quadro 5.

Quadro 5: Valores de CI_{50} de Fab anti-FEC-GM humano num ensaio de inibição do receptor

MOR0#	4251	4357	4354	4350	4252	4287	4290	4302	3684	3929	Mab215	21C11
CI_{50} (nM)	53	26	26	24	26	25	27	24	>400	35	sem ajustamento*	9
% de inibição com 5 µg/mL de anticorpo	~100%	~75%	~75%	~75%	~75%	~75%	~75%	~75%	~25%	~60%	~50%	~100%
*neste caso não pôde ser ajustada nenhuma curva sigmoideal de resposta à dose												

Este ensaio mostrou, quantitativamente, que os Fab obtidos a partir da maturação de afinidade e da clonagem de X evitam que FEC-GM se ligue à cadeia alfa do receptor de FEC-GM e, por isso, retêm o mecanismo de bloqueio dos seus Fab parentais. O ensaio tem que ser realizado com uma concentração de 35 nM (0,5 pg/mL) de FEC-GM biotinilado de modo a obter um sinal significativo em SCAF. Por isso, teoricamente, é necessário Fab 17,5 nM (ou IgG 8,75) para bloquear 50 % de FEC-GM, fixando-se assim um limite para a determinação dos valores de CI_{50} .

B. Inibição da proliferação de TF-1 dependente de FEC-GM por meio de Fab anti-FEC-GM utilizando FEC-GM humano

Realizou-se o ensaio de proliferação de TF-1, tal como descrito no exemplo 3B. Analisaram-se os Fab com afinidades acrescidas e os Fab parentais, assim como as IgG monoclonais de referência. Determinaram-se os valores de CI_{50} a partir das curvas de resposta à dose utilizando o programa informático GraphPad Prism v3.03, aplicando um ajustamento da curva por regressão não linear. O quadro 6 resume os valores de CI_{50} obtidos nestes ensaios.

Quadro 6: Valores de CI_{50} dos Fab anti-FEC-GM e IgG de controle, num ensaio de proliferação de

TF-1

MOR#	4251	4357	4354	4350	4252	4287	4290	4302	3684	3929	Mab215	BVD2- 21C11
CI_{50} (pM)	463	90	56	82	2010	3382	696	10678	>200000	>200000	4315	6560
CI_{50} aumentado X vezes em comparação com Mab215	9,3	47,9	77,1	52,6	2,1	1,3	6,2	-	-	-	-	-
CI_{50} aumentado X vezes em comparação com BVD2-21C11	14,2	72,9	117,1	80,0	3,2	1,9	9,4	-	-	-	1,5	-

Noutro conjunto de experiências, os valores de CI_{50} no ensaio de proliferação de TF-1 foram determinados para o Fab parental MOR03682, os seus derivados maturados por afinidade MOR04283, MOR04297 e a variante MOR04342 clonada por X. O quadro 7 resume os valores de CI_{50} obtidos nestes ensaios.

Quadro 7: Valores de CI_{50} dos Fab anti-FEC-GMh num ensaio de proliferação de TF-1

MOR0#	4342	4283	4297	3682
CI_{50} (pM)	80	17293	13975	>200000

Estas experiências demonstraram que se conseguem grandes aumentos dos valores de CI_{50} depois da maturação por afinidade e a clonagem de X. Por exemplo, MOR04357, MOR04350, MOR04354 mostram valores de CI_{50} aumentados mais do que 2000 vezes, em comparação com os seus MOR03929 parentais e excedendo a potência de BVD2-21C11 e de Mab215.

Exemplo 6: Conversão de MOR04357 no formato de IgG1 humana

A. Optimização genética das sequências de ADN de Fab para expressão em sistemas de expressão de mamíferos

Para otimizar o ADN da VP e VL de MOR04357 para a expressão genérica em mamíferos (por exemplo, alterando a utilização do codão, o teor de GC, etc.) utilizou-se o programa informático GeneOptimizerTM da Geneart (Regensburg, Alemanha) para definir essas sequências optimizadas do ADN de VP e VL, cujo genes foram sintetizados no Geneart (Regensburg, Alemanha) e clonados em vectores de RCPp-Script originando 055906pPCR-Script e 055907pPCR-Script. A SEQ ID Nº. 48 mostra a respectiva sequência da VP, enquanto a SEQ ID Nº. 57 mostra a respectiva sequência da VL.

B. Clonagem de Fab MOR04357 no formato de IgG1 humana e a expressão de IgG1

Para expressar a imunoglobulina (Ig) de comprimento completo, subclonaram-se fragmentos do domínio variável das cadeias pesada (VP) e leve (VL) do gene otimizado, a partir dos vectores de RCPp-Script (exemplo 5a), nas séries de vectores pMORPH[®]2_h-Ig para IgG1 humana. Isolou-se VP de MOR04357 otimizado pelo codão a partir de 055906pPCR-Script por via da digestão feita com *NheI/BlpI* e a inserção no vector principal pMorph2_h-IgG1f, com as mesmas enzimas de restrição. Este vector já continha uma região constante gama 1 humana. O plasmido de expressão resultante foi designado por pMorph2_h-IgG1f_MOR04357_co. A VL otimizada por codão de MOR04357 foi isolada a partir de 055907pPCR-Script por via da digestão com *NheI/HpaI* e foi inserida no vector principal pMorph2_h-Iglambda2, cortado com as mesmas restrições de enzimas. Este vector já continha uma região constante lambda humana. O plasmido de expressão resultante foi designado por pM2_h-Iglambda2_MOR04357_co.

C. Expressão temporária e purificação da IgG humana

Transfectaram-se células HKB11 eucarióticas com uma quantidade equimolar do ADN do vector de expressão de cadeia leve e de cadeia pesada de IgG. Recolheu-se o sobrenadante da cultura de células a partir de 3 a 7 dias após a transfecção. Depois de se ajustar o pH do sobrenadante para 8,0 e de se fazer uma filtração esterilizada, submeteu-se a solução a uma cromatografia de afinidade-padrão em proteína A (rProteinA FF ou MabSelect SURE, GE Healthcare). Realizou-se a troca do tampão com 1 x STF de Dulbecco (pH 7,2, Invitrogen) e filtraram-se as amostras em meio esterilizado (0,2 µm). Fez-se a diálise de IgG1 de MOR04357 com 1 x STF de Dulbecco

(pH 6,5, Invitrogen). Analisou-se a pureza de IgG, sob desnaturação, em condições de redução em EGPA-SDS ou utilizando um bioanalisador da Agilent e, num estado natural, por meio de CLAR-SE.

D. Determinação das afinidades picomolares utilizando a titulação de uma solução de equilíbrio (TSE)

Para a determinação de K_D , utilizaram-se fracções monoméricas (um teor de monómero de pelo menos 90 %, analisaram-se por SEC analítica; Superdex75, Amersham Pharmacia) de IgG1. Realizou-se a determinação da afinidade à base da electroquimioluminescência (ECL), em solução e avaliaram-se os dados praticamente tal como descrito por Haenel et al., 2005 e tal como foi descrito no exemplo 4B. Determinaram-se os valores de K_D para IgG1 de MOR04357 em função de FEC-GM recombinante humano, como sendo de 1,1 pM.

E. Determinação das afinidades com FEC-GM de rato utilizando a titulação de uma solução de equilíbrio (TSE)

A determinação da afinidade com FEC-GM de rato foi feita praticamente tal como descrito no exemplo 4D, utilizando como analito FEC-GM de rato (Peprotech), em solução, em vez de FEC-GM humano. Calcularam-se as afinidades de acordo com Haenel et al. (2005). Determinou-se o valor de K_D para IgG1 de MOR04357 em função de FEC-GM recombinante de rato, como sendo de 130 pM.

Exemplo 7: caracterização de IgG1 de MOR04357 derivada de FEC-GM anti-humano otimizados

A. Inibição da proliferação de TF-1 dependente de FEC-GM, por meio de IgG anti-FEC-GMb utilizando FEC-GM humano e de macaco *rhesus*

Realizou-se o ensaio de proliferação de TF-1, tal como descrito no exemplo 3B. Analisou-se MOR04357 no formato de IgG1 e, como referência de controlo monoclonal, analisaram-se as IgG. Determinaram-se os valores de CI_{50} a partir das curvas de resposta à dose obtidas utilizando o programa informático GraphPad Prism v3.03, aplicando um ajustamento da curva por regressão não linear. O quadro 8 resume os valores de CI_{50} obtidos nestes ensaios. Utilizaram-se nestes ensaios três variantes diferentes de FEC-GM: em primeiro lugar, FEC-GM humano recombinante, numa concentração de 0,25 ng/mL, produzido em *E. coli*, em segundo lugar, o sobrenadante da cultura de HEK293 que tinha sido transfectado temporariamente com ADNpc-FEC-GM humano (ver exemplo 3A), contendo FEC-GM humano recombinante e, em terceiro lugar, o sobrenadante da cultura de células HEK293, que tinha sido transfectado temporariamente com ADNpc-FEC-GM de macaco (ver exemplo 3A), contendo FEC-GM recombinante de *macaca mulatta* (*rhesus*). Para os ensaios de proliferação de TF-1, utilizaram-se os sobrenadantes da cultura de HEK293 como a respectiva fonte dos FEC-GM, em diluições tais que células TF-1 mostram uma proliferação semelhante, em comparação com a proliferação ocorrida a uma concentração definida de 0,25 ng/mL de FEC-GM recombinante humano purificado, produzido em *E. coli*.

Quadro 8: Valores de CI_{50} da IgG de MOR04357 e das IgG de controle, em ensaios de proliferação de TF-1

	CI_{50} (pM)		
	FEC-GM humano (<i>E. coli</i>)	FEC-GM humano (HEK293)	FEC-GM macaca (HEK293)
IgG1 de MOR04357	48	11	15
21C11	1668	144	128
Mab215	625	54	190

Esta experiência demonstrou que se conseguiram grandes aumentos dos valores de CI_{50} após a maturação por afinidade e a clonagem de X, que se mantiveram após a conversão de Fab para o formato de IgG1. MOR04357 de IgG1 exibe um aumento dos valores de CI_{50} superior em 2 000 vezes, em comparação com MOR03929 de Fab e excede a potência de BVD2-21C11 e de Mab215.

Referências:

Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Brown CB, Kaushansky K, and Firestein GS. (1991). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha. J Immunol 146, 3365-3371.

Babior, B. (2000). Phagocytes and oxidative stress. Am J Med 109, 33-44.

Bonfield, T.L., Kavuru, M.S. e Thomassen, M.J. (2002). Anti-FEC-GM titer predicts response to FEC-GM therapy in pulmonary alveolar proteinosis. Clin Immunol 105, 342-350.

Bozinovski, S., Jones, J., Beavitt, S.J., Cook, A.D., Hamilton, J.A. e Anderson, G.P. (2003). Innate immune responses to lipopolysaccharide in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of FEC-GM via repression of TLR-4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.

Broide, D.H. e Firestein, G.S. (1991). Endobronchial allergen challenge in asthma. Demonstration of cellular source of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by in situ hybridization. *J Clin Invest* 88, 1048-1053.

Broide, D.H., Paine, M.M. e Firestein, G.S. (1992). Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest* 90, 1414-1424.

Brown, C.B., Pihl, C.E. e Kaushansky, K. (1994). Mapping of human granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor domains interacting with the human granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor-receptor alpha-subunit. *Eur J Biochem* 225, 873-880.

Burmester, G.R., Stuhlmuller, B., Keyszer, G. e Kinne, R.W. (1997). Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum* 40, 5-18.

Campbell, I.K., Bendele, A., Smith, D.A. e Hamilton, J.A. (1997). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor exacerbates collagen induced arthritis in mice. *Ann Rheum Dis* 56, 364-368.

Campbell, I.K., Rich, M.J., Bischof, R.J., Dunn, A.R., Grail, D. e Hamilton, J.A. (1998). Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J Immunol* 161, 3639-3644.

Carrieri, P.B., Provitera, V., De Rosa, T., Tartaglia, G., Gorga, F. e Perella, O. (1998). Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 20, 373-382.

Cebon, J., Nicola, N.A., Ward, M., Gardner, I., Dempsey, P.J., Layton, J.E., Dührsen, U., Burgess, A., Nice, E.C. e Morstyn, G. (1990). Granulocyte-macrophage stimulating factor from human lymphocytes. *J Biol Chem* 265, 4483-4491.

Chantry, D., Tumer, M., Brennan, F., Kingsbury, A. e Feldmann, M. (1990). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces both HLA-DR expression and cytokine production by human monocytes. *Cytokine* 2, 60-67.

Chen Y., Wiesmann C., Fuh G., Li B., Christinger H.W., McKay P, de Vos A.M., Lowman H.B. (1999). Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J Mol Biol.* 293, 865-81.

Cheng, S.S., Lai, J.J., Lukacs, N.W. e Kunkel, S.L. (2001). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

up-regulates CCR1 in human neutrophils. J Immunol 166, 1178-1184.

Clark, S.C. and Kamen, R. (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factors. Science 236, 1229-1237.

Cook, A.D., Braine, E.L., Campbell, I.K., Rich, M.J. e Hamilton, J.A. (2001). Blockade of collagen-induced arthritis post-onset by antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (FEC-GM): requirement durante FEC-GM in the effector phase of disease. Arthritis Res 3, 293-298.

de Groot, R.P., Coffey, P.J. e Koenderman, L. (1998). Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/FEC-GM receptor family. Cell Signal. 10, 619-628.

de Vries, E.G., Willemse, P.H., Biesma, B., Stem, A.C., Limburg, P.C. e Vellenga, E. (1991). Flare-up of rheumatoid arthritis during FEC-GM treatment after chemotherapy. Lancet 338, 517-518.

Diederichs, K., Boone, T. e Karplus, P.A. (1991). Novel fold and putative receptor binding site of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Science 254, 1779-1782.

Drake A.W., Myszka D.G., Klakamp S.L. (2004). Characterizing high-affinity antigen/antibody complexes by kinetic- and equilibrium-based methods. Anal Biochem. 328, 35-43.

Dranoff, G., Crawford, A.D., Sadelain, M., Ream, B., Rashid, A., Bronson, R.T., Dickersin, G.R., Bachurski, C.J., Mark, E.L., Whitsett, J.A., (1994). Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 264, 713-716.

Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods*. 77,305-19.

Gasson, J.C., Baldwin, G.C., Sakamoto, K.M. e DiPersio, J.F. (1990a). The biology of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (FEC-GM). *Prog Clin Biol Res* 352, 375-384.

Gasson, J.C., Fraser, J.K. e Nimer, S.D. (1990b). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (FEC-GM): regulation of expression. *Prog Clin Biol Res* 338, 27-41.

Gasson, J.C., Kaufman, S.E., Weisbart, R.H., Tomonaga, M. e Golde, D.W. (1986). High-affinity binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to normal and leukemic human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83, 669-673.

Gearing, D.P., King, J.A., Gough, N.M. e Nicola, N.A. (1989). Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO J*. 12, 3667-3676.

Gomez-Cambronero, J., Horn, J., Paul, C.C. e Baumann, M.A. (2003). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine durante human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *J Immunol* 171, 6846-6855.

Haenel, C., Satzger, M., Della Ducata, D., Ostendorp, R. e Brocks, B. (2005). Characterization of high-affinity antibodies by electrochemiluminescence-based equilibrium titration. *Analytical Biochemistry*, 339, 1, 182-184.

Hamilton, J.A. (1993). Rheumatoid arthritis: opposing actions of hemopoietic growth factors and slow acting anti-rheumatic drugs. *Lancet* 342, 536-539.

Hamilton, J.A. (2002). FEC-GM in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol* 23, 403-408.

Hart, P.H., Whitty, G.A., Piccoli, D.S. e Hamilton, J.A. (1988). Synergistic activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma. Increased TNF-alpha but not IL-1 activity. *J Immunol* 141, 1516-1521.

Haworth, C., Brennan, F.M., Chantry, D., Turner, M., Maini, R.N. e Feldmann, M. (1991). Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 21, 2575-2579.

Hayashida, K., Kitamura, T., Gorman, D.M., Arai, K., Yokota, K. e Miyajima, A. (1990). Molecular cloning of a second subunit of the receptor durante human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (FEC-GM):

reconstitution of a high-affinity FEC-GM receptor. Proc Natl Acad Sci USA 87, 9655-9659.

Hazenberg BP, Van Leeuwen MA, Van Rijswijk MH, Stem AC e Vellenga E (1989). Correction of granulocytopenia in Felty's syndrome by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Simultaneous induction of interleukin-6 release and flare-up of the arthritis. Blood 74, 2769-2780.

Kastelein, R.A. e Shanafelt, A.B. (1993). FEC-GM receptor: interactions and activation. Oncogene 8, 231-236.

Kaufman, S.E., DiPersio, J.F. e Gasson, J.C. (1989). Effects of human FEC-GM on neutrophil degranulation in vitro. Exp Hematol 17, 800-804.

Kitamura, T., Sato, N., Arai, K. e Miyajima, A. (1991). Expression cloning of the human IL-3 receptor cADN reveals a shared beta subunit durante the human IL-3 and FEC-GM receptors. Cell 66, 1165-1174.

Kitamura, T., Tanaka, N., Watanabe, J., Uchida, Kanegasaki, S., Yamada, Y. e Nakata, K. (1999). Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med 190, 875-880.

Kitamura T., Tange T., Terasawa T., Chiba S., Kuwaki T., Miyagawa K., Piao Y.F., Miyazono K., Urabe A., Takaku F. (1989). Establishment and characterization of a unique

human cell line that proliferates dependently on FEC-GM, IL-3, or erythropoietin J Cell Physiol. 140, 323-34.

Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A. e Vimekas, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and RDCs randomized with trinucleo-tides. J Mol Biol 296, 57-86.

Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar, M., Thomassen, E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Hoss, A., Inge, L., Knappik, A., Marget, M., Pack, P., Meng, X.Q., Schier, R., Sohlemann, P., Winter, J., Wolle, J. e Kretzschmar, T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. J Immunol Methods 254, 67-84.

Lopez, A.F., Williamson, D.J., Gamble, J.R., Begley, C.G., Harlan, J.N., Klebanoff, S.J., Waltersdorph, A., Wong, G., Clark, S.C. e Vadas, M.A. (1986). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. J Clin Invest 78, 1220-1228.

McQualter, J.L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T.W., Hamilton, J.A., Reid, H.H. e Bernard, C.C. (2001). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. J Exp Med 194, 873-882.

Meager, A., Wadhwa, M., Bird, C., Dilger, P., Thorpe, R., Newsom-Davis, J. e Willcox, N. (1999). Spontaneously

occurring neutralizing antibodies against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with autoimmune disease. *Immunology* 97, 526-532.

Metcalf, D., Begley, C.G., Johnson, G.R., Nicola, N.A., Vadas, M.A., Lopez, A.F., Williamson, D.J., Wong, G.G., Clark, S.C. e Wang, E.A. (1986). Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 67, 37-45.

Mulherin, D., Fitzgerald, O. e Bresnihan, B. (1996). Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39, 115-124.

Nagy Z.A., Hubner B., Lohning C., Rauchenberger R., Reiffert S., Thomassen-Wolf E., Zahn S., Leyer S., Schier E.M., Zahradnik A., Brunner C., Lobenwein K., Rattel B., Stanglmaier M., Hallek M., Wing M., Anderson S., Dunn M., Kretzschmar T., Tesar M. (2002) Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med.* 8, 801-7.

Olver, I.N., Hercus, T., Lopez, A., Vadas, M., Somogyi, A.A., Doyle, I., Foster, D.J., Keefe, D., Taylor, A., Brown, M., To, L.B., Cole, J., Rawling, T., Cambareri, B., Myers, M., Olszewski, N., Bastiras, S., Senn, C., Hey, A., Verma, M. e Wigley, P. (2002). A phase I study of the FEC-GM antagonist E21R. *Cancer Chemother Pharmacol* 50, 171-178.

Plenz, G., Eschert, H., Beissert, S., Arps, V., Sindermann, J.R., Robenek, H. e Völker, W. (2003).

Alterations in the vascular extracellular matrix of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (FEC-GM)-deficient mice. FASEB J. 17, 1451-1457.

Rapoport, A.P., Abboud, C.N. e DiPersio, J.F. (1992). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (FEC-GM) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation. Blood Rev 6, 43-57.

Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen-Wolf, E., Rom, E., Adar, R., Yaniv, Y., Malka, M., Chumakov, I., Kotzer, S., Resnitzky, D., Knappik, A., Reiffert, S., Prassler, J., Jury, K., Waldherr, D., Bauer, S., Kretzschmar, T., Yayon, A. e Rothe, C. (2003). Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. J Biol Chem.

Santiago-Schwarz F, Anand P,L.S. e Carsons S.E. (2001). Dendritic cells (CDs) in rheumatoid arthritis (AR): progenitor cells and soluble factors contained in AR synovial fluid yield a subset of myeloid CDs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses. J Immunol 167, 1758-1768.

Sato, N., Sakamaki, K., Terada, N., Arai, K. e Miyajima, A. (1993). Signal transduction by the high-affinity FEC-GM receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible durante different signaling. EMBO J 12, 4181-4189.

Schier R., McCall A., Adams G.P., Marshall K.W., Merritt H., Yim M., Crawford R.S., Weiner L.M., Marks C., Marks

J.D. (1996). Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol Biol.* 8, 263:551-67.

Shanafelt, A.B., Johnson, K.E. e Kastelein, R.A. (1991a). Identification of critical amino acid residues in human and mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and their involvement in species specificity. *J Biol Chem* 266, 13804-13810.

Shanafelt, A.B., Miyajima, A., Kitamura, T. e Kastelein, R.A. (1991b). The amino-terminal helix of FEC-GM and IL-5 governs high affinity binding to their receptors. *EMBO J* 10, 4105-4112.

Shibata, Y., Berclaz, P.-Y., Chroneos, Z., Yoshida, H. e Trapnell, B.C. (2001). FEC-GM regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU. *Immunity* 15, 557-567.

Sisson, S.D. e Dinarello, C.A. (1988). Production of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor by human mononuclear cells stimulated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 72, 1368-1374.

Stanley, E., Lieschke, G.J., Grail, D., Metcalf, D., Hodgson, G., Gall, J.A., Maher, D.W., Cebon, J., Sinickas, V. e Dunn, A.R. (1994). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5592-5596.

Trapnell, B.C. e Whitsett, J.A. (2002). FEC-GM regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol* 64, 775-802.

Uchida, K., Nakata, K., Trapnell, B.C., Terakawa, T., Hamano, E., Mikami, A., Matsushita, I., Seymour, J.F., Oh-Eda, M., Ishige, I., Eishi, Y., Kitamura, T., Yamada, Y., Hanaoka, K. e Keicho, N. (2004). High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood* 103, 1089-1098.

Virnekäs, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K.C., Wellnhofer, G. & Moroney, S.E., (1994). *Nucleic Acids Research* 22, 5600-5607.

Xu, W.D., Firestein, G.S., Taetle, R., Kaushansky, K. e Zvaifler, N.J. (1989). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. II. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid synovial effusions. *J Clin Invest* 83, 876-882.

Yamashita, N., Tashimo, H., Ishida, H., Kaneko, F., Nakano, J., Kato, H., Horiuchi, T. e Ohta, K. (2002). Attenuation of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model by neutralization of FEC-GM. *Cell Immunol* 219, 92-97.

Yang W.P., Green K., Pinz-Sweeney S., Briones A.T., Burton D.R., Barbas C.F. 3^a. (1995). RDC walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human

anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. J Mol Biol. 254, 392-403

Zhang, Y., McCluskey, K., Fujii, K. e Wahl, L.M. (1998). Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF-alpha, granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 beta through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. J Immunol 161, 3071-3076.

Lisboa, 8 de Janeiro de 2015.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo humano ou humanizado isolado ou um seu fragmento funcional, caracterizado pelo facto de compreender uma região de ligação ao antigénio, que é específica para FEC-GM humano e compreender a sequência da RDC1-P de GFTFSSYWMN, uma sequência de RDC2-P de GIENKRAGGATFYAASVKG, GIESKWAGGATYYAAGVKG ou GIENKYAGGATYYAASVKG, uma sequência de RDC3-P de GFGTDF, uma sequência de RDC1-L de SGDSIGKKYAY, uma sequência de RDC2-L de KKRPS e uma sequência de RDC3-L de SAWGDKGM.
2. Anticorpo humano ou humanizado ou um seu fragmento funcional, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender uma região de ligação ao antigénio que é específica para o FEC-GM humano, em que o referido anticorpo humano ou humanizado ou um seu fragmento funcional é capaz de (i) bloquear a interacção de 0,5 µg/mL de FEC-GM humano com a cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano expresso em cerca de 2×10^5 células de OHC-K1, em pelo menos 50 %, nas seguintes condições: (a) a concentração da referida cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano, expressa nas referidas células OHC-K1, é semelhante à concentração da cadeia alfa do receptor de FEC-GM humano, expressa em cerca de 2×10^5 células de OHC-GMRa#11 e (b) a concentração do referido anticorpo humano ou humanizado isolado ou de um seu fragmento funcional é de cerca de 5 µg/mL; e (ii) para neutralizar 0,25 ng/mL de FEC-GM humano num ensaio de proliferação de TF-1 com um valor de CI_{50} pelo menos cinco vezes inferior ao do anticorpo de referência BVD2-21C11 (BD Biosciences Pharmingen; Cat#554503) e/ou ao do anticorpo MAB215 (R&D Systems; Cat#MAB215).

3. Anticorpo humano ou humanizado ou um seu fragmento funcional, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo facto de compreender uma cadeia pesada variável seleccionada no grupo que consiste em

(a)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWV
SGIENKRAGGATFYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC

ARGFGTDFWGQGTLVTVSS,

(b)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWV
SGIESKWAGGATYYAAGVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CARGFGTDFWGQGTLVTVSS, e

(c)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWV
SGIENKYAGGATYYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CARGFGTDFWGQGTLVTVSS.

4. Anticorpo humano ou humanizado ou um seu fragmento funcional, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de compreender uma cadeia leve variável seleccionada no grupo que consiste em

(a)

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPV LVIYKKR
PSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKL
TVLGQ,

(b)

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKR
PSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKL
TVLGQ, e

(c)

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKR
PSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKL
TVLGQ.

5. Anticorpo humano ou humanizado ou um seu fragmento funcional, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo facto de conter uma sequência de RDC3-P de GFGTDF, uma sequência de RDC2-P de GIENKYAGGATYYAASVKG, uma sequência de RDC1-P de GFTFSSYWMN e uma sequência de RDC3-L de SAWGDKGM, uma sequência de RDC2-L de KKRPS e uma sequência de RDC1-L de SGDSIGKKYAY.
6. Anticorpo humano ou humanizado ou um seu fragmento funcional, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de compreender

(a) a cadeia pesada variável da sequência de
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEW
VSGIENKYAGGATYYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARGFGTDFWGQGT LVT VSS e

(b) a cadeia leve variável da sequência de
DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYK
KRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGG
TKLTVLGQ.

7. Anticorpo humano ou humanizado ou um seu fragmento funcional, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo facto de o referido anticorpo humano ou humanizado ou um seu fragmento funcional estar reticulado com FEC-GM de rato e/ou FEC-GM de macaco rhesus.
8. Anticorpo humano ou humanizado ou um seu fragmento funcional, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo facto de o referido anticorpo ou um seu fragmento funcional ser capaz de neutralizar FEC-GM humano num ensaio de proliferação de TF-1, com um valor de CI_{50} pelo menos dez vezes inferior ao do anticorpo de referência MAB215 (R&D Systems; Cat#MAB215) e/ou ao do BVD2-21C11 (BD Biosciences Pharmingen; Cat#554503).
9. Fragmento funcional de um anticorpo, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo facto de ser um fragmento de anticorpo Fab ou scFV.
10. Anticorpo humano ou humanizado, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo facto de ser um anticorpo humano.
11. Anticorpo humano ou humanizado, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo facto de ser uma IgG.
12. Sequência de ácidos nucleicos, caracterizada pelo facto de codificar uma região de ligação ao antigénio de um anticorpo humano ou humanizado ou de um seu fragmento funcional, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 11.

13. Sequência de ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo facto de compreender

(i) uma sequência de nucleótidos seleccionada no grupo que consiste em

(a)

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGC
GGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTT
CTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCAAGCCCCCTGGGAAGGGTCTCG
AGTGGGTGAGCGGTATTGAGAATAAGCGTGCTGGTGGTGCTACTT
TTTATGCTGCTTCCGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAAT
TCGAAAAACACCCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAA
GATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGTTTTGGTACTGATTTTT
GGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA,

(b)

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGC
GGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTT
CTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCAAGCCCCCTGGGAAGGGTCTCG
AGTGGGTGAGCGGTATTGAGTCTAAGTGGGCTGGTGGTGCTACTT
ATTATGCTGCTGGTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAA
TTCGAAAAACACCCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGA
AGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGTTTTGGTACTGATTTTT
TGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA,

(c)

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGC
GGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTT
CTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCAAGCCCCCTGGGAAGGGTCTCG
AGTGGGTGAGCGGTATTGAGAATAAGTATGCTGGTGGTGCTACTT
ATTATGCTGCTTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATAA
TTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGA
AGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTTTTGGTACTGATTTT
TGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA, e

(d)

CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAAGCCTGGC
GGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCGGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC
AGCTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTG
GAGTGGGTGTCCGGCATCGAGAACAAGTATGCCGGCGGAGCCACC
TACTACGCCGCCAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGAC
AACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCC
GAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGGGGGCTTCGGCACCGAT
TTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCAGCTCA;

ou

(ii) uma sequência de ácidos nucleicos que hibrida, em condições altamente rigorosas, com a hélice complementar da sequência de (i) (a), (i) (b), (i) (c) ou (i) (d).

14. Sequência de ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo facto de compreender

(i) uma sequência de nucleótidos seleccionada no grupo que consiste em

(a)

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGT
CAGACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAG
TATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTT
GTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGC
GGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACT
CAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTGCTTGGGGTGAT
AAGGGTATGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGC
CAG,

(b)

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGT
CAGACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAG
TATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTT
GTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGC
GGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACT
CAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTGCTTGGGGTGAT
AAGGGTATGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGC
CAG,

(c)

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGT
CAGACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAG
TATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTT
GTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGC
GGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACT
CAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTGCTTGGGGTGAT
AAGGGTATGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGC
CAG, e

(d)

GACATCGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGTCTGTGGCCCCCTGGC
CAGACCGCCCGGATCAGCTGCTCCGGCGACAGCATCGGCAAGAAG
TACGCCTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCGTGCTG
GTGATCTACAAGAAGCGGGCCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTTCAGC
GGCAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACC
CAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCTCCGCCTGGGGCGAC
AAGGGCATGGTGTGTTGGCGGGCGGAACAAAGTTAACCGTGCTGGGG
CAG;

ou

(ii) uma sequência de ácidos nucleicos que hibrida, em condições altamente rigorosas, com a hélice complementar da sequência de (i) (a), (i) (b), (i) (c) ou (i) (d).

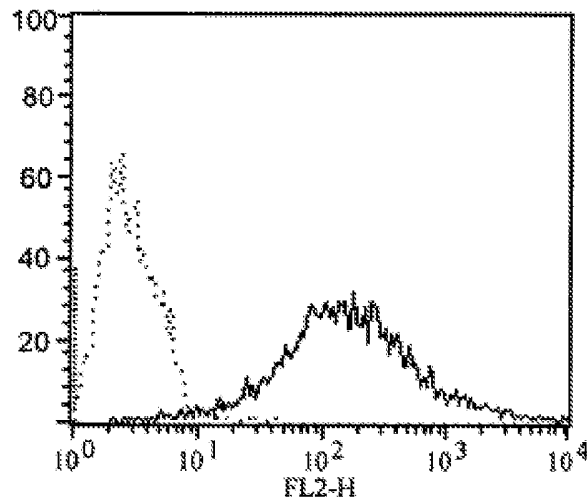
15. Vector, caracterizado pelo facto de compreender uma sequência de ácidos nucleicos, de acordo com uma qualquer das reivindicações 12 a 14.
16. Célula, caracterizada pelo facto de compreender um vector, de acordo com a reivindicação 15.
17. Célula, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo facto de a referida célula ser bacteriana ou eucariótica.
18. Composição farmacêutica, caracterizada pelo facto de compreender um anticorpo humano ou humanizado ou um seu fragmento funcional, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 11 e um veículo ou excipiente, aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

19. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo facto de se utilizar no tratamento de doenças inflamatórias.
20. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 19, para se utilizar de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo facto da referida doença inflamatória se escolher numa lista de artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença de Crohn, psoríase, asma e dermatite atópica.
21. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 19, para se utilizar de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo facto de a referida doença inflamatória ser artrite reumatóide.
22. Anticorpo humano ou humanizado ou um seu fragmento funcional, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo facto de se utilizar no tratamento de doenças inflamatórias isoladamente ou em combinação com outros agentes.

Lisboa, 8 de Janeiro de 2015.

RESUMO

ANTICORPOS ANTI-FEC-GM E AS RESPECTIVAS UTILIZAÇÕES



A presente invenção tem por objecto regiões recombinantes de ligação ao antigénio, anticorpos e os respectivos fragmentos funcionais, que são específicos para FEC-GM, que desempenham um papel essencial em vários distúrbios ou estados clínicos. Estes anticorpos, de acordo com isto, podem ser utilizados para tratar, por exemplo, doenças inflamatórias, tais como artrite reumatóide. Os anticorpos da presente invenção também podem ser utilizados no domínio dos diagnósticos, assim como, para a investigação do papel do FEC-GM na progressão de vários distúrbios. A presente invenção também tem por objecto as sequências de ácidos nucleicos que codificam os anticorpos anteriores, os vectores que os contêm, composições farmacêuticas e estojos com instruções para a respectiva utilização.

Figura 1a

ADN de cadeia pesada variável

3684_VP3 (SEQ ID Nº 1):

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCT
GAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTCATTGGATGTCTTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCAATGGTATCTTTTCTGATGGTAGCGCTACCTAT
TATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTG
TATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTTTT
CAGGGTTATGGTGGTGGTTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4251_VP3 (SEQ ID Nº 2):

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCT
GAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTCATTGGATGTCTTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCAATATTGGCGTGGTCCTTATATTTATTATGCTG
ATTCTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCA
AATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTTTTCAGGGTTA
TGGTGGTGGTTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

3929_VP3 (SEQ ID Nº 3):

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCT
GAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTTATTCTGGTAGCGAGACCTATTAT
GCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTTTT
GGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4252_VP3 (SEQ ID Nº 4):

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCT
GAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGAATAAGTATGCTGGTGGTGCTACT
TATTATGCTGCTTCTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCC
TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTG
GTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4287_VP3 (SEQ ID N° 5) :

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCT
GAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGAATAAGCGTGCTGGTGGTGCTACT
TTTTATGCTGCTTCCGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCC
TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTG
GTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4290_VP3 (SEQ ID N° 6) :

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCT
GAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGTCTAAGTGGGCTGTTGGTGCTACT
TATTATGCTGCTGGTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCC
TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTG
GTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4302_VP3 (SEQ ID N° 7) :

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCT
GAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTTATTCTGGTAGCGAGACCTATTAT
GCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTTTT
GGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4350_VP3 (SEQ ID N° 8) :

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCT
GAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGAATAAGCGTGCTGGTGGTGCTACT
TTTTATGCTGCTTCCGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCC
TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTG
GTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4354_VP3 (SEQ ID N° 9):

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCT
GAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGTCTAAGTGGGCTGGTGGTGCTACT
TATTATGCTGCTGGTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCC
TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTG
GTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4357_VP3 (SEQ ID N° 10):

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCT
GAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCAAGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGAATAAGTATGCTGGTGGTGCTACT
TATTATGCTGCTTCTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCC
TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTG
GTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

3682_VP1A (SEQ ID N° 44):

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTG
AAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACCTTTTAATTCTTTCTTATTTCTTGGGT
GCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATTCCGATTTTT
GGCACTGCGAATTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCGGATG
AAAGCACCAGCACC GCGTATATGGAAGT GAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGG
CCGTGTATTATTGCGCGCGTAAGTTTATTTCTGATTCTTGGGGCCAAGGCACCCTG
GTGACGGTTAGCTCA

4283_VP1A (SEQ ID N° 45):

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTG
AAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACCTTTTAATTCTTTTCTTATTTCTTGGGT
GCCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGCTATTTCTCCTTGGGAT
GGTGTTACTGGTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATTACCGCGGATG
AAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGG
CCGTGTATTATTGCGCGCGTAAGTTTATTTCTGATTCTTGGGGCCAAGGCACCCTG
GTGACGGTTAGCTCA

4297_VP1A (SEQ ID N° 46):

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTG
AAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACCTTTTAATTCTTTTCTTATTTCTTGGGT
GCCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATTCGATTTTT
GGCACTGCGAATTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCGGATG
AAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGG
CCGTGTATTATTGCGCGCGTAAGTTTATTTCTGATTCTTGGGGCCAAGGCACCCTG
GTGACGGTTAGCTCA

4342_VP1A (SEQ ID N° 47):

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTG
AAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACCTTTTAATTCTTTTCTTATTTCTTGGGT
GCCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGCTATTTCTCCTTGGGAT
GGTGTTACTGGTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATTACCGCGGATG
AAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGG
CCGTGTATTATTGCGCGCGTAAGTTTATTTCTGATTCTTGGGGCCAAGGCACCCTG
GTGACGGTTAGCTCA

4357_codão de VP otimizado (SEQ ID Nº 48):

CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTG
AGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGATGAACTGGG
TGAGGCAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCGAGAACAAAGT
ATGCCGGCGGAGCCACCTACTACGCCGCCAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG
CCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGA
GGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGGGGCTTCGGCACCGATTTCTGGGGCCAG
GGCACCTGGTGACAGTCAGCTCA

Figura 1b

Péptido de cadeia pesada variável

(Regiões de RDC a **negrito**)

3684_VP3 (SEQ ID N°. 11):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMSWVRQAPGKGLEWVSNIGIFSDGSATY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFQGYGGGFBDYWGQGTLVTVSS

4251_VP3 (SEQ ID N°. 12):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMSWVRQAPGKGLEWVSNIWGRGPYIYYA
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFQGYGGGFBDYWGQGTLVTVSS

3929_VP3 (SEQ ID N°. 13):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSETYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGTLVTVSS

4252_VP3 (SEQ ID N°. 14):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIENKYAGGA
TYYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGTLVTVSS

4287_VP3 (SEQ ID N°. 15):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIENKRAGGA
TFYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGTLVTVSS

4290_VP3 (SEQ ID N°. 16) :

**QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIESKWAGGA
TYAAAGVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGT LVT VSS**

4302_VP3 (SEQ ID N°. 17) :

**QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSETYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGT LVT VSS**

4350_VP3 (SEQ ID N°. 18) :

**QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIENKRAGGA
TFYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGT LVT VSS**

4354_VP3 (SEQ ID N°. 19) :

**QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIESKWAGGA
TYAAAGVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGT LVT VSS**

4357_VP3 (SEQ ID N°. 20) :

**QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIENKYAGGA
TYAAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGT LVT VSS**

3682_VP1A (SEQ ID N°. 49) :

**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNSFLISWVRQAPGQGLEWMGGHPIFG
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARKFISDSWGQGTLVTV
SS**

4283_VP1A (SEQ ID N°. 50):

**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNSFLISWVRQAPGQGLEWMGAISPWD
GVTGYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARKFISDSWGQGTLV
TVSS**

4297_VP1A (SEQ ID N°. 51):

**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNSFLISWVRQAPGQGLEWMGGHPIFG
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARKFISDSWGQGTLVTV
SS**

4342_VP1A (SEQ ID N°. 52):

**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNSFLISWVRQAPGQGLEWMGAISPWD
GVTGYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARKFISDSWGQGTLV
TVSS**

Figura 2a

ADN de cadeia leve variável

3684_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 21):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTATC
TCGTGTAGCGGCGATAATCTTCCTGGTAAGTATGTTTCATTGGTACCAGCAGAAACCCGGG
CAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATTATGATTCTAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCT
TTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAA
GACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTCGTACTCAGACTACTATTGTGTTTGGCGGCGGC
ACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

4251_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 22):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTATC
TCGTGTAGCGGCGATAATCTTCCTGGTAAGTATGTTTCATTGGTACCAGCAGAAACCCGGG
CAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATTATGATTCTAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCT
TTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAA
GACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTCGTACTCAGACTACTATTGTGTTTGGCGGCGGC
ACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

3929_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 23):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTATC
TCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGG
CAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGC
GGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGA
AGCGGATTATTATTGCTCTTCTTGGGATTCTACTGGTCTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG
TTAACCGTTCTTGGCCAG

4252_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 24) :

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTATC
TCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGG
CAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGC
GGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGA
AGCGGATTATTATIGCTCTTCTTGGGATTCTACTGGTCTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG
TTAACCGTTCTTGGCCAG

4287_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 25) :

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTATC
TCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGG
CAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGC
GGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGA
AGCGGATTATTATIGCTCTTCTTGGGATTCTACTGGTCTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG
TTAACCGTTCTTGGCCAG

4290_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 26) :

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTATC
TCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGG
CAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGC
GGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGA
AGCGGATTATTATIGCTCTTCTTGGGATTCTACTGGTCTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG
TTAACCGTTCTTGGCCAG

4302_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 27) :

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTATC
TCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGG
CAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGC
GGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGA
AGCGGATTATTATTGCTCTGCTTGGGGTGATAAGGGTATGGTGTTTGGCGGCGGCACGAA
GTAAACCGTTCTTGGCCAG

4350_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 28) :

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTATC
TCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGG
CAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGC
GGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGA
AGCGGATTATTATTGCTCTGCTTGGGGTGATAAGGGTATGGTGTTTGGCGGCGGCACGAA
GTAAACCGTTCTTGGCCAG

4354_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 29) :

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTATC
TCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGG
CAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGC
GGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGA
AGCGGATTATTATTGCTCTGCTTGGGGTGATAAGGGTATGGTGTTTGGCGGCGGCACGAA
GTAAACCGTTCTTGGCCAG

4357_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 30) :

GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCCGCGCGTATC
TCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAAACCCGGG
CAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGC
GGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGA
AGCGGATTATTATTGCTCTGCTTGGGGTGATAAGGGTATGGTGTGTTGGCGGCGGCACGAA
GTTAACCGTTCTTGGCCAG

3682_VL kapa 1 (SEQ ID №. 53):

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCGTG
TGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGACTATTAATAATTATCTGAATTGGTACCA
GCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTTATACTGCTTCTAATTTGCAA
AGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGAC
CATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTG
GTTCTCCTATGACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTACG

4283_VL kapa 1 (SEQ ID №. 54):

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCGTG
TGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGACTATTAATAATTATCTGAATTGGTACCA
GCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTTATACTGCTTCTAATTTGCAA
AGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGAC
CATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTG
GTTCTCCTATGACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTACG

4297_VL kapa 1 (SEQ ID №. 55):

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCGTG
TGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGACTATTAATAATTATCTGAATTGGTACCA
GCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTTATACTGCTTCTAATTTGCAA
AGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGAC
CATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTATTCTT
GGGTTTCCTCATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTACG

4342_VL kapa 1 (SEQ ID N°. 56):

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGCGGTGATCGTG
TGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGACTATTAATAATTATCTGAATTGGTACCA
GCAGAAACCAGGTAAAGCACCCGAAACTATTAATTTATACTGCTTCTAATTTGCAA
AGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGAC
CATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTATTCTT
GGGTTCCCTCATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTACG

4357_codão de VL otimizado (SEQ ID N°. 57):

GACATCGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGTCTGTGGCCCCTGGCCAGACCGCCC
GGATCAGCTGCTCCGGCGACAGCATCGGCAAGAAGTACGCCTACTGGTATCAGCA
GAAGCCCCGGCCAGGCCCCCGTGCTGGTGATCTACAAGAAGCGGCCCAGCGGCAT
CCCCGAGCGGTTTCAGCGGCAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAG
CGGCACCCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCTCCGCCTGGGGCGACAA
GGGCATGGTGTTTGGCGGCGGAACAAAGTTAACCGTGCTGGGGCAG

Figura 2b

Péptido de cadeia leve variável
(Regiões de RDC a **negrito**)

3684_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 31):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSG**DNLP**GKYVHWYQQKPGQAPV**LV**IYYDSNRPSGIPERFSG
SNSGNTATLTISGTQAEDEADYYC**QSRTQT**TVFGGGTKLTVLGQ

4251_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 32):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSG**DNLP**GKYVHWYQQKPGQAPV**LV**IYYDSNRPSGIPERFSG
SNSGNTATLTISGTQAEDEADYYC**QSRTQT**TVFGGGTKLTVLGQ

3929_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 33):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPV**LV**IYKKRPSGIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQAEDEADYYC**SSWD**STGLVFGGGTKLTVLGQ

4252_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 34):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPV**LV**IYKKRPSGIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQAEDEADYYC**SSWD**STGLVFGGGTKLTVLGQ

4287_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 35):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPV**LV**IYKKRPSGIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQAEDEADYYC**SSWD**STGLVFGGGTKLTVLGQ

4290_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 36):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQAEDEADYYCSSWDSTGLVFGGGTKLTVLGQ

4302_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 37):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ

4350_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 38):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ

4354_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 39):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ

4357_VL lambda 3 (SEQ ID N°. 40):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ

3682_VL kapa 1 (SEQ ID N°. 58):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASNLSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYSGSPMTFGGQGTKVEIKRT

4283_VL kapa 1 (SEQ ID N°. 59):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQTINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASNLSQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSGSPMTFGQGTKVEIKRT

4297_VL kapa 1 (SEQ ID N°. 60):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQTINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASNLSQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSWVPHTFGQGTKVEIKRT

4342_VL kapa 1 (SEQ ID N°. 61):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQTINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASNLSQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSWVPHTFGQGTKVEIKRT

Figura 3

Sequência de consenso de cadeia pesada variável

(Regiões de RDC a **negrito**)

Consenso de VP3 (SEQ ID N°. 41):

QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA
ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARWG
GDGFYAMDYW GQGTLLTVS S

Figura 4

Sequência de consenso de cadeia leve variável
(Regiões de RDC a **negrito**)

Consenso de VL_λ3 (SEQ ID N°. 42):

DIELTQPPSV SVAPGQTARI SCSGDALGDK YASWYQQKPG QAPVLVIYDD
SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYCQQH YTTPPVFGGG
TKLTVLG

Figura 5

Exemplo da sequência de AdN do vector de expressão de Fab
pMORPH®X9_MOR03929_FH

SEQ ID N°. 43

```
atgaaaaagacagctatcgcgatgacgtggcactggctgggttcgctaccgtagcgcagg-  
ccgatatcgaactgacccagccgccctcagtgagcggtgcaccagggtcagaccgcgcgtat-  
ctcgtgtagcggcgattctatgttaagaagtatgcttattggtaccagcagaaacccggg-  
caggcgccagttcttgtgattataagaagcgtccctcaggcatcccggaacgccttagcg-  
gatccaacagcggcaacaccgcgaccctgaccattagcggcactcaggcgggaagacgaag-  
cggattatattgctctcttgggattctacttggttgggttggcggcgacgaagt-  
taaccgttcttggccagccgaaagccgcaccgagtgagcgtgtttccgcccagcag-  
cgaagaattgcaggcgaacaaagcgaccctgggtgtgcttgattagcgcactttatccgg-  
gagccgtgacagtggtcctggaaggcagatagcagcccgtaaggcgggagtgagaccac-  
cacaccctccaaacaagaacaacaagtacggcgccagcagctatctgagccgacgcct-  
gagcagtggaagtcacacagaagctacagctgacaggtcacgcattgaggggagcaccgtg-  
gaaaaaacctgtgcgccgactgagccctgataagcatgcgtaggagaaaataaatgaaa-  
caaaagcactattgcactggcactcttaccgttgcctcttacccttgtaaccaagcccagg-  
tgcaattggtggaagcggcgggcgccctgggtgcaaccggcgggcagccctgcgtctgagctg-  
cgcgccctccggattaccttttcttcttattggatgaattgggtgcgccaagccccctgg-  
gaagggtctcgagtggtgggtgagcgggtatctcttattctggtagcgagacctattatcgga-  
tagcgtgaaaggccgtttacatttcacgtgataattcgaaaaacacccctgatactg-  
caaaigaacagccctgcgtgcggaagatacggccgtgtattatgctgcgcgtgtgtttgg-  
tactgatitttggggccaaggcaccctgggtgacgggttagctcagcgtcgaccaaaggctc-  
caagcggtgttccgctggtccgagcagcaaaagcaccagcggcgggcacggctgcccctggg-  
ctgccttggttaaagaattatctccgggaaccagtcaccgtgagctggaacagcggggcgct-  
gaccagcggcggtgcatacccttccggcggtgctgcaaaagcagcggccctgtatagcctgag-  
cagcgtgtgtgaccgtgcccagcagcagccttaggcactcagacctatatttgaacgtgaac-  
cataaacggagcaacaccaaagtggataaaaaagtggaaaccgaaaagcgaattcgacta-  
taaagatgacgatgacaaaggcgcgccgcaaccatcatcaccatcactgataagcttgacc-  
tgtgaagtgaanaattggcgcagattgtgcgacattttttgtctgcccgttlaattaaagg-  
ggggggggggccggcctgggggggggtgtacatgaattgtaaacgttaattttgt-  
taaaatcgcgttaaaattttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaatcgg-  
caaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtgtgttccagttg-  
gaacaagagtgccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctat-  
caggggcgatggccactacgagaaccatcacctaatcaagtttttggggtcgaggtgc-  
cgtaaaagcactaaatcggaaccctaaggaggccccgatttagagcttgacggggaaagc-  
cggcgaaacgtggcgagaaagggaagggaagaaagcgaaggagcggcgctaggggcgctgg-  
caagtgtagcgggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcgcttaattgcgcgcta-  
caggggcgctgctagactagtgttaaacgggaccgggggggggcttaagtgggcig-  
caaaacaaaacggccctcctgtcagggaagccgctttatcgggtagccctcacigcccgttt-  
ccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcatcagtgaaatcgccaacgcgcggggagagg-  
cggtttgcgtattgggagccagggtggttttctttaccagtgagacggggcaacagct-  
gattgccctcaccgcctggccctgagagaggtgagcaagcgggtccacgcgtgttggcc-  
cagcaggcgaaaatcctgtttgatgtgtgtcagcggcgggatataacatgagctgtcct-  
cgggtalcgtglatccactaccgagatgtccgcaccaacgcgcagcccggaactcggtaat-  
ggcacgcattgcccagcgcctatgatcgttggcaaccagcatcgcagtggaacgatg-  
ccctcattcagcatttgcatgtgttggtaaaaccggacatggcactccagtcgcccctcc-
```

cgttcgcctatcggctgaattgatgagtgagatattatgccagccagccagacg-
 cagacgcgcgagacagaacttaalgggcccagcgaacagcgcgattgctggtggccaat-
 gcgaccagatgctccacgccagtcgcgtaccgtcctcatgggagaaaataactgtt-
 gatgggtgtcgtggtcagagacatcaagaataacgcgggaacattagtcaggcagcttc-
 cacagcaatagcatcctgggtcatccagcggatagtaataatcagcccactgacacgttg-
 cgcgagaagattgtgcaccgcgcgtttacaggccttcgacgccgttcgttclaccatga-
 cacgaccacgcctggcaccagttgatcggcgcgagattlaatcggcgcgacaattg-
 cgacggcgcgtgcaggccagactggagggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcc-
 cggcagttgtgtgccacgcggttaggaalgtlaatcagctccgccatcgccgttccac-
 ttttcccgcttttcgcagaaacgtggcctggcctggttaccacgcgggaaacggctga-
 taagagacaccggcctacatcgtacatcgtataacgttactggttccatccaccacc-
 tgaattgactctcttcgggcgtatcatgccataccgcgaaagggtttgcccattcgtat-
 gctagccatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccgcgttgctg-
 gcgttttccataggctccgccccctgacgagcctcacaaaaatcgacgcctcaagt-
 cagagggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccc-
 tegtgcgtctcctgttccgacctgcgcgttaccggatacctgtccgcctttctccctt-
 cgggaagcgtggcgcctttctcatagctcacgctgtaggatctcagttcgggtgaggctg-
 ttctgctccaagctggcctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgtgcgccttacc-
 cggtaactatcgtctgtgagttcaacccggtaagacacgactatcggcactggcagcagc-
 cacttgtaacaggattagcagagcggaggtatgtaggcgggtgctacagagttctgaagtgg-
 tggcctaactacggctacactagaagaacagtatttgggtatctgcgcctgtgtagccag-
 ttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccacgcgtgtagcgg-
 tgggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatcacaagaagatcc-
 ttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggaattt-
 ggtcagatctagcaccaggcgtttaaggggcaccataactcgttaaaaaaattacgcc-
 cgccttgcctactcatcgagctactgttgaattcattagcattctgcgcgacatggaagc-
 catcacaaacggcatgatgaacctgaatcgccagcggcagcagcacttgcgccttgcg-
 tataatatttggccatagtgaacacggggggcgaagaagttgtccatattggctacgtt-
 taaatcaaaactggtgaacacacccagggaattggctgagacgaaaaacatatttcaa-
 taaccctttagggaatatggccaggtttcaccgtaacacgccacatcttgcgaala-
 tatgtgtagaactgccggaaatcgtcgttggtattcactccagagcgtatgaaaacgtt-
 cagttgtctcatggaaaacgggtgaacaagggtgaacactatccatataccagctcac-
 cgtcttcatggccatacggaaactccgggtgagcattcatcaggcggggcaagaatgtgaa-
 taaaggccgggataaaacttgtgttattttctttacgggtcttataaaaggccgtataatc-
 cagctgaacggctgtgttataggtaacattgagcaactgactgaaatgccataaatgttc-
 ttacgatgccattgggatatatcaacgggtgtatatccagtattttttctccattt-
 tagcttcttagctcctgaaaatctcgataactcaaaaaatacggccggtagtgatct-
 tatttcattatggtgaaagttggaaccacccagcgtctaatgtgagttagctcactcat-
 taggcaccccaggccttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcg-
 gataacaattcacacaggaaacagctatgacctgattacgaatttctagataacgagggcaaaaa

Figura 6

