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

(11) **PI9715219-6 B1**

* B R P I 9 7 1 5 2 1 9 B 1 *

(22) Data de Depósito: 10/02/1997
(45) Data da Concessão: 23/02/2010
(RPI 2042)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/24 (2010.01)
C12N 15/13 (2010.01)
C12N 15/64 (2010.01)
C12N 5/10 (2010.01)
C12N 1/21 (2010.01)
A61K 39/395 (2010.01)
G01N 33/68 (2010.01)

(54) Título: **VETOR RECOMBINANTE DE EXPRESSÃO, E CÉLULA HOSPEDEIRA PROCARIÓTICA.**

(30) Prioridade Unionista: 09/02/1996 US 08/599226, 25/11/1996 US 60/031476

(73) Titular(es): Abbott Biotechnology Ltd., Abbott Laboratories (Bermuda) Ltd, Basf Aktiengesellschaft

(72) Inventor(es): Alison J. Wilton, Andrew J. Roberts, Boris Labrovsky, Brian T. McGuinness, David Schoenhaut, Deborah J. Allen, Hendricus R. J. M. Hoogenboom, Jochen G. Salfeld, John A. Mankovich, Michael White, Paul Sakorafas, Tristan J. Vaughan, Zehra Kaymakcalan

"VETOR RECOMBINANTE DE EXPRESSÃO, E CÉLULA HOSPEDEIRA PROCARIÓTICA"

Dividido do PI 9707379-2, depositado em 10/02/1997.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O fator α de necrose tumoral (TNFα) é uma citocina produzida por numerosos tipos de células, incluindo os monócitos e os macrófagos, que foram originalmente identificadas em sua capacidade de induzir a necrose de certos tumores de camundongos (ver, por exemplo, Old, L. (1985) *Science 230:* 630-632). Subsequentemente, um fator denominado caquectina, associado com caquexia, foi apresentado como sendo a mesma molécula TNFα. A TNFα foi implicada em medir o choque (ver, por exemplo, Beutler, B. e Cerami, A. (1988) *Annu. Rev. Biochem. 57*: 505-518; Beutler, B. e Cerami, A. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7: 625-655). Além disso, a TNFα tem sido implicada na fisiopatologia de uma variedade de outras doenças e distúrbios dos seres humanos, incluindo sépsis, infecções, doenças autoimunes, rejeição de transplantes e doença do enxerto versus hospedeiro (ver, por exemplo, Moeller, A. *et al.,* (1990) *Cytokine 2*: 162-169; Patente U.S. 5.231.024 para Moeller *et al.;* Publicação da Patente Européia 260 610 B1, por Moeller, A. *et al.*, Vasilli, P. (1992) *Annu. Rev. Immunol. 10*: 411-452; Tracey, K. J. e Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med. 45*: 491-503)

Por causa do papel prejudicial do TNFα humano (hTNFα) em uma variedade de distúrbios dos seres humanos, estratégias terapêuticas têm sido intentadas para inibir ou atuar contra a atividade do hTNFα. Em particular, os anticorpos que se ligam a, e neutralizam o, hTNFα têm sido procurados como um meio para inibir a atividade do hTNFα. Alguns dos mais antigos de tais anticorpos foram os anticorpos monoclonais de camundongos (mAbs), secretados por hibridomas preparados dos linfócitos de camundongos

imunizados com hTNFα (ver, por exemplo, Hahn, T. *et al.*, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82*: 3814-3818; Liang, C-M, *et al.* (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun. 137*: 847-854; Hirai, M. *et al.* (1987) *J. Immunol. Methods 96*: 57-62; Fendly, B. M; *et al.* (1987) *Hybridoma 6*: 359-370; Moeller, A. *et al.* (1990) *Cytokine 2*: 162-169; Patente U.S. 5.231.024 para Moeller *et al.*; Publicação da Patente Européia 186 833 B1 por Wallach, D.; Publicação do Pedido de Patente Européia 218 868 A1 por Old *et al.*; Publicação da Patente Européia 260 610 B1 por Moeller, A., *et al.*). Embora estes anticorpos anti-hTNFα de camundongos frequentemente apresentassem elevada afinidade quanto ao hTNFα (por exemplo Kd $\leq 10^{-9}$ M) e fossem capasses de neutralizar a atividade do hTNFα, seu uso *in vivo* pôde ser limitado pelos problemas associados com a administração de anticorpos de camundongos a seres humanos, tais como a curta meia vida do soro, uma incapacidade de disparar certas funções efetoras humanas e eliciação de uma resposta imune indesejável contra o anticorpo de camundongos em um ser humano [a reação do "anticorpo humano anticamundongo" (HAMA)].

Em uma tentativa de superar os problemas associados com o uso de anticorpos inteiramente de murinos em seres humanos, os anticorpos anti-hTNFα de murinos foram geneticamente construídos para serem mais "semelhantes aos humanos". Por exemplo, os anticorpos quiméricos, em que as regiões variáveis das cadeias de anticorpos são derivadas de murino, e as regiões constantes das cadeias de anticorpos são derivadas de seres humanos, foram preparados (Knight, D. M. *et al.* (1993) *Mol. Immunol. 30*: 1443-1453; Publicação PCT WO 92/16553 por Daddona, P. E. *et al.*). Adicionalmente, os anticorpos humanizados, em que os domínios hipervariáveis das regiões variáveis dos anticorpos são derivados de murinos, mas o remanescente das regiões variáveis e as regiões constantes de anticorpos, são derivados de seres humanos, foram preparados (Publicação PCT WO 92/11383 por Adair, J. R., *et al.*). No entanto, tendo em vista que estes anticorpos quiméricos e humanizados

ainda retêm algumas sequências de murinos, eles ainda eliciam uma reação imune indesejável, a reação do anticorpo antiquimérico humano (HACA), especialmente quando administrados por períodos prolongados, por exemplo, para indicações crônicas, tais como artrite reumatóide (ver, por exemplo, Elliott, M. J., *et al.* (1994) *Lancet 344*: 1125-1127; Elliott, M. J. *et al.* (1994) *Lancet 344*: 1105-1110). Um agente inibitório de hTNFα preferido para mAbs de murinos ou seus derivados (por exemplo, anticorpos quiméricos ou humanizados) deve ser um anticorpo anti-hTNFα inteiramente humano, uma vez que um tal agente não deve eliciar a reação HAMA, mesmo que usado por períodos prolongados. Os auto-anticorpos monoclonais humanos contra hTNFα têm sido preparados usando-se técnicas de hibridoma humano (Boyle, P. *et al.* (1993) *Cell. Immunol. 152*: 556-568; (Boyle, P. *et al.* (1993) *Cell. Immunol. 152*: 569-581; Publicação do Pedido de Patente Européia 614 984 A2 por Boyle *et al.*). No entanto, estes auto-anticorpos monoclonais derivados de hibridoma foram divulgados como tendo uma afinidade quanto a hTNFα, que foi demasiado baixa para se calcular por processos convencionais, foram incapazes de ligar os hTNFα solúveis e foram incapazes de neutralizar a citotoxicidade induzida por hTNFα (ver Boyle *et al.*, acima). Além do mais, o sucesso da técnica do hibridoma humano depende da presença natural no sangue periférico humano de linfócitos produtores de auto-anticorpos específicos para hTNFα. Certos estudos detectaram auto-anticorpos do soro contra hTNFα em indivíduos humanos (Fomsgaard, A. *et al* (1989) *Scand. J.Immunol. 30*: 219-223; Bendtzen, K., *et al.* (1990) *Prog. Leukocyte Biol. 10B*: 447-452, enquanto outros não o fizeram (Leusch, H-G., *et al.* (1991) *J. Immunol. Methods 139*: 145-147).

Alternativa para os anticorpos humanos anti-hTNFα de ocorrência natural deve ser um anticorpo recombinante de hTNFα. Anticorpos recombinantes humanos que ligam o hTNFα com afinidade relativamente baixa (isto é, $K_d \sim 10^{-7}$ M) e um índice muito rápido (isto é, $K_{off} \sim 10^{-2}$ seg^{-1}) foi

descrito (Griffiths, A. D., *et al.* (1993) *EMBO J. 12*: 725-734). No entendo, por causa de sua cinética de dissociação relativamente rápida, estes anticorpos não podem ser adequados para uso terapêutico. Adicionalmente, um anti-hTNFα recombinante humano foi descrito, que não neutraliza a atividade hTNFα, mas, ao invés, intensifica a ligação de hTNFα à superfície de células e intensifica a internalização de hTNFα (Lidbury, A., *et al.* (1994) *Biotechnol. Ther. 5*: Publicação PCT WO 92/03145 por Aston, R. *et al.*)

Consequentemente, os anticorpos humanos, tais como os anticorpos recombinantes humanos, que ligam o hTNFα solúvel com alta afinidade e cinética de dissociação lenta, e que têm a capacidade de neutralizar a atividade do hTNFα, incluindo a citotoxicidade induzida por hTNFα (*in vitro* e *in vivo*) e ativação celular induzida por hTNFα, são ainda necessários.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção proporciona anticorpos humanos, preferivelmente anticorpos recombinantes humanos, que especificamente se ligam a TNFα humano. Os anticorpos da invenção são caracterizados pela ligação a hTNFα com cinética de elevada afinidade e dissociação lenta, e por neutralização da atividade do hTNFα, incluindo a citotoxicidade induzida por hTNFα (*in vitro* e *in vivo*) e ativação celular induzida por hTNFα. Os anticorpos da invenção ainda são caracterizados por ligarem-se ao hTNFα, mas não ao hTNFβ (linfotoxina) e por terem a capacidade de ligarem-se a outros TNFαs primatas e TNFαs não primatas, além do TNFα humano.

Os anticorpos da invenção podem ser de comprimento completo (por exemplo um anticorpo IgG1 ou IgG4) ou pode compreender apenas uma porção de ligação a antígeno (por exemplo, um fragmento Fab, $F(ab')_2$ ou scFv). O anticorpo recombinante mais preferido da invenção, denominado D2E7, tem um domínio CDR3 de cadeia leve, compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 3 e um domínio CDR3 de cadeia pesada, compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 4.

Preferivelmente, o anticorpo D2E7 tem uma região variável de cadeia leve (LCVR) compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada (HCVR) compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2.

Em uma modalidade, a invenção proporciona um anticorpo humano isolado, ou uma porção deste de ligação a antígeno, que dissocia do TNFα humano com um K_d de 1 x 10^{-8} M ou menos, e um índice K_{off} constante de 1 x 10^{-3} s^{-1} ou menos, ambos determinados por ressonância de plásmon superficial, e neutraliza a citotoxicidade de TNFα humano em um ensaio padrão L929 *in vitro* com um IC_{50} de 1 x 10^{-7} M ou menos. Mais preferivelmente, o anticorpo humano isolado, ou suas porções de ligação a antígeno, se dissocia do TNFα humano com um K_{off} de 5 x 10^{-4} s^{-1} ou menos, o mesmo mais preferivelmente, com um K_{off} de 1 x 10^{-4} s^{-1} ou menos. Mais preferivelmente, o anticorpo humano isolado, ou sua porção de ligação a antígeno, neutraliza a citotoxicidade do TNFα humano em um ensaio padrão L929 *in vitro* com um IC_{50} de 1 x 10^{-8} M ou menos, mesmo mais preferivelmente com um IC_{50} de 1 x 10^{-9} M ou menos, e ainda mais preferivelmente com um IC_{50} de 5 x 10^{-10} M ou menos.

Em outra modalidade, a invenção provê um anticorpo humano, ou sua porção de ligação a antígeno, com as seguintes características:

a) dissocia-se do TNFα humano com um K_{off} de 1 x 10^{-3} s^{-1} ou menos, como determinado por ressonância de plásmon superficial;

b) tem um domínio CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 3, ou modificado da SEQ ID NO: 3 por uma substituição única de alanina na posição 1, 4, 5, 7 ou 8, ou por um a cinco substituições conservativas de aminoácido 1, 3, 4, 6, 7, 8 e/ou 9;

c) tem um domínio CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 4, ou modificado da SEQ ID NO: 4 por uma substituição única de alanina na posição 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ou 11 ou

por uma a cinco substituições conservativas de aminoácido nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e/ou 12.

Mais preferivelmente, o anticorpo, ou sua porção de ligação a antígeno, se dissocia do TNFα humano com um K_{off} de 5 x 10^{-4} s^{-1} ou menos. Ainda mais preferivelmente, o anticorpo, ou sua porção de ligação a antígeno, se dissocia do TNFα humano com um K_{off} de 1 x 10^{-4} s^{-1} ou menos.

Em ainda outra modalidade, a invenção provê um anticorpo humano, ou uma sua porção de ligação a antígeno, com uma LCVR tendo o domínio CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 3, ou modificado da SEQ ID NO: 3 por uma substituição única de alanina na posição 1, 4, 5, 7 ou 8, e com um HCVR tendo um domínio CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 4, ou modificado da SEQ ID NO: 4 por uma substituição única de alanina na posição 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ou 11. Mais preferivelmente, o LCVR ainda tem um domínio CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 5 e o HCVR ainda tem um domínio de CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 6. Ainda mais preferível, o LCVR ainda tem domínio CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 7 e o HCVR tem um domínio CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8.

Em ainda outra modalidade, a invenção provê um anticorpo humano isolado, ou uma sua porção de ligação a antígeno, com uma LCVR compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:1 e um HCVR compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o anticorpo tem uma região constante de cadeia pesada IgG1 ou uma região constante de cadeia pesada IgG4. Em ainda outras modalidades, o anticorpo é um fragmento Fab, um fragmento $F(ab')_2$ ou um fragmento Fv de cadeia única.

Em ainda outras modalidades, a invenção provê anticorpos, ou

suas porções de ligação a antígeno, com uma LCVR tendo domínio CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo das SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 ou com um HCVR tendo um domínio CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionados do grupo consistindo de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 e SEQ ID NO: 35.

Em ainda outra modalidade, a invenção provê um anticorpo humano isolado, ou uma sua porção de ligação a antígeno, que neutraliza a atividade do TNFα humano, porém não o TNFβ humano (linfotoxina). Em uma modalidade preferida, o anticorpo humano, ou sua porção de ligação a antígeno, neutraliza a atividade do TNFα humano, TNFα de chimpanzé e, pelo menos, um TNFα adicional de primata, selecionados do grupo consistindo de TNFα de *cynomolgus* e TNFα do macaco reso (rhesus). Preferivelmente, o anticorpo também neutraliza a atividade de pelo menos um TNFα não primata. Por exemplo, em uma submodalidade, o anticorpo isolado humano, ou sua porção de ligação a antígeno, também neutraliza a atividade do TNFα canino. Em outra submodalidade, o anticorpo humano isolado, ou sua porção de ligação a antígeno, também neutraliza a atividade do TNFα de porco. Em ainda outra submodalidade, o anticorpo humano isolado, ou sua porção de ligação a antígeno, também neutraliza a atividade do TNFα de camundongo.

Outro aspecto da invenção diz respeito a moléculas de ácido nucleico codificando os anticorpos, ou porções de ligação a antígeno, da invenção. Um ácido nucleico preferido da invenção, codificando uma LCVR D2E7, tem a sequência de nucleotídeos apresentada na Figura 7 e na SEQ ID NO: 36. Outro ácido nucleico preferido da invenção, codificando um HCVR

D2E7, tem a sequência de nucleotídeos apresentada na Figura 8 e na SEQ ID NO: 37. Os vetores recombinantes de expressão transportando os ácidos nucleicos codificando o anticorpo da invenção, e as células hospedeiras dentro das quais tais vetores foram introduzidos, também são englobados pela invenção, uma vez que são processos de produção de anticorpos da invenção mediante cultura das células hospedeiras da invenção.

Ainda outro aspecto da invenção diz respeito a processos para inibir a atividade de TNFα humano usando-se um anticorpo, ou duas porção de ligação a antígeno, da invenção. Em uma modalidade, o processo compreende o contato do TNFα humano com o anticorpo da invenção, ou sua porção de ligação a antígeno, de tal modo que a atividade do TNFα humano seja inibida. Em outra modalidade, o processo compreende administrar um anticorpo da invenção, ou sua porção de ligação a antígeno, a um indivíduo humano sofrendo de um distúrbio em que a atividade do TNFα é prejudicial, de forma tal que a atividade do TNFα humano no indivíduo humano seja inibida. O distúrbio pode ser, por exemplo, sépsis, uma doença auto-imune (por exemplo artrite reumatóide, alergia, esclerose múltipla, diabete auto-imune, uveíte auto-imune e síndrome nefrótica), uma doença infecciosa, uma malignidade, uma rejeição de transplante ou a doença do enxerto versus hospedeiro, um distúrbio pulmonar, um distúrbio dos ossos, um distúrbio intestinal ou um distúrbio cardíaco.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras 1A e 1B apresentam as sequências de aminoácido da região variável de cadeia leve de D2E7 (D2E7 VL; também mostrada na SEQ ID NO: 1), mutantes de cintilografia da alanina de D2E7 VL (LD2E7*.A1, LD2E7*A3, D2E7*A4, D2E7*.A5, LD2E7*.A7 e LD2E7*.A8), a região variável de cadeia leve do anticorpo 2SD4 relacionado a D2E7 (2SD4 VL; também apresentado na SEQ ID NO: 9) e outras regiões variáveis de cadeia leve relacionadas a D2E7 (EP B 12, VL10E4, VL100A9, VL100D2,

VL10F4, LOE5, VLLOF9, VLL0F10, VLLOG7, VLLOG9, VLLOH1, VLLOH10, VL1B7, VL1C1, VL1C7, VL0.1F4, VL0.1H8, LOE7, LOE7.A e LOE7.T). A Figura 1A apresenta os domínios FR1, CDR1, FR2 e CDR2. A Figura 1B apresente os domínios FR3, CDR3 e FR4. Os domínios de cadeia leve CDR1 ("CDR L1"), CDR2 ("CDR L2") e CDR3 ("CDR L3"), são em caixa.

As Figuras 2A e 2B apresenta as sequências de aminoácido da região variável de cadeia pesada de D2E7 (D2E7 VH; também apresentada na SEQ ID NO: 2), mutantes de cintilografia da alanina de D2E7 VH (HD2E7*.A1, HD2E7*.A3, HD2E7*.A4, HD2E7*.A5, HD2E7*.A6, HD2E7*.A7, HD2E7*.A8 e HD2E7*.A9), a região variável de cadeia pesada do anticorpo 2SD4 relacionado a D2E7 (2SD4 VH; também apresentada na SEQ ID NO: 10) e outras regiões variáveis de cadeia pesada relacionada a D2E7 (VH1B11, VH1D8, VH1A11, VH1B12, VH1-D2, VH1E4, VH1F6, VH1G1, 3C-H2, VH1-D2.N e VH1-D2.Y). A Figura 2A mostra os domínios FR1, CDR1, FR2 e CDR2. A Figura 2B mostra os domínios FR3, CDR3 e FR4. Os domínios CDR1 de cadeia pesada ("CDR H1"), CDR2 ("CDR H2") e CDR3 ("CDR H3") são em caixa.

A Figura 3 é um gráfico apresentando a inibição da citotoxicidade L929 induzida por TNFα pelo anticorpo D2E7 anti-hTNFα humano, em comparação com o anticorpo MAK 195 anti-hTNFα de murinos.

A Figura 4 é um gráfico apresentando a inibição de ligação rhTNFα aos receptores de hTNFα nas células U-937 pelo anticorpo D2E7 anti-hTNFα humano, em comparação com o anticorpo MAK 195 anti-hTNFα de murinos.

A Figura 5 é um gráfico apresentando a inibição da expressão ELAM-1 induzida por TNFα em HUVEC pelo anticorpo D2E7 anti-hTNFα humano, em comparação com o anticorpo MAK 195 anti-hTNFα de murinos.

A Figura 6 é um gráfico de barras apresentando a proteção da

letalidade induzida por TNFα em camundongos sensibilizados por D-galactosamina, mediante administração do anticorpo D2E7 anti-hTNFα humano (barras pretas), em comparação com o anticorpo MAK 195 anti-hTNFα de murinos (barras hachuradas).

A Figura 7 apresenta a sequência de nucleotídeos da região variável de cadeia leve de D2E7, com a sequência de aminoácidos mencionada abaixo da sequência de nucleotídeos. As regiões CDR L1, CDR L2 e CDR L3 estão sublinhadas.

A Figura 8 apresenta a sequência de nucleotídeos da região variável de cadeia pesada de D2E7, com a sequência de aminoácidos mencionada abaixo da sequência de nucleotídeos. As regiões CDR H1, CDR H2 e CDR H3 estão sublinhadas.

A Figura 9 é um gráfico apresentando o efeito do tratamento do anticorpo D2E7 na dimensão articulada média dos camundongos transgênicos Tg197, como um modelo de poliartrite.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Esta invenção diz respeito a anticorpos humanos isolados, ou suas porções de ligação a antígeno, que se ligam a TNFα humanos com elevada afinidade, um índice muito lento e capacidade eletada de neutralização. Vários aspectos da invenção dizem respeito a anticorpos e fragmentos de anticorpos, e a suas composições farmacêuticas, bem como a ácidos nucleicos, vetores recombinantes de expressão, e células hospedeiras para produzir tais anticorpos e fragmentos. Processos para usar os anticorpos da invenção para detectar TNFα humano ou para inibir a atividade do TNFα humano, quer *in vitro*, quer *in vivo*, também são englobados pela invenção.

De modo que a presente invenção possa ser mais facilmente entendida, certos termos são primeiro definidos.

O termo "TNFα humano" (abreviado aqui como hTNFα, ou simplesmente hTNF), como aqui usado, refere-se a uma citocina humana que

existe como uma forma secretada 17 kD e uma membrana 26 kD associada, cuja forma biologicamente ativa é composta de um trímero de moléculas 17 kD não covalentemente limitadas. A estrutura do hTNFα é descrita ainda em, por exemplo, Pennica, D., *et al.* (1984) *Nature 312*: 724-729; Davis, J. M. *et al.* (1987) *Biochemistry 26*: 1322-1326; e Jones, E. Y. *et al.* (1989) *Nature 338*: 225-228. O termo TNFα humano intenta incluir o TNFα recombinante humano (rhTNFα), que pode ser preparado por processos de expressão recombinante padrão ou comprados comercialmente (R & D Systems, Catálogo nº 210-TA, Minneapolis, MN).

O termo "anticorpo", como aqui empregado, pretende referir-se a moléculas de imunoglobulina, constituídas de quatro cadeias de polipeptídeos, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto. Cada cadeia pesada é constituída de uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como HCVR ou VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como LCVR ou VL e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida de um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões de determinação da complementaridade (CDR), entremeadas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de estrutura (FR). Cada VH e VL é composto de três CDRs e quatro FRs, arranjados do término amino ao término carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

A expressão "porção de ligação a antígeno" e3 um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo"), como aqui empregada, se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade para especificamente ligar-se a um antígeno (por exemplo, hTNFα). Foi observado que a função de ligação a antígeno de um anticorpo pode ser realizada por

fragmentos de um anticorpo de comprimento completo. Exemplos de fragmentos de ligação englobados dentro da expressão "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo inclui (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo dos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região da dobradiça; (iii) um fragmento Fd consistindo dos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo dos domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature 341*: 544-546), que consiste de um domínio VH; e (vi) uma região isolada de determinação da complementaridade (CDR). Além disso, não obstante os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos usando-se processos recombinantes, por um ligador sintético que permite que eles sejam produzidos como uma cadeia de proteína única, em que as regiões VL e VH se unem para formarem moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia única (scFv); ver, por exemplo, Bird *et al.* (1988) *Science 242*: 423-426; e Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85*: 5879-5883). Tais anticorpos de cadeia única também são destinados a serem englobados dentro da expressão "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo. Outras formas de anticorpos de cadeia única, tais como os dianticorpos, são também abrangidos. Os dianticorpos são bivalentes, anticorpos bi-específicos em que os domínios de VH e VL são expressos em uma cadeia de polipeptídeo única, mas usando um ligador que é muito curto para permitir a união entre os dois domínios na mesma cadeia, dessa forma forçando os domínios a unirem-se com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação a antígeno (ver, por exemplo, Holliger, P. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90*: 6444-6448; Poljak, R. J. *et al* (1994) *Structure 2*: 1121-1123).

Ainda mais, um anticorpo ou sua porção de ligação a antígeno pode ser parte de moléculas maiores de imunoadesão, formadas por associação

covalente ou não covalente do anticorpo ou da porção do anticorpo, com uma ou mais de outras proteínas ou peptídeos. Exemplos de tais moléculas de imunoadesão incluem o uso da região do núcleo da estreptavidina para produzir uma molécula tetramérica scFv (Kipriyanov, S. M. *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas 6*:93-101) e uso de um resíduo de cisteína, um peptídeo marcador e um marcador de poli-histidina C-terminal, para produzir moléculas ScFv bivalentes e biotiniladas (Kipriyanov, S. M. *et al.* (1994) *Mol. Immunol. 31*: 1047-1058). As porções dos anticorpos, tais como os fragmentos Fab e $F(ab')_2$, podem ser preparadas da totalidade dos anticorpos usando-se técnicas convencionais, tais como a digestão de papaína ou pepsina, respectivamente, da totalidade dos anticorpos. Além disso, os anticorpos, as porções dos anticorpos e as moléculas de imunoadesão, podem ser obtidas usando-se técnicas padrão de DNA recombinante, como aqui descritas.

A expressão "anticorpo humano", como aqui usada, intenta incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas das sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese *in vitro* aleatória ou específica do sítio ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo nos CDRs e, em particular, no CDR3. No entanto, a expressão "anticorpo humano", como aqui usada, não tenciona incluir os anticorpos em que as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de outras espécies de mamíferos, tais como de um camundongo, tenham sido enxertadas nas sequências da estrutura humana.

A expressão "anticorpo recombinante humano", como aqui empregada, pretende incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como os anticorpos expressos usando-se um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira (descrito ainda na Seção II, abaixo),

anticorpos isolados de uma coleção de anticorpos humanos recombinantes combinatórios (descritos ainda na Seção III, abaixo), anticorpos isolados de um animal (por exemplo um camundongo), que são transgênicos para os genes da imunoglobulina humana (ver, por exemplo, Taylor, L. D. *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res. 20*: 6287-6295), ou anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva a fixação das sequências dos genes da imunoglobulina a outras sequências de DNA. Tais anticorpos recombinantes humanos têm regiões variáveis e constantes derivadas das sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Em certas modalidades, no entanto, tais anticorpos recombinantes humanos estão sujeitos a mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para as sequências de Ig humano for usado, mutagênese somática *in vivo*), e assim as sequências de aminoácidos das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são sequências que, enquanto derivadas de, e relacionadas a, sequências VH e VL de uma linha germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório *in vivo* da linha germinativa de anticorpos humanos.

Um "anticorpo isolado", como aqui empregado, pretende referir-se a um anticorpo que seja substancialmente livre de outros anticorpos tendo especificidades antigênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente se ligue a hTNFα é substancialmente livre de anticorpos que especificamente se ligue a antígenos outros que não o hTNFα). Um anticorpo isolado que especificamente se liga ao hTNFα pode, no entanto, ter uma reatividade cruzada a outros antígenos, tais como as moléculas de TNFα de outras espécies (discutidas em mais detalhes abaixo). Além do mais, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material celular e/ou produtos químicos.

Um "anticorpo de neutralização", como aqui empregado (ou um "anticorpo que neutralizou a atividade de hTNFα"), tenciona referir-se a um anticorpo cuja ligação ao hTNFα resulta em inibição da atividade biológica de

hTNFα. Este inibição da atividade biológica de hTNFα pode ser avaliada mediante medição de um ou mais indicadores da atividade biológica do hTNFα, tal como a citotoxicidade induzida por hTNFα (ou *in vitro*, ou *in vivo*), ativação celular induzida por hTNFα e ligação de hTNFα a receptores de hTNFα. Estes indicadores da atividade biológica de hTNFα podem ser avaliados por um ou mais dos vários ensaios padrão *in vitro* ou *in vivo* conhecidos na ciência (ver Exemplo 4). Preferivelmente, a capacidade de um anticorpo neutralizar a atividade do hTNFα é avaliada mediante inibição da citoxicidade induzida por hTNFα das células L929. Como um parâmetro adicional ou alternativo da atividade de hTNFα, a capacidade de um anticorpo de inibir a expressão induzida por hTNFα de ELAM-1 sobre HUVEC, como uma medida da ativação celular induzida por hTNFα, pode ser avaliada.

A expressão "ressonância de plásmon superficial", como aqui empregada, se refere a um fenômeno ótico que permite quanto à análise de interações bioespecíficas em tempo real, por detecção das alterações em concentrações proteínicas dentro de uma matriz biossensora, por exemplo usando-se o sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia, e Piscataway NJ). Para outras descrições, ver Exemplo 1 e Jönsson, U. *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin. 51*: 19-26; Jönsson, U. *et al.* (1991) *Biotechniques 11*: 620-627; Johnsson, B. *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit. 8*: 125-131; e Johnsson, B. *et al.* (1991) *Anal. Biochem. 198*: 268-277.

O termo "K_{off}", como aqui usado, se refere à constante do índice de dissociação quanto à dissociação de um anticorpo do complexo anticorpo/antígeno.

O termo "K_d" como aqui empregado, intenta referir-se à constante de dissociação de uma interação particular anticorpo-antígeno.

A expressão "molécula de ácido nucleico", como aqui usada, inclui as moléculas de DNA e as moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de filamento único ou de filamento duplo, mas

preferivelmente é de DNA de filamento duplo.

A expressão "molécula isolada de ácido nucleico", como aqui empregada com referência a ácidos nucleicos codificando anticorpos ou porções de anticorpos (por exemplo, VH, VL, CDR3) que se ligam a hTNFα, refere-se a uma molécula de ácido nucleico em que as sequências de nucleotídeos codificando o anticorpo ou uma porção do anticorpo são livres de outras sequências de nucleotídeos codificando anticorpos ou porções de anticorpo que ligam antígenos outros que não o hTNFα, cujas outras sequências podem naturalmente flanquear o ácido nucleico em DNA genômico humano. Assim, por exemplo, um ácido nucleico isolado da invenção codificando uma região de VH de um anticorpo anti- TNFα não contém qualquer outra sequência codificando outras regiões de VH que ligam antígenos outros que não o TNFα.

O termo "vetor", como aqui empregado, se refere a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual ela se tenha ligado. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a uma alça de DNA circular de duplo filamento em que os segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que os segmentos adicionais de DNA podem ser ligados no genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira em que eles são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos tendo uma origem bacteriana de replicação e vetores epissômicos de mamíferos. Outros vetores (por exemplo, vetores não epissômicos de mamíferos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após introdução na célula hospedeira, e dessa forma são replicados juntamente com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão dos genes a que eles se acham operativamente ligados. Tais vetores são referidos aqui como "vetores recombinantes de expressão" (ou simplesmente "vetores de expressão"). Em geral, os vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante

são frequentemente na forma de plasmídeos. No presente Relatório Descritivo, "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados intercambiavelmente, uma vez que o plasmídeo é a forma mais comumente empregada de vetor. No entanto, a invenção intenta incluir essas outras formas de vetores de expressão, tais como os vetores virais (por exemplo, retrovírus, adenovírus e vírus associados a adeno, defeituosos, de replicação), que servem a funções equivalentes.

A expressão "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), como aqui empregada, refere-se a uma célula em que um vetor recombinante de expressão foi introduzido. Deve-se entender que tais termos intentam referir-se não apenas à célula objeto em particular, mas à progênie de uma tal célula. Tendo em vista que certas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas, ou devido à influência da mutação ou do meio ambiente, tal progênie não pode, de fato, ser idêntica à célula mãe, mas é ainda incluída dentro da expressão "célula hospedeira", como aqui empregada.

Vários aspectos da invenção são descritos em mais detalhes nas seguintes subseções.

I. Anticorpos humanos que se ligam ao TNFα humano

Esta invenção provê anticorpos humanos isolados, ou suas porções de ligação a antígenos, que se ligam a TNFα humano com alta afinidade, um índice de dissociação baixo e uma capacidade de neutralização elevada. De preferência, os anticorpos humanos da invenção são anticorpos humanos antihTNFα recombinantes de neutralização. O anticorpo recombinante de neutralização mais preferido da invenção é aqui referido como D2E7 e possui sequências VL e VH conforme mostrado nas Figuras 1A, 1B e nas Figuras 2A e 2B, respectivamente (a sequência de aminoácidos da região D2E7 VL também é mostrada na SEQ ID NO: 1; a sequência de aminoácidos da região D2E7 também é mostrada na SEQ ID NO: 2). As propriedades de ligação de D2E7, em comparação com o anti-hTNFα MAK 195 mAb, que

apresenta alta afinidade e cinética lenta de dissociação, e outro anticorpo anti-hTNFα humano relacionado na sequência como D2E7, 2SD4, são resumidas abaixo:

Experiência	IC_{50} [M]
1	1.26×10^{-10}
2	1.33×10^{-10}
3	1.15×10^{-10}
Média	$1.25 \pm 0.01 \times 10^{-10}$

O anticorpo D2E7, e os anticorpos relacionados, também apresentam uma forte capacidade para neutralizar a atividade do hTNFα, como avaliado por vários ensaios *in vitro* e *in vivo* (ver Exemplo 4). Por exemplo, estes anticorpos neutralizam a citotoxicidade induzida por hTNFα de células L929 com valores de IC_{50} na faixa de cerca de 10^{-7} M a cerca de 10^{-10} M. D2E7, quando expresso como um anticorpo IgG1 de comprimento completo, neutraliza a citoxicidade induzida por hTNFα de células L929 com IC_{50} de cerca de $1,25 \times 10^{-10}$ M. Além disso, a capacidade de neutralização de D2E7 é mantida quando o anticorpo é expresso como um fragmento Fab, $F(ab')_2$ ou scFv. O D2E7 também inibe a ativação celular induzida por TNFα, conforme medido por expressão ELAM-1 induzida por hTNFα em HUVEC (IC_{50} = cerca de $1,85 \times 10^{-10}$ M), e ligação de hTNFα a receptores de hTNFα em células U-937 (IC_{50} = cerca de $1,56 \times 10^{-10}$ M). Com referência ao último, o D2E7 inibe a ligação de hTNFα a ambos os receptores hTNFα p55 e p75. Além disso, o anticorpo inibe a letalidade induzida por hTNFα *in vivo* em camundongos (ED_{50} = 1 a 2,5 μg/camundongo).

Com respeito à especificidade da ligação de D2E7, este anticorpo se liga ao TNFα humano de várias formas, incluindo o hTNFα solúvel, a transmembrana hTNFα e a ligação do hTNFα a receptores celulares. O D2E7 não se liga especificamente a outras citocinas, tais como a linfotoxina (TNFβ), IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFNgama e TGFβ. No entanto, o

D2E7 apresenta reatividade cruzada a fatores de necrose tumoral de outras espécies. Por exemplo, o anticorpo neutraliza a atividade de pelo menos cinco TNFαs de primatas (chimpanzé, babuíno, saguí, *cynomolgus* e reso) com valores de IC_{50} aproximadamente equivalentes como para a neutralização de hTNFα (ver Exemplo 4, subseção E). O D2E7 também neutraliza a atividade do TNFα de camundongos, não obstante aproximadamente 1000 vezes menos bem do que o TNFα humano (ver Exemplo 4, subseção E). O D2E7 também se liga a TNFα canino e porcino.

Em outro aspecto, a invenção diz respeito a anticorpos D2E7 e porções de anticorpo, anticorpos e porções de anticorpos relacionados a D2E7, e outros anticorpos e porções de anticorpos de humanos, com propriedades equivalentes a D2E7, tais como a ligação de elevada afinidade a hTNFα com baixas cinéticas de dissociação e elevada capacidade de neutralização. Em uma modalidade, a invenção provê um anticorpo humano isolado, ou uma sua porção de ligação a antígenos, que dissocia do TNFα humano com um K_d de 1 x 10^{-8} M ou menos e uma constante do índice K_{off} de 1 x 10^{-3} ou menos, ambos determinados por ressonância de plásmon superficial, e neutraliza a citotoxicidade do TNFα humano em um ensaio padrão L929 *in vitro* com um IC_{50} de 1 x 10^{-7} M ou menos. Mais preferivelmente, o anticorpo humano isolado, ou sua porção de ligação a antígeno, se dissocia do TNFα humano com um K_{off} de 5 x 10^{-4} s^{-1} ou menos, ou mesmo, mais preferivelmente, com um K_{off} de 1 x 10^{-4} s^{-1} ou menos. Mais preferivelmente, o anticorpo humano isolado, ou sua porção de ligação a antígeno, neutraliza a citotoxicidade do TNFα humano em um ensaio padrão L929 *in vitro* com um IC_{50} de 1 x 10^{-8} M ou menos, mesmo mais preferivelmente com um IC_{50} de 1 x 10^{-9} M ou menos, e ainda mais preferível com um IC_{50} de 5 x 10^{-10} M ou menos. Em uma modalidade preferida, o anticorpo é um anticorpo recombinante humano isolado, ou uma sua porção de ligação a antígeno. Em outra modalidade preferida, o anticorpo também neutraliza a ativação celular induzida por TNFα,

como avaliado usando-se um ensaio padrão *in vitro* para a expressão ELAM-1 induzida por TNFα ou células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC).

A análise de ressonância de plásmon superficial para determinar K_d e K_{off} pode ser realizada como descrito no Exemplo 1. Um ensaio padrão L929 *in vitro* para determinar os valores de IC_{50} é descrito no Exemplo 4, subseção A. Um ensaio padrão *in vitro* para a expressão ELAM-1 induzida por TNFα em células endoteliais da veia umbilical de humanos (HUVEC) é descrito no Exemplo 4, subseção C. Exemplos de anticorpos recombinantes humanos que reúnem, ou são ditos reunirem, a cinética acima mencionada e os critérios de neutralização, incluem anticorpos tendo os seguintes duplas [VH/VL], cujas sequências são mostradas nas Figuras 1A, 1B, 2A e 2B (ver também os Exemplos 2, 3 e 4 quanto às análises de cinética e de neutralização): [D2E7 VH/D2E7 VL], [HD2E7*.A1/D2E7 VL], [HD2E7*.A2/D2E7 VL], [HD2E7*.A3/D2E7 VL], [HD2E7*.A4/D2E7 VL], [HD2E7*.A5/D2E7 VL], [HD2E7*.A6/D2E7 VL], [HD2E7*.A7/D2E7 VL], [HD2E7*.A8/D2E7 VL], [HD2E7*.A9/D2E7 VL], [D2E7 VH/LD2E7*.A1], [D2E7 VH/LD2E7*.A4], [D2E7 VH/LD2E7*.A5], [D2E7 VH/LD2E7*.A7], [D2E7 VH/LD2E7*.A8], [HD2E7*.A9/LD2E7*.A1], [VH1-D2/LOE7], [VH1-D2.N/LOE7.T], [VH1-D2.Y/LOE7.A],[VH1-D2.N/LOE7.A], [VH1-D2/EP B12] e [3C-H2/LOE7].

É bem conhecido na arte que os domínios CDR3 de cadeia pesada e leve de anticorpos, desempenham um papel importante na especificidade/afinidade da ligação de um anticorpo a um antígeno. Consequentemente, em outro aspecto, a invenção diz respeito a anticorpos humanos que possuem cinética de dissociação lenta para associação com hTNFα e que possuem domínios CDR3 de cadeia leve e pesada que estruturalmente são idênticos ou relacionados àqueles do D2E7. Conforme demonstrado no Exemplo 3, a posição 9 do CDR3 D2E7 VL pode ser ocupada por Ala ou Thr, sem substancialmente afetar o K_{off}. Em consequência, um

motivo de consenso para o CDR3 D2E7 VL compreende a sequência de aminoácido: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEQ ID NO: 3). Adicionalmente, a posição 12 do CDR3 D2E7 VH pode ser ocupada por Tyr ou Asn, sem substancialmente afetar o K_{off}. Consequentemente, um motivo de consenso para o CDR3 D2E7 VH compreende a sequência de aminoácidos: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEQ ID NO: 4). Além disso, como demonstrado no Exemplo 2, o domínio do CDR3 das cadeias pesada e leve de D2E7 é acessível à substituição por um resíduo único de alanina (nas posições 1, 4, 5, 7 ou 8 dentro do CDR3 VL, ou nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ou 11, dentro do CDR3 VH), sem substancialmente afetar o K_{off}. Mais ainda, o técnico experiente observará que, dada a acessibilidade dos domínios D2E7 VL e do CDR3 VH a substituições por alanina, a substituição de outros aminoácidos dentro dos domínios CDR3 pode ser possível, enquanto ainda retém a constante do índice de dissociação baixo do anticorpo, em particular substituições com aminoácidos conservativos. Uma "substituição conservativa de aminoácidos", como aqui usada, é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácidos tendo cadeias laterais similares foram têm sido definidas na arte, incluindo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais β-ramificadas (por exemplo treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). De preferência, não mais do que uma a cinco substituições de aminoácido conservativo são feitas dentro dos domínios D2E7 VL e/ou CDR3 VH. Mais preferivelmente, não mais do que uma a três substituições conservativas de aminoácido são feitas dentro dos domínios

D2E7 VL e/ou CDR3 VH. Adicionalmente, as substituições de aminoácido conservativo não devem ser feitas nas posições de aminoácido críticas para ligação ao hTNFα. Como mostrado no Exemplo 3, as posições 2 e 5 do CDR3 D2E7 VL, e as posições 1 e 7 do CDR3 D2E7 VH parecem ser críticas para interação com o hTNFα e, assim, as substituições de aminoácido conservativo preferivelmente não são feitas nestas posições (não obstante uma substituição da alanina na posição 5 do CDR3 D2E7 VL é aceitável, como acima descrito).

Consequentemente, em outra modalidade, a invenção provê um anticorpo humano isolado, ou uma sua porção de ligação a antígeno, com as seguintes características:

a) dissocia do TNFα humano com uma constante do índice K_{off} de 1 x 10^{-3} s^{-1} ou menos, como determinado por ressonância de plásmon superficial;

b) tem um domínio CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 3, ou modificado da SEQ ID NO: 3 por uma substituição única de alanina nas posições 1, 4, 5, 7 ou 8, ou por um a cinco substituições de aminoácido conservativo nas posições 1, 3, 4, 6, 7, 8 e/ou 9;

c) tem um domínio CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 4, ou modificado da SEQ ID NO: 4 por uma substituição única de alanina nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ou 11, ou por uma a cinco substituições de aminoácido conservativo nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e/ou 12.

Mais preferivelmente, o anticorpo, ou sua porção de ligação a antígeno, se dissocia do TNFα humano com um K_{off} de 5 x 10^{-4} s^{-1} ou menos. Mesmo mais preferivelmente, o anticorpo, ou sua porção de ligação a antígeno, se dissocia do TNFα humano com um K_{off} de 1 x 10^{-4} s^{-1} ou menos.

Em ainda outra modalidade, a invenção provê um anticorpo humano isolado, ou uma sua porção de ligação a antígeno, com uma região

variável de cadeia leve (LCVR) tendo um domínio CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 3, ou modificado da SEQ ID NO: 3 por uma substituição única de alanina nas posições 1, 4, 5, 7 ou 8, e por uma região variável de cadeia pesada (HCVR) tendo um domínio CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 4, ou modificado da SEQ ID NO: 4 por uma substituição única de alanina nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ou 11. Preferivelmente, a LCVR ainda tem um domínio CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5 (isto é, o CDR2 D2E7 VL) e o HCVR ainda tem um domínio CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6 (isto é, o CDR2 D2E7 VH). Mesmo mais preferivelmente, a LCVR ainda tem um domínio CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 7 (isto é, o CDR1 D2E7 VL) e a HCVR tem um domínio CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8 (isto é, o CDR1 D2E7 VH). As regiões da estrutura quanto ao VL preferivelmente são da família da linha germinativa humana V_k1, mais preferivelmente do gene Vk da linha germinativa humana A20 e, o mais preferível, das sequência da estrutura D2E7 VL apresentadas nas Figuras 1A e 1B. As regiões da estrutura quanto a VH preferivelmente são da família da linha germinativa humana V_H3, mais preferivelmente do gene VH da linha germinativa humana DP-31 e, o mais preferível, das sequências da estrutura D2E7 VH mostradas nas Figuras 2A e 2B.

Em ainda outra modalidade, a invenção provê um anticorpo humano isolado ou uma sua porção de ligação a antígeno, com uma região variável de cadeia leve (LCVR) compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 (isto é, o D2E7 VL) e uma região variável de cadeia pesada (HCVR) compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 (isto é, o D2E7 VH). Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada, tal como uma região constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD. Preferivelmente, a região constante de cadeia

pesada é uma região constante de cadeia pesada IgG1 ou uma região constante de cadeia pesada IgG4. Além disso, o anticorpo pode compreender uma região constante de cadeia leve, ou uma região constante de cadeia leve capa, ou uma região constante de cadeia leve lambda. Preferivelmente, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia leve capa. Alternativamente, a porção do anticorpo pode ser, por exemplo, um fragmento Fab ou um fragmento Fv de cadeia única.

Em outras modalidades ainda, a invenção provê um anticorpo humano isolado, ou suas porções de ligação a antígeno, tendo os domínios CDR3 VL e VH relacionados a D2E7, por exemplo, os anticorpos, ou suas porções de ligação a antígeno, com uma região variável de cadeia leve (LCVR) tendo um domínio CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo das SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26, ou com uma região variável de cadeia pesada (HCVR) tendo um domínio CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo das SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 e SEQ ID NO: 35.

Em outra modalidade ainda, a invenção provê um anticorpo recombinante humano, ou sua porção de ligação a antígeno, que neutraliza a atividade do TNFα humano, mas não do TNFβ humano. Preferivelmente, o anticorpo, ou sua porção de ligação a antígeno, também neutraliza a atividade do TNFα de chimpanzé e pelo menos um TNFα de primatas adicional selecionado do grupo consistindo de TNFα de babuínos, TNFα de saguís, TNFα de *cynomolgus* e TNFα de reso. Preferivelmente, o anticorpo, ou sua porção de ligação a antígeno, neutraliza o TNFα de seres humanos, de

chimpazé e/ou adicional de primatas, em um ensaio L929 padrão *in vitro* com um IC_{50} de 1 x 10^{-8} M ou menos, mais preferivelmente de 1 x 10^{-9} M ou menos, e mesmo mais preferivelmente de 5 x 10^{-10} ou menos. Em uma submodalidade, o anticorpo também neutraliza a atividade do TNFα canino, preferivelmente em um ensaio L929 padrão *in vitro* com um IC_{50} de 1 x 10^{-7} M ou menos, mais preferivelmente de 1 x 10^{-8} M ou menos, e mesmo mais preferivelmente de 5 x 10^{-9} ou menos. Em uma outra submodalidade, o anticorpo também neutraliza a atividade do TNFα de porcos, preferivelmente com um IC_{50} de 1 x 10^{-5} M ou menos, mais preferivelmente de 1 x 10^{-6} M ou menos, e mesmo mais preferivelmente de 5 x 10^{-7} ou menos. Em ainda outra modalidade, o anticorpo também neutraliza a atividade do TNFα de camundongos, preferivelmente com um IC_{50} de 1 x 10^{-4} M ou menos, mais preferivelmente de 1 x 10^{-5} M ou menos, e mesmo mais preferivelmente de 5 x 10^{-6} ou menos.

Um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção podem ser derivados ou ligados a outra molécula funcional (por exemplo, outro peptídeo ou proteína). Consequentemente, os anticorpos e as porções de anticorpos da invenção intentam incluir formas derivadas e de outro modo modificadas dos anticorpos anti_hTNFα humanos, aqui descritos, incluindo moléculas de imunoadesão. Por exemplo, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção podem ser funcionalmente ligados (por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente, ou de outra forma) a um ou mais outras entidades moleculares, tais como outro anticorpo (por exemplo, um anticorpo bi-específico ou um di-anticorpo), um agente detectável, um agente citotóxico, um agente farmacêutico e/ou uma proteína ou peptídeo que possam mediar a associação do anticorpo ou da porção de anticorpo com outra molécula (tal como uma região do núcleo da estreptavidina ou um marcador de poli-histidina).

Um tipo de anticorpo derivado é produzido por reticulação de dois ou mais anticorpos (do mesmo tipo ou de tipos diferentes, por exemplo

para criar anticorpos bi-específicos). Reticuladores adequados incluem aqueles que são heterobifuncionais, tendo dois grupos distintamente reativos separados por um espaçador apropriado (por exemplo, éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) ou homobifundional (por exemplo, suberato de di-succinimidila). Tais ligadores são disponíveis da Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Agentes detectáveis úteis, com o qual um anticorpo ou porção do anticorpo da invenção podem ser derivados, incluem os compostos fluorescentes. Exemplos de agentes fluorescentes detectáveis incluem a fluoresceína, o isotiocianato de fluoresceína, a rodamina, o cloreto de 5-dimetilamina-1-naftaleno sulfonila, a ficoeritrina, e outros. Um anticorpo pode também ser derivado com enzimas detectáveis, tais como a fosfatase alcalina, a peroxidase da raiz forte, a glicose oxidase e outras. Quando um anticorpo é derivado com uma enzima detectável, ele é detectado mediante adição de reagentes adicionais que a enzima utiliza para produzir um produto detectável de reação. Por exemplo, quando o agente detectável peroxidase da raiz forte está presente, a adição de peróxido de hidrogênio e diaminobenzidina conduz a um produto de reação colorido, que é detectável. Um anticorpo também pode ser derivado com biotina, e detectado através de medição indireto da avidina ou da ligação da estreptavidina.

II. **Expressão de anticorpos**

Um anticorpo, ou porção de anticorpo, da invenção, podem ser preparados por expressão recombinante dos genes de imunoglobulina de cadeia leve e pesada em uma célula hospedeira. Para expressar um anticorpo recombinantemente, uma célula hospedeira é transfectada com um ou mais vetores recombinantes de expressão transportando fragmentos de DNA codificando as cadeias de imunoglobulina de cadeias leve e pesada do anticorpo, tal que as cadeias leves e pesadas sejam expressas na célula hospedeira e, preferivelmente, secretadas no meio em que as células

hospedeiras estão cultivadas, de cujo meio os anticorpos podem ser recuperados. Metodologias padrão de DNA recombinante são usadas para obter os genes de anticorpos de cadeia pesada e leve, incorporar estes genes nos vetores recombinantes de expressão e introduzir os vetores nas células hospedeiras, tais como aquelas descritas em Sambrook, Fritsch e Maniatis (eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor, NY, (1989), Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1989) e na Patente U.S. 4.816.397 por Boss *et al.*

Para expressar D2E7 ou um anticorpo relacionado a D2E7, os fragmentos de DNA codificando as regiões de cadeia leve e pesada são primeiramente obtidos. Estes DNAs podem ser obtidos por ampliação e modificação de sequências variáveis de cadeia leve e pesada de linha germinativa, usando uma reação em cadeia de polimerase (PCR). As sequências de DNA de linha germinativa quanto aos genes da região variável de cadeia pesada e leve, são conhecidas nesta ciência (ver, por exemplo, os dados de base da sequência de linha germinativa humana "Vbase"; ver também Kabat, E. A. *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services (Departamento Americano de Serviços de Saúde e Humanos), NIH Publication nº 91-3242; Tomlinson, I. M. *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol. 227*: 776-798; e Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_k Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol. 24*: 827-836; os conteúdos dos quais são aqui expressamente incorporados por referência). Para obter um fragmento de DNA codificando a região variável de cadeia pesada de D2E7, ou um anticorpo relacionado a D2E7, um membro da família V_H3 de genes VH da linha germinativa humana é ampliado por PCR padrão. Mais preferivelmente, a

sequência da linha germinativa VH DP-31 é ampliada. Para obter um fragmento de DNA codificando a região variável da cadeia leve de D2E7, ou um anticorpo relacionado a D2E7, um membro da família V_KI de genes VL da linha germinativa humana é ampliado por PCR padrão. Mais preferivelmente, a sequência da linha germinativa VL A20 é ampliado. Os iniciadores de PCR adequados para uso na ampliação das sequências VL da linha germinativa VH e A20 da linha germinativa DP-31, podem ser designados com base nas sequências de nucleotídeos apresentadas nas referências citadas acima, usando-se processos padrão.

Uma vez os fragmentos VH e VL da linha germinativa sejam obtidos, estas sequências podem ser modificadas para codificar as sequências de aminoácidos do D2E7 ou relacionadas a D2E7 aqui apresentadas. As sequências de aminoácidos codificadas pelas sequências de DNA VH e VL da linha germinativa, são primeiro comparadas às sequências de aminoácidos VH e VL do D2E7 ou relacionadas ao D2E7, para identificar os resíduos de aminoácidos na sequência do D2E7 ou relacionada ao D2E7 que difere da linha germinativa. Então, os nucleotídeos apropriados das sequências do DNA da linha germinativa são transformados de tal modo que a sequência da linha germinativa transformada codifique a sequência de aminoácidos do D2E7 ou relacionados ao D2E7, usando-se o código genético para determinar quais as modificações de nucleotídeos que devem ser feitas. A mutagênese das sequências da linha germinativa é realizada por processos padrão, tais como a mutagênese mediada por PCR (em que os nucleotídeos transformados são incorporados nos iniciadores de PCR, tal que o produto de PCR contenha as mutações) ou a mutagênese dirigida ao sítio.

Além disso, deve ser observado que, de as sequências da "linha germinativa" obtidas por ampliação do PCR codifica as diferenças de aminoácidos nas regiões da estrutura, da configuração da verdadeira linha germinativa (isto é, diferenças na sequência ampliada em comparação com a

verdadeira sequência da linha germinativa, por exemplo como resultado de mutação somática), pode ser desejável modificar estas diferenças de aminoácidos de volta às sequências da verdadeira linha germinativa (isto é, "mutação retrógrada" dos resíduos da estrutura para a configuração da linha germinativa).

Uma vez sejam obtidos os fragmentos de DNA codificando os segmentos VH e VL do D2E7 ou relacionados ao D2E7 (por ampliação e mutagênese dos genes VH e VL da linha germinativa, como descrito acima), estes fragmentos de DNA pode ainda ser manipulados por técnicas padrão de DNA recombinante, por exemplo para converter os genes da região variável a genes de cadeia de anticorpos de comprimento completo, a genes de fragmentos Fab ou a um gene scFv. Nestas manipulações, um fragmento de DNA codificando VL ou VH é operativamente ligado a outro fragmento de DNA codificando outra proteína, tal como uma região constante de anticorpos ou um ligador flexível. A expressão "operativamente ligado", como empregada neste contexto, deve ser entendida como significando que os dois fragmentos de DNA são unidos de tal modo que as sequências de aminoácidos codificadas pelos dois fragmentos de DNA permaneçam na estrutura.

O DNA isolado codificando a região VH pode ser convertido em um gene de cadeia pesada de comprimento completo, ligando operativamente o DNA codificando VH a outra molécula de DNA codificando as regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As sequências dos genes humanos da região constante de cadeia pesada são conhecidos na arte (ver, por exemplo, Kabat, E. A. *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH PUblication nº 91-3242) e os fragmentos de DNA incluindo estas regiões podem ser obtidos por ampliação padrão do PCR. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante IgG1, IgG2, IgG3, IgA, IgE, IgM ou IgD, mas a mais preferível é uma região constante IgG1 ou

IgG4. Para um gene de cadeia pesada do fragmento Fab, o DNA codificando VH pode ser operativamente ligado a outra molécula codificando apenas a região constante CH1 de cadeia pesada.

O DNA isolado codificando a região VL pode ser convertido em um gene da cadeia leve de comprimento completo (bem como um gene de cadeia leve Fab), operativamente ligando o DNA codificando VL a outra molécula de DNA codificando a região constante de cadeia leve, CL. As sequências de genes humanos da região constante de cadeia leve são conhecidos na ciência (ver, por exemplo, Kabat, E. A. *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication nº 91-3242), e os fragmentos de DNA incluindo estas regiões podem ser obtidos por ampliação padrão do PCR. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante capa ou lambda, mas a mais preferível é uma região constante capa.

Para criar um gene scFv, os fragmentos de DNA codificando VH e VL são operativamente ligados a outro fragmento codificando um ligador flexível, por exemplo, codificando a sequência de aminoácido $(Gly_4\text{-}Ser)_3$, tal que as sequências VH e VL podem ser expressas como uma proteína contígua de cadeia única, com as regiões VL e VH unidas pelo ligador flexível (ver, por exemplo, Bird *et al.* (1988) *Science 242*: 423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85*: 5879-5883; McCafferty *at al.*, *Nature* (1990) *348*: 552-554).

Para expressar os anticorpos, ou porções dos anticorpos da invenção, os DNAs codificando as cadeias leves e pesadas parciais ou de comprimento completo, obtidos como descrito acima, são interseridos nos vetores de expressão, de tal modo que os genes sejam operativamente ligados a sequências de controle transcricional e translacional. Neste contexto, a expressão "operativamente ligados" deve significar que um gene de anticorpo é ligado em um vetor, de modo tal que as sequências de controle transcricional e

translacional dentro do vetor servem à sua função de destino, de regular a transcrição e a translação do gene do anticorpo. O vetor de expressão e as sequências de controle da expressão são escolhidas para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de cadeia leve do anticorpo e o gene de cadeia pesada do anticorpo, podem ser inseridos em vetores separado ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes do anticorpo são interseridos no vetor de expressão por processos padrão (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementar no fragmento e vetor do gene do anticorpo, ou ligação terminal embotada, se nenhum sítio de restrição estiver presente). Antes da inserção das sequências de cadeia leve ou pesada do D2E7 ou relacionada ao D2E7, o vetor de expressão já pode transportar sequências da região constante de anticorpos. Por exemplo, uma abordagem para converter as sequências VH e VL do D2E7 e relacionadas a D2E7 em genes de anticorpos de comprimento completo, é inseri-los nos vetores de expressão já codificando as regiões constantes de cadeia pesada e constantes de cadeia leve, respectivamente, de tal forma que o segmento VH seja operativamente ligado ao(s) segmento(s) CH dentro do vetor, e o segmento VL seja operativamente ligado ao segmento CL dentro do vetor. Adicional ou alternativamente, o vetor recombinante de expressão pode codificar um peptídeo de sinal que facilita a secreção da cadeia do anticorpo da célula hospedeira. O gene da cadeia do anticorpo pode ser clonado dentro do vetor, de maneira que o peptídeo de sinal seja ligado na estrutura ao terminal amino do gene da cadeia do anticorpo. O peptídeo de sinal pode ser um peptídeo de sinal de imunoglobulina ou um peptídeo de sinal heterólogo (isto é, um peptídeo de sinal de uma proteína não imunoglobulina).

Além dos genes da cadeia dos anticorpos, os vetores recombinantes de expressão da invenção transportam sequências regulatórias que controlam a expressão dos genes da cadeia dos anticorpos em uma célula hospedeira. A expressão "sequência regulatória" pretende incluir promotores,

intensificadores e outros elementos de controle da expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação), que controlam a transcrição ou a translação dos genes da cadeia de anticorpos. Essas sequências regulatórias são descritas, por exemplo, em Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Será observado por aqueles experientes nesta ciência que o projeto do vetor de expressão, incluindo a seleção de sequências regulatórias, pode depender de fatores tais como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada, etc. As sequências regulatórias preferidas para expressão da célula hospedeira de mamíferos incluem os elementos virais que dirigem os níveis elevados da expressão proteínica em células de mamíferos, tais como promotores e/ou intensificadores derivados de citomegalovírus (CMV) (tais como o promotor/intensificador de CMV), Vírus Símio 40 (SV40) (tal como o promotor/intensificador de SV40), o promotor principal tardio de adenovírus (AdMLP) e polioma. Para outra descrição dos elementos virais regulatórios, e de suas sequências, ver, por exemplo, a Patente U.S. nº 5.168.062 por Stinski, a Patente U.S. nº 4.510.245 por Bell *et al.* e a Patente U.S. nº 4.968.615 por Schaffner *et al.*

Além dos genes da cadeia de anticorpos e sequências regulatórias, os vetores recombinantes de expressão da invenção podem transportar sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras, em que o vetor tenha sido introduzido (ver, por exemplo, as Patentes U.S. nºs 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todas por Axel *et al.*). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência a medicamentos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira dentro da qual o vetor tenha sido introduzido. Os genes marcadores selecionáveis preferidos incluem o gene da

diidrofolato redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiras dhfr$^-$ com seleção/ampliação de metotrexato) e o gene *neo* (para a seleção G418).

Para expressão das cadeias leves e pesadas, o(s) vetor(es) de expressão codificando as cadeias pesadas e leves, é(são) transfectado(s) dentro de uma célula hospedeira por técnicas padrão. As várias formas do termo "transfecção" se destinam a incluir uma ampla variedade de técnicas comumente usadas para a introdução de DNA exógeno em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, por exemplo a eletroporação, a precipitação de cálcio-fosfato, a transfecção DEAE-dextrana, e outras. Não obstante seja teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção, ou em células procarióticas, ou eucarióticas, a expressão dos anticorpos em células eucarióticas, e mais preferivelmente células hospedeiras de mamíferos, é a mais preferida, porque tais células eucarióticas, e em particular as células de mamíferos, são mais prováveis do que as células procarióticas de se agruparem e de secretarem um anticorpo propriamente desdobrado e imunologicamente ativo. A expressão procariótica dos genes dos anticorpos tem sido relatada como ineficaz para a produção de elevados níveis de anticorpo ativo (Boss, M. A. e Wood, C. R. (1985) *Immunology Today 6*: 12-13).

As células hospedeiras de mamíferos preferidas para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem o Ovário de Criceto (hamster) Chinês (células CHO), incluindo as células CHO dhfr-, descritas em Urlaub e Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77*: 4216-4220, usadas com um marcador selecionável DHFR, por exemplo como descrito em R. J. Kaufman e P. A. Sharp (1982) *Mol. Bio. 159*: 601-621), células de mielomas NS0, células COS e células SP2. Quando os vetores recombinantes de expressão codificando os genes de anticorpos são introduzidos nas células hospedeiras de mamíferos, os anticorpos são produzidos por cultivo das células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, a secreção do

anticorpo no meio de cultura em que as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando-se processos padrão de purificação de proteína.

As células hospedeiras também podem ser usadas para produzirem porções de anticorpos intactos, tais como os fragmentos Fab ou as moléculas scFv. Será entendido que variações no procedimento acima se acham dentro do escopo da presente invenção. Por exemplo, pode ser desejável transfectar uma célula hospedeira com o DNA codificando, ou a cadeia leve, ou a cadeia pesada (mas não ambas) de um anticorpo desta invenção. A tecnologia do DNA também pode ser usada para remover algum ou todo o DNA codificando qualquer ou ambas as cadeias leve ou pesada que não sejam necessárias para ligação ao hTNFα. As moléculas expressas de tais moléculas de DNA truncadas também são abrangidas pelos anticorpos da invenção. Além disso, podem ser produzidos anticorpos bifuncionais em que uma cadeia pesada e uma leve são um anticorpo da invenção, e a outra cadeia leve e pesada são específicas para um antígeno diferente do hTNFα, mediante reticulação de um anticorpo da invenção em um segundo anticorpo, por processos padrão de reticulação química.

Em um sistema preferido para expressão recombinante de um anticorpo, ou sua porção de ligação a antígeno, da invenção, um vetor recombinante de expressão codificando tanto a cadeia pesada do anticorpo, quanto a cadeia leve do anticorpo, é introduzido nas células CHO dhfr- mediante transfecção mediada por fosfato de cálcio. Dentro do vetor recombinante de expressão, os genes de cadeia pesada e leve do anticorpo são, cada um, operativamente ligados aos elementos regulatórios intensificador/promotor (por exemplo, derivado de SV40, CMV, adenovírus e outros, tais como um elemento regulatório do intensificador CMV/promotor AdMLP ou um elemento regulatório do intensivicador SV40/promotor AdMLP), para conduzir altos níveis de transcrição dos genes. O vetor

recombinante de expressão também conduz um gene DHFR, que leva em conta a seleção de células de CHO que tenham sido transfectadas com o vetor, usando-se seleção/ampliação de metotrexato. As células hospedeiras transformantes selecionadas são cultivadas tomando em consideração a expressão das cadeias de anticorpos pesada e leve e o anticorpo intacto é recuperado do meio de cultura. As técnicas padrão de biologia molecular são empregadas para preparar o vetor recombinante de expressão, transfectar as células hospedeiras, selecionar quanto aos transformantes, cultivar as células hospedeiras e recuperar o anticorpo do meio de cultura.

Em vista do acima, outro aspecto da invenção diz respeito a composições de ácido nucleico, vetor e células hospedeiras, que podem ser usados para expressão recombinante dos anticorpos e porções dos anticorpos da invenção. A sequência de nucleotídeos codificando a região variável de cadeia leve D2E7 é apresentada na Figura 7 e na SEQ ID NO: 36. O domínio CDR1 do LCVR encerra os nucleotídeos 70 a 102, o domínio CDR2 encerra os nucleotídeos 148 a 168, e o domínio CDR3 encerra os nucleotídeos 265 a 291. A sequência de nucleotídeos codificando a região variável de cadeia pesada D2E7 é mostrada na Figura 8 e na SEQ ID NO: 37. O domínio CER1 do HCVR encerra os nucleotídeos de 91 a 105, o domínio CDR2 encerra os nucleotídeos 148 a 190, e o domínio CDR3 encerra os nucleotídeos 295-330. Será observado pelos técnicos experientes que as sequências de nucleotídeos codificando os anticorpos relacionados com D2E7, ou porções destes (por exemplo, um domínio de CDR, tal como um domínio de CDR3), podem ser derivadas das sequências de nucleotídeos codificando as LCVR e HCVR do D2E7, usando-se o código genético e as técnicas padrão de biologia molecular.

Em uma modalidade, a invenção provê um ácido nucleico isolado codificando um domínio de CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 3 (isto é, o CDR3 VL do D2E7), ou modificado da SEQ ID NO: 3 por uma substituição única de alanina nas

posições 1, 4, 5, 7 ou 8, ou por um a cinco substituições conservativas de aminoácidos nas posições 1, 3, 4, 6, 7, 8 e/ou 9. Este ácido nucleico pode codificar apenas a região do CDR3 ou, mais preferivelmente, codifica uma região variável inteira de cadeia leve de anticorpos (LCVR). Por exemplo, o ácido nucleico pode codificar uma LCVR tendo um domínio CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 5 (isto é, o CDR2 VL do D2E7) e um domínio CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 7 (isto é, o CDR1 VL do D2E7).

Em outra modalidade, a invenção provê um ácido nucleico isolado codificando um domínio CDR3 de cadeia pesada, compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4 (isto é, o CDR3 VH do D2E7), ou modificado da SEQ ID NO: 4 por uma substituição única de alanina nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ou 11, ou por de um a cinco substituições de aminoácidos conservativos nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e/ou 12. Este ácido nucleico pode codificar apenas a região CDR3 ou, mais preferivelmente, codifica uma região inteira variável de cadeia pesada do anticorpo (HCVR). Por exemplo, o ácido nucleico pode codificar uma HCVR tendo um domínio CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 (isto é, o CDR2 VH do D2E7) e um domínio CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8 (isto é, o CDR1 VH do D2E7).

Em ainda outra modalidade, a invenção provê ácidos nucleicos isolados codificando um domínio CDR3 relacionado a D2E7, por exemplo compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo de: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 e SEQ

ID NO: 35.

Em ainda outra modalidade, a invenção provê um ácido nucleico isolado codificando uma região variável de cadeia leve de anticorpos, compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 (isto é, a LCVR do D2E7). Preferivelmente, este ácido nucleico compreende a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 36, não obstante o técnico versado observe que, devido à degeneração do código genético, outras sequências de nucleotídeos podem codificar a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1. O ácido nucleico pode codificar apenas a LCVR ou pode também codificar uma região constante de cadeia leve de anticorpos, operativamente ligada à LCVR. Em uma modalidade, este ácido nucleico está em um vetor recombinante de expressão.

Em ainda outra modalidade, a invenção provê um ácido nucleico isolado codificando uma região variável de cadeia pesada de anticorpos, compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (isto é, a HCVR do D2E7). Preferivelmente, este ácido nucleico compreende a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 37, embora os técnicos versados observem que, devido à degeneração do código genético, outras sequências de nucleotídeos podem codificar a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2. O ácido nucleico pode codificar apenas a HCVR ou pode também codificar uma região constante de cadeia pesada, operativamente ligada à HCVR. Por exemplo, o ácido nucleico pode compreender uma região constante IgG1 ou IgG4. Em uma modalidade, este ácido nucleico está em um vetor recombinante de expressão.

A expressão ainda provê vetores recombinantes de expressão, codificando tanto uma cadeia pesada de anticorpos, quanto uma cadeia leve de anticorpos. Por exemplo, em uma modalidade, a invenção provê um vetor recombinante de expressão codificando:

a) uma cadeia leve de anticorpos tendo uma região variável

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 (isto é, a LCVR do D2E7); e

b) uma cadeia pesada de anticorpos tendo uma região variável compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (isto é, a HCVR do D2E7).

A invenção também provê células hospedeiras em que um ou mais dos vetores recombinantes de expressão da invenção tenha sido introduzido. De preferência, a célula hospedeira é uma célula hospedeira de mamífero, mais preferivelmente a célula hospedeira é uma célula CHO, uma célula NS0 ou uma célula COS.

Ainda mais, a invenção provê um processo de sintetização de um anticorpo recombinante humano da invenção, mediante cultivo de uma célula hospedeira da invenção em um meio de cultura adequado, até que um anticorpo recombinante humano da invenção seja sintetizado. O processo pode ainda compreender o isolamento do anticorpo recombinante humano do meio de cultura.

III. **Seleção de anticorpos recombinantes humanos**

Os anticorpos recombinantes de humanos da invenção, além dos anticorpos D2E7 ou relacionados com D2E7 aqui apresentados, podem ser isolados mediante exame de uma coleção de anticorpos recombinantes combinatórios, preferivelmente uma coleção de apresentação de fago scFv, preparada usando-se cDNAs VL e VH humanos preparados do mRNA derivado de linfócitos humanos. As metodologias para se preparar e examinas tais coleções são conhecidas na técnica. Além de comercialmente disponíveis os *kits* para gerar coleções de apresentação de fago (por exemplo, o *Recombinant Phage Antibody System* da Pharmacia, catálogo nº 27-9400-01; e o *kit* de apresentação de fago *SurfZAP*® da Stratagene, catálogo nº 240612), exemplos de processos e reagentes particularmente acessíveis para uso na geração e no exame de coleções de apresentação de anticorpos podem ser

encontrados, por exemplo, em Ladner *et al.*, Patente U.S. nº 5.233.409; Kang *et al.* Publicação PCT WO 92/18619; Dower *et al.* Publicação PCT WO 91/17271; Winter *et al.* Publicação PCT WO 92/20791; Karkland *et al.*, Publicação PCT WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicação PCT WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicação PCT WO 92/01047; Garrard *et al. et al.* Publicação PCT WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology 9*: 1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas 3*: 81-85; Huse *et al.* (1989) *Science 246*: 1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) *348*: 552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J 12*: 725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol 226*: 889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature 352*: 624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS 89*: 3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology 9*: 1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res 19*: 4133-4137; e Barbas *et al.* (1991) *PNAS 88*: 7978-7982.

Em uma modalidade preferida, para isolar anticorpos humanos com alta afinidade e uma constante baixa do índice de dissociação para hTNFα, um anticorpo anti-hTNFα de murinos, tendo alta afinidade e uma baixa constante do índice de dissociação para hTNFα (por exemplo MAK 195, o hibridoma cujo número de depósito é ECACC 87 050801), é primeiro usado para selecionar sequências de cadeia pesada e leve de humanos, tendo atividade de ligação semelhante próxima a hTNFα, usando impressão de epítopo ou seleção guiada, processos descritos em Hoogenboom *et al.*, Publicação PCT WO 93/06213. As coleções de anticorpos usadas neste processo são de preferência coleções de scFv preparadas e triadas conforme descrito em McCafferty *et al.* Publicação PCT WO 92/01047, McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) *348*: 552-554; e Griffiths *et al.*, (1993) *EMBO J 12*: 725-734. As coleções de anticorpos de scFv preferivelmente são triadas usando-se TNFα recombinante humano como o antígeno.

Uma vez os segmentos iniciais VL e VH humanos sejam selecionados, as experiências de "mistura e união", em que diferentes pares dos

segmentos VL e VH inicialmente selecionados são triados quanto à ligação de hTNFα, são realizadas para selecionar as combinações de pares VL/VH preferidas. Adicionalmente, para ainda melhorar a afinidade e/ou reduzir a constante do índice de dissociação para a ligação de hTNFα, os segmentos VL e VH do(s) par(es) VL/VH preferido(s) podem ser aleatoriamente modificados, preferivelmente dentro da região do CDR3 de VH e/ou VL, em um processo análogo ao processo de mutação somática *in vivo* responsável quanto a maturação da afinidade dos anticorpos durante uma natural resposta imune. Esta maturação da afinidade *in vitro* pode ser realizada mediante ampliação das regiões VH e VL usando-se os iniciadores do PCR complementar ao CDR3 VH ou CDR3 VL, respectivamente, cujos iniciadores foram "reforçados" com uma mistura aleatória das quatro bases de nucleotídeos em certas posições tais, que os produtos de PCR resultantes codificam os segmentos VH e VL em que as mutações aleatórias foram introduzidas nas regiões CDR3 VH e/ou VL. Estes segmentos VH e VL aleatoriamente modificados podem ser re-examinados quanto à ligação a hTNFα e sequências que apresentam alta afinidade e um baixo índice de dissociação, para que a ligação hTNFα possa ser selecionada.

As sequências de aminoácidos das cadeias pesadas e leves selecionadas dos anticorpos podem ser comparadas a sequências de aminoácidos de cadeia pesada e leve da linha germinativa. Em casos onde certos resíduos da estrutura das cadeias selecionadas de VL e/ou VH difiram da configuração da linha germinativa (por exemplo como um resultado da mutação somática dos genes de imunoglobulina usados para preparar a coleção de fago), pode ser desejável "reverter a mutação" dos resíduos alterados da estrutura dos anticorpos selecionados, à configuração da linha germinativa (isto é, modificar as sequências de aminoácidos da estrutura dos anticorpos selecionados, de modo que eles sejam os mesmos das sequências da linha germinativa de aminoácidos da estrutura). Tal "reversão da mutação" (ou

"linhagem de germinação") dos resíduos da estrutura pode ser realizada por processos padrão da biologia molecular, mediante introdução de mutações específicas (por exemplo, mutagênese dirigida ao sítio; mutagênese mediada por PCR, e outras).

Em seguida à triagem e isolamento de um anticorpo anti-hTNFα da invenção a partir de uma coleção de apresentação da imunoglobulina recombinante, o ácido nucleico codificando o anticorpo selecionado pode ser recuperado do pacote de apresentação (por exemplo, do genoma do fago) e subclonado dentro de outros vetores de expressão mediante técnicas padrão de DNA recombinante. Se desejável, o ácido nucleico pode ser ainda manipulado para criar outras formas de anticorpos da invenção (por exemplo, ligadas a ácido nucleico codificando domínios adicionais de imunoglobulina, tais como regiões constantes adicionais). Para expressar um anticorpo humano recombinante isolado por triagem de uma coleção combinatória, o DNA codificando o anticorpo é clonado dentro de um vetor recombinante de expressão e introduzido em células de um hospedeiro mamífero, como descrito em mais detalhes na Seção II acima.

IV **Composições farmacêuticas e administração farmacêutica**

Os anticorpos e as porções de anticorpos da invenção podem ser incorporados nas composições farmacêuticas adequadas para administração a um indivíduo. Tipicamente, a composição farmacêutica compreende um anticorpo ou porção do anticorpo da invenção, e um portador farmaceuticamente aceitável. Como aqui empregado, "portador farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento da absorção, e outros que sejam fisiologicamente compatíveis. Exemplos de portadores farmaceuticamente aceitáveis incluem um ou mais dentre água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, dextrose, glicerol, etanol e outros, bem como as combinações destes. Em

muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo açúcares, poliálcoois como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio, na composição. Portadores farmaceuticamente aceitáveis podem ainda compreender quantidades secundárias de substâncias auxiliares, tais como agentes umectantes ou emulsificantes, preservativos ou tampões, que intensifiquem a vida de prateleira ou a eficácia do anticorpo ou da porção de anticorpo.

As composições desta invenção podem estar em uma variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, formas de dosagem líquida, semi-sólida e sólida, tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e infusíveis), dispersões ou suspensões, tabletes, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende da modalidade pretendida de administração e da aplicação terapêutica. Composições típicas preferidas são na forma de soluções injetáveis e infusíveis, tais como composições semelhantes àquelas usadas para imunização passiva de seres humanos com outros anticorpos. A modalidade preferida de administração é a parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular). Em uma modalidade preferida, o anticorpo é administrado por infusão ou injeção intravenosa. Em outra modalidade preferida, o anticorpo é administrado por injeção intramuscular ou subcutânea.

As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e de armazenagem. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma, ou como outra estrutura regular adequada em alta concentração do medicamento. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação do composto ativo (isto é, o anticorpo ou a porção do anticorpo) na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ingrediente ou uma combinação de ingredientes, enumerados acima, conforme necessário, seguido por esterilização por filtragem. Em geral, as dispersões são preparadas por incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contenha um meio

básico de dispersão e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os processos preferidos de preparação são a secagem a vácuo e a secagem por congelamento, que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejável de uma sua solução previamente esterilizado por filtragem. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão, e pelo uso de tensoativos. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser realizada por inclusão na composição de um agente que retarde a absorção, por exemplo sais de monoestearato e gelatina.

Os anticorpos e as porções de anticorpos da presente invenção podem ser administrados por uma variedade de processos conhecidos da arte, não obstante, para muitas aplicações terapêuticas, a via/modalidade preferidas de administração sejam a injeção intravenosa ou a infusão. Como será observado pelo técnico experiente, a via e/ou modalidade de administração variará na dependência dos resultados desejados. Em certas modalidades, o composto ativo pode ser preparado com um portador que o proteja contra a rápida liberação, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastros transdérmicos e sistemas microencapsulados de liberação. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser usados, tais como acetato vinílico de etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos processos para a preparação de tais formulações são patenteados ou em geral conhecidos daqueles experientes nesta ciência. Ver, por exemplo, *Sustained and Contolled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

Em certas modalidades, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção podem ser oralmente administrados, por exemplo com um diluente inerte ou um portador assimilável pela alimentação. O composto (e outros

ingredientes, se desejável) pode também ser incluído em uma cápsula de gelatina de cobertura externa dura ou macia, comprimido em tabletes ou incorporado diretamente na dieta do indivíduo. Para administração oral, os compostos podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de tabletes deglutíveis, tabletes bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, hóstias, e outros. Para administrar um composto da invenção por administração diferente da parenteral, pode ser necessário revesti-lo, ou co-administrá-lo, com um material para evitar sua inativação.

Os compostos suplementares ativos também podem ser incorporados nas composições. Em certas modalidades, um anticorpo ou porção do anticorpo da invenção são co-formulados e/ou co-administrados com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, que sejam úteis para tratar os distúrbios em que a atividade do TNFα seja prejudicial. Por exemplo, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção, anti-hTNFα, podem ser co-formulados e/ou co-administrados com um ou mais anticorpos adicionais que se liguem a outros alvos (por exemplo, anticorpos que ligam outras citocinas ou que ligam moléculas superficiais das células), uma ou mais citocinas, receptor de TNFα solúvel (ver, por exemplo, a Publicação PCT WO 94/06476) e/ou um ou mais agentes químicos que inibam a produção ou a atividade do hTNFα (tais como derivados de cicloexano-ilideno, como descrito na Publicação PCT WO 93/19751). Além do mais, um ou mais anticorpos da invenção podem ser usados em combinação com dois ou mais dos agentes terapêuticos acima citados. Tais terapias de combinação pode vantajosamente utilizar menores dosagens dos agentes terapêuticos administrados, assim evitando possíveis toxicidades ou complicações associadas com as várias monoterapias.

Exemplos não limitativos dos agentes terapêuticos para artrite reumatóide, com os quais um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção podem ser combinados, incluem os seguintes: medicamento(s)

antiinflamatório(s) não esteróide(s) (NSAIDs); medicamento(s) anti-inflamatório(s) supressivo(s) de citocina (CSAIDs); CDP-571/BAY-10-3356 (anticorpo humanizado anti-TNFα; Celltech/Bayer); cA2 (anticorpo quimérico anti-TNFα; Centocor); 75 kgTNFR-IgG (receptor TNF de 75 kD-proteína de fusão IgG; Immunex; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. *37*, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. *44*, 235A); 55 kdTNFR-IgG (receptor TNF de 55 kD-proteína de fusão IgG; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9,1/SB 210396 (anticorpo anti-CD4 primatizado não depletivo; IDEC/SmithKline; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1995) Vol. *38*, S185); DAB 486-IL-2 e/ou DAB 389-IL-2 (proteínas de fusão IL-2; Seragen; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol. *36*, 1223); Anti-Tac (anti-IL-2Rα humanizado; Laboratórios de Modelos de Proteínas/Roche); IL-4 (citocina antiinflamatória; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citocina antiinflamatória; DNAX/Schering); agonistas IL-4; IL-10 e/ou IL4 (por exemplo, anticorpos agonistas); IL-1RA (antagonista receptor IL-1; Synergen/Amgen); TNF-bp/s-TNFR (proteína de ligação de TNF solúvel; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, N° 9 (suplemento), S284); *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* (1995) Vol. *268*, pp. 37-42); R973401 (inibidor de fosfodiesterase tipo IV; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento) S282); MK-966 (Inibidor COX-2; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento) S81); Iloprost (ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento), S82); metotrexato; talidomida (ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento), S282) e medicamentos relacionados com talidomida (por exemplo Celgen); leflunomida (antiinflamatório e inibidor de citocina; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento), S131; *Inflammation Research* (1996) Vol. *45*, pp. 103-107); ácido tranexâmico (inibidor da ativação plaminogênica; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.

39, Nº 9 (suplemento), S284); T-614 (inibidor de citocina; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento, S282); prostaglandina E1 (ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento), S282); Tenidap (medicamento antiinflamatório não esteróide; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento), S280); Naproxeno (medicamento antiinflamatório não esteróide; ver, por exemplo, *Neuro Report* (1996) Vol. *7*, pp. 1209-1213); Meloxicam (medicamento antiinflamatório não esteróide); Ibuprofeno (medicamento antiinflamatório não esteróide); Piroxicam (medicamento antiinflamatório não esteróide); Diclofenac (medicamento antiinflamatório não esteróide); Indometacina (medicamento antiinflamatório não esteróide); Sulfassalazina (ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento), S281); Azatioprina (ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento), S281); inibidor ICE (inibidor da enzima de conversão da enzima interleucina-1-β); zap-70 e/ou inibidor lck (inibidor da tirosina cinase zap-70 ou lck); inibidor VEGF e/ou inibidor VEGF-R (inibidor do fator de crescimento da célula endotelial vascular ou receptor do fator de crescimento da célula endotelial vascular; inibidores de angiogênese); medicamentos antiinflamatórios corticosteróides (por exemplo, SB203580); inibidores TNF-convertase; anticorpos anti-IL-12; interleucina-11 (ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento), S296); interleucina-13 (ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento), S308); inibidores de interleucina-17 (ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. *39*, Nº 9 (suplemento), S120); ouro; penicilamina; cloroquina; hidroxicloroquina; clorambucil; ciclofosfamida; cicloesporina; irradiação linfóide total; globulina anti-timócito; anticorpos anti-CD4; toxinas CD5; peptídeos e colágeno administrados oralmente; dissódio lobenzarit; Agentes de Regulação da Citocina (CRAs) HP228 e HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligodeoxinucleotídeos de fosforotioato anti-sentido

ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 de complemento solúvel (TP10; T Cell Sciences, Inc.); predinisona; orgoteína; polissulfato de glicosaminoglicano; minociclina; anticorpos anti-IL2R; lipídeos marinhos e botânicos (ácidos graxos de peixes e de sementes de plantas; ver, por exemplo, DeLuca *et al.* (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am. 21*: 759-777); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenâmico; ácido flufenâmico; globulina imune intravenosa; zileuton, ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilose (terafectina); cladribina (2-clorodeoxiadenosina); e azaribina.

Exemplos não limitativos de agentes terapêuticos para doença inflamatória do intestino, com os quais um anticorpo, ou porção do anticorpo, da invenção podem ser combinados, incluem os seguintes: budenosida; fator de crescimento epdérmico; corticosteróides; ciclosporina, sulfassalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inibidores de lipoxigenase; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inibidores de tromboxano; antagonistas receptores IL-1; anticorpos monoclonais anti-IL-1-β; anticorpos monoclonais anti-IL-6; fatores de crescimento; inibidores de elastase; compostos de piridinil-imidazol; CDP-571/BAY-10-3356 (anticorpo anti-TNFα humanizado; Celltech/Bayer); cA2 (anticorpo quimérico anti-TNFα; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (receptor TNF 75 kD-proteína de fusão IgG; Immunex; ver por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. *37*, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. *44*, 235A); 55 kdTNFR-IgG (receptor TNF 55 kD-proteína de fusão IgG; Hoffmann-LaRoche); interleucina-10 (SCH 52000; Schering Plough); agonistas IL-4; IL-10 e/ou IL-4 (por exemplo, anticorpos agonistas); interleucina-11; pró-medicamentos de prednisolona, dexametasona ou budesonida conjugados com glicuronídeo ou dextrana; oligodeoxinucleotídeos de fosforotioato antissentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 de complemento solúvel (TP 10; T Cell Sciences, Inc.); mesalazina de liberação lenta; metotrexato; antagonistas do

Fator de Ativação de Plaquetas (PAF); ciprofloxacina; e lignocaína.

Exemplos não limitativos de agentes terapêuticos para esclerose múltipla, com os quais um anticorpo, ou porção de anticorpos, da invenção podem ser combinados, incluem os seguintes: corticosteróides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; cicloesporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferon-β 1a (Avonex™; Biogen); interferon-β 1b (βseron™; Chiron/Berlex); copolímero 1 (Cop-1; Copaxone™; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxigênio hiperbárico; imunoglobulina intravenosa; clabribina; CDP-571/BAY-10-3356 (anticorpo anti-TNFα humanizado; Celltech/Bayer); cA2 (anticorpo quimérico anti-TNFα; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (receptor TNF 75 kD-proteína de fusão IgG; Immunex; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. *37*, S295); *J. Invest. Med.* (1996) Vol. *44*, 235A); 55 kdTNFR-IgG (receptor TNF 55 kD-proteína de fusão IgG; Hoffmann-LaRoche); agonistas IL-10; IL-4; e IL-10 e/ou IL-4 (por exemplo, anticorpos agonistas).

Exemplos não limitativos de agentes terapêuticos para a sépsis, com os quais um anticorpo, ou porção de anticorpo, da invenção, podem ser combinados, incluem os seguintes: soluções salinas hipertônicas; antibióticos; gamaglobulina intravenosa; hemofiltração contínua; carbapenemas (por exemplo, meropenama); antagonistas de citocinas, tais como TNFα, IL-1-β, IL-6 e/ou IL-8; CDP-571/BAY-10-3356 (anticorpo anti-TNFα humanizado; Celltech/Bayer); cA2 (anticorpo quimérico anti-TNFα; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (receptor TNF 75 kD-proteína de fusão IgG; Immunex; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. *37*, S295); *J. Invest. Med.* (1996) Vol. *44*, 235A); 55 kdTNFR-IgG (receptor TNF 55 kD-proteína de fusão IgG; Hoffmann-LaRoche); Agentes de regulação da citocina (CRAs) HP228 e HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); SK&F 107647 (peptídeo de molecular baixo; SmithKline Beecham); guanil-hidrazona CNI-1493 (Picower Institute); Inibidor da via do fator tecido (TFPI; Chiron); PHP (hemoglobina

quimicamente modificada; APEX Bioscience); quelantes e quelatos de ferro, incluindo o complexo ácido dietilenotriamina pentaacético - ferro (III) (DTPA ferro (III); Molichem Medicines); lisofilina (metilxantina sintética de molécula pequena; Cell Therapeutics, Inc.); PGG-glicano (β-1,3-glicano; Alpha-β Technology); apolipoproteína A-1 reconstituída com lipídeos; ácidos quirais hidroxâmicos (antibacterianos sintéticos que inibem a biossíntese do lipídeo A); anticorpos anti-endotoxinas; E5531 (antagonista sintético do lipídeo A; Eisai America, Inc.); $rBPI_{21}$ (fragmento recombinante N-terminal de bactericida/proteína de aumento da permeabilidade humano); e peptídeos sintéticos anti-endotoxinas (SAEP; BiosYnth Research Laboratories);

Exemplos não limitativos de agentes terapêuticos para a síndrome da angústia respiratória do adulto (ARDS), com os quais um anticorpo, ou porção de anticorpo, da invenção, podem ser combinados, incluem os seguintes: anticorpos anti-IL-8; terapia de substituição do tensoativo; CDP-571/BAY-10-3356 (anticorpo anti-TNFα humanizado; Celltech/Bayer); cA2 (anticorpo quimérico anti-TNFα; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (receptor TNF 75 kD-proteína de fusão IgG; Immunex; ver, por exemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. *37*, S295); *J. Invest. Med.* (1996) Vol. *44*, 235A); e 55 kdTNFR-IgG (receptor TNF 55 kD-proteína de fusão IgG; Hoffmann-LaRoche).

O uso dos anticorpos, ou porções de anticorpos, da invenção, em combinação com outros agentes terapêuticos, ainda é discutido na subseção IV.

As composições farmacêuticas da invenção podem incluir uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para se obter o desejado resultado terapêutico. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou porção de anticorpo

pode variar de acordo com fatores tais como o estado da doença, a idade, o sexo e o peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo ou porção de anticorpo de eliciar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do anticorpo ou porção do anticorpo são excedidos em importância pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para se obter o desejado resultado profilático. Tipicamente, uma vez que uma dose profilática seja usada em indivíduos antes ou em um estagio precoce da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menor do que a quantidade terapeuticamente eficaz.

Os regimes de dosagem podem ser ajustados para prover a resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profilática). Por exemplo, um bolo único pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas através do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada, conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma unitária de dosagem para facilidade de administração e uniformidade da dosagem. A forma unitária de dosagem, como aqui usada, se refere a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos mamíferos a serem tratados, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada do composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com o portador farmacêutico requerido. A especificação quanto às formas unitárias de dosagem da invenção é ditada pelas, e diretamente dependente das (a) características únicas do composto ativo e do efeito específico terapêutico ou profilático a ser obtido, e (b) limitações inerentes na arte para compor um tal composto ativo para o tratamento da sensibilidade nos indivíduos.

Um exemplo de faixa não limitativa para uma quantidade

terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção, é de 0,1 a 20 mg/kg, mais preferivelmente de 1 a 10 mg/kg. Deve-se observar que os valores da dosagem podem variar com o tipo e gravidade das condições a serem aliviadas. Deve ficar ainda entendido que, para qualquer indivíduo particular, os regimes específicos de dosagem devem ser ajustados através do tempo, de acordo com a necessidade individual e com o julgamento profissional da pessoa que estiver administrando ou supervisionando a administração das composições, e que as faixas de dosagem aqui apresentadas são apenas exemplos, e não se pretende limitar o escopo ou a prática da composição reivindicada.

IV. **Usos dos anticorpos da invenção**

Dada sua capacidade para ligar-se a hTNFα, os anticorpos anti-hTNFα, ou suas porções, da invenção, podem ser usados para detectar hTNFα (por exemplo, em uma amostra biológica, tal como soro ou plasma), usando-se um imunoensaio convencional, tal como uma análise imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), uma radioimunoanálise (RIA) ou imunoistoquímica em tecidos. A invenção provê um processo para detectar hTNFα em uma amostra biológica compreendendo colocar em contato uma amostra biológica com um anticorpo, ou porção de anticorpo, da invenção, e detectar, ou o anticorpo (ou porção de anticorpo) fixado a hTNFα, ou o anticorpo (ou porção de anticorpo) não fixado, para dessa forma detectar o hTNFα na amostra biológica. O anticorpo é direta ou indiretamente rotulado com uma substância detectável, para facilitar a detecção ou o anticorpo fixado ou não fixado. Substâncias detectáveis adequadas incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes e materiais radioativos. Exemplos de enzimas adequadas incluem a peroxidase da raiz forte, a fosfatase alcalina, a β-galactosidase, ou a acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem a umbeliferona, a

fluoresceína, o isotiocianato de fluoresceína, a rodamina, a fluoresceína diclorotriazinilamina, o cloreto de dansil ou a ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui o luminol; e exemplos de material radioativo adequado incluem ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S ou ^{3}H.

Alternativa para rotular o anticorpo, o hTNFα pode ser ensaiado em fluidos biológicos por um imunoensaio de competição, utilizando padrões de rhTNFα rotulados com uma substância detectável e um anticorpo anti-hTNFα não rotulado. Neste ensaio, a amostra biológica, os padrões de rhTNFα rotulados e o anticorpo anti-hTNFα são combinados e a quantidade de padrão rhTNFα rotulado fixada ao anticorpo não rotulado é determinada. A quantidade de hTNFα na amostra biológica é inversamente proporcional à quantidade do padrão de rhTNFα rotulado fixado ao anticorpo anti-hTNFα.

Um anticorpo D2E7 da invenção também pode ser usado para detectar TNFα's de outras espécies que não os seres humanos, em particular TNFα's de primatas (por exemplo chimpanzé, babuíno, sagüí, *cynomolgus* e reso), de porco e de camundongo, uma vez que o D2E7 pode ligar-se a cada um destes TNFα's (ainda discutido no Exemplo 4, subseção E).

Os anticorpos e porções de anticorpos da invenção são capazes de neutralizar a atividade do hTNFα, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ver Exemplo 4). Além disso, pelo menos alguns dos anticorpos da invenção, tais como o D2E7, podem neutralizar a atividade do TNFα de outras espécies. Consequentemente, os anticorpos e porções de anticorpos da invenção podem ser usados para inibir a atividade do TNFα, por exemplo em uma cultura celular contendo hTNFα, em indivíduos humanos ou em outros indivíduos mamíferos tendo TNFα's com os quais um anticorpo da invenção reaja por cruzamento (por exemplo chimpanzé, babuíno, sagüí, *cynomolgus* e reso, porco ou camundongo). Em uma modalidade, a invenção provê um processo para inibir a atividade do TNFα, compreendendo fazer contato do TNFα com um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção, de modo tal que a atividade do

TNFα seja inibida. De preferência, o TNFα é TNFα humano. Por exemplo, em uma cultura celular contendo, ou que se suspeite conter, hTNFα, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção pode ser adicionado ao meio de cultura, para inibir a atividade do hTNFα na cultura.

Em outra modalidade, a invenção provê um processo para inibir a atividade do TNFα em um indivíduo sofrendo de um distúrbio em que a atividade do TNFα seja prejudicial. O TNFα tem sido implicado na fisiopatologia de uma ampla variedade de distúrbios (ver, por exemplo, Moeller, A. *et al.* (1990) *Cytokine 2*: 162-169; Patente U.S. 5.231.024 a Moeller *et al.*; Publicação da Patente Européia 260 610 B1 por Moeller, A.). A invenção provê processos quanto à atividade em um indivíduo sofrendo de um tal distúrbio, os quais compreendem a administração ao indivíduo de um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção, de tal forma que a atividade do TNFα no indivíduo seja inibida. De preferência, o TNFα é TNFα humano, e o indivíduo é um ser humano. Alternativamente, o indivíduo pode ser um mamífero expressando um TNFα com o qual o anticorpo da invenção tenha reação cruzada. Ainda mais, o indivíduo pode ser um mamífero em que tenha sido introduzido hTNFα (por exemplo, por administração de hTNFα ou por expressão de um transgene de hTNFα). Um anticorpo da invenção pode ser administrado a um ser humano com propósitos terapêuticos (ainda discutido abaixo). Além disso, um anticorpo da invenção pode ser administrado a um mamífero não humano expressando um TNFα com o qual o anticorpo tenha reação cruzada (por exemplo, um primata, um porco ou um camundongo) para finalidades veterinárias ou como um modelo animal de doença humana. Com referência a este último, tais modelos animais podem ser utilizados para avaliação da eficácia terapêutica dos anticorpos da invenção (por exemplo, teste de dosagens e cursos de tempo de administração).

Como aqui empregada, a expressão "um distúrbio em que a atividade do TNFα seja prejudicial" deve ser entendida incluindo doenças e

outros distúrbios em que a presença de TNFα, em um indivíduo sofrendo do distúrbio, se tenha apresentado, ou que se suspeite seja, ou o responsável pela fisiopatologia do distúrbio, ou um fator que contribua para uma piora do distúrbio. Consequentemente, um distúrbio em que a atividade do TNFα seja prejudicial, é um distúrbio em que a inibição da atividade do TNFα seja esperada para aliviar os sintomas e/ou a progressão do distúrbio. Tais distúrbios podem ser evidenciados, por exemplo, por um aumenta na concentração de TNFα em um fluido biológico de um indivíduo sofrendo do distúrbio (por exemplo, um aumento na concentração de TNFα no soro, no plasma, no fluido sinovial, etc. do indivíduo), que pode ser detectado, por exemplo, usando-se um anticorpo anti-TNFα, como descrito acima. Existem numerosos exemplos de distúrbios em que a atividade do TNFα é prejudicial. O uso dos anticorpos e porções de anticorpo da invenção no tratamento de distúrbios específicos, é discutido mais abaixo:

A. SÉPSIS

O fatos de necrose tumoral tem um papel estabelecido na fisiopatologia do sépsis, com efeitos biológicos que incluem a hipotensão, a supressão miocárdica, a síndrome do derrame vascular, a necrose de órgão, estímulo da liberação de mediadores tóxicos secundários e ativação da série de coagulação (ver, por exemplo, Moeller, A. *et al.* (1990) *Cytokine 2*: 162-269; Patente U.S. 5.231.024 a Moeller *et al.*; Publicação da Patente Européia 260 610 B1 por Moeller, A.; Tracey, K. J. e Cerami A. (1994) *Annu. Rev. Med. 45*: 491-503; Russell, D. e Thompson, R. C. (1993) *Curr. Opin. Biotech. 4*: 714-721). Consequentemente, os anticorpos humanos, e as porções de anticorpos, da invenção, podem ser usados para tratar da sépsis em qualquer de seus cenários clínicos, incluindo o choque séptico, o choque endotóxico, a sépsis gram-negativa e a síndrome de choque tóxico.

Além disso, para tratar a sépsis, um anticorpo anti-hTNFα, ou porção do anticorpo, da invenção, podem ser co-administrados com um ou

mais agentes terapêuticos adicionais, que podem ainda aliviar a sépsis, tal como um inibidor de interleucina-1 (como aquele descrito nas Publicações PCT WO 92/16221 e WO 92/17583), a interleucina-6 de citocina (ver, por exemplo, a Publicação PCR WO 93/11793) ou um antagonista do fator de ativação de plaquetas (ver, por exemplo, a Publicação do Pedido de Patente Européia EP 374 510). Outras terapias de combinação para o tratamento da sépsis são discutidas ainda na subseção III.

Adicionalmente, em uma modalidade preferida, um anticorpo anti-TNFα ou porção de anticorpo da invenção, é administrada a um indivíduo humano dentro de um subgrupo de pacientes de sépsis, tendo uma concentração de soro ou plasma de IL-6 acima de 500 pg/ml e, mais preferivelmente, 1000 pg/ml, no tempo do tratamento (ver Publicação PCT WO 95/20978 por Daum, L. *et al.*).

B. DOENÇAS AUTOIMUNES

O fator de necrose tumoral tem sido implicado como desempenhando um papel na fisiopatologia de uma variedade de doenças autoimune. Por exemplo, o TNFα tem sido implicado na ativação da inflamação dos tecidos, causando a destruição das juntas em artrite reumatóide (ver, por exemplo, Moeller, A *et al.* (1990) *Cytokine 2*: 162-169; Patente U.S. 5.231.024 para Moeller *et al.*; Publicação da Patente Européia 260 610 B1 por Moeller, A.; Tracey e Cerami, acima; Arend, W. P. e Dayer, J-M. (1995) *Arth. Rheum. 38*: 151-160; Fava, R. A. *et al.* (1993) *Clin. Exp. Immunol. 94*: 261-266). O TNFα também tem sido implicado na promoção da morte de células das ilhotas e na mediação da resistência à insulina no diabete (ver, por exemplo, Tracey e Cerami, acima; Publicação PCT WO 94/08609). O TNFα também tem sido implicado em mediar a citotoxicidade a oligodendrócitos e indução de placas inflamatórias em esclerose múltipla (ver, por exemplo, Tracey e Cerami, supra). Os anticorpos anti-hTNFα de murinos quiméricos e humanizados, têm sido submetidos a teste clínico para tratamento da artrite

reumatóide (ver, por exemplo, Elliott, M. J., *et al.* (1994) *Lancet 344*: 1125-1127/ Elliot, M. J. *et al.* (1994) *Lancet 344*: 1105-1110; Rankin, E. C. *et al.* (1995) *Br. J. Rheumatol. 34*: 334-342).

Os anticorpos humanos, e as porções de anticorpos, da invenção, podem ser usados para tratar de doenças autoimunes, em particular aqueles associadas com inflamação, incluindo a artrite reumatóide, a espondilite reumatóide, a osteoartrite e a artrite gotosa, a alergia, a esclerose múltipla, o diabete autoimune, a uveíte autoimune e a síndrome nefrótica. Tipicamente, o anticorpo, ou porção do anticorpo, é administrado sistematicamente, não obstante para certos distúrbios a administração local do anticorpo ou porção do anticorpo em um sítio de inflamação possa ser benéfica (por exemplo, a administração local nas juntas na artrite reumatóide ou a aplicação tópica em úlceras diabéticas, sozinha ou em combinação com um derivado ciclo-hexano-ilideno, como descrito na Publicação PCT WO 93/19751). Um anticorpo, ou porção de anticorpo, da invenção também podem ser administrados com um ou mais agentes terapêuticos adicionais úteis no tratamento de doenças autoimunes, como ainda discutido na subseção III.

C. DOENÇAS INFECCIOSAS

O fator de necrose tumoral em sido implicado na mediação dos efeitos biológicos observados em uma variedade de doenças infecciosas. Por exemplo, o TNFα tem sido implicado em mediar a inflamação do cérebro e na trombose capilar e na infartação na malária. O TNFα também tem sido implicado em mediar a inflamação do cérebro, induzindo a colapso da barreira hematoencefálica, deflagrando a síndrome do choque séptico e ativando a infartação venosa na meningite. O TNFα também tem sido implicado em induzir a caquexia, estimulando a proliferação viral e mediando a lesão do sistema nervoso central na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Consequentemente, os anticorpos, e as porções de anticorpos, da invenção, podem ser usados no tratamento de doenças infecciosas, incluindo a meningite

bacteriana (ver, por exemplo, a Publicação do Pedido de Patente Européia EP 585 705), a malária cerebral, a AIDS e o complexo relacionado com a AIDS (ARC) (ver, por exemplo, a Publicação do Pedido de Patente Européia EP 230 574), bem como a infecção por citomegalovírus secundária a transplantes (ver, por exemplo, Fietze, E., *et al.* (1994) *Transplantation 58*: 675-680). Os anticorpos, e as porções de anticorpos, da invenção, também podem ser usados para aliviar os sintomas associados com doenças infecciosas, incluindo a febre e mialgias devidas a infecção (tais como a influenza) e caquexia secundária a infecção (por exemplo, secundária a AIDS ou a ARC).

D. TRANSPLANTE

O fator de necrose tumoral tem sido implicado como um mediador chave da rejeição de aloenxerto e enxerto versus doença hospedeira (GVHD), e em mediar uma reação adversa que foi observado quando o anticorpo OKT3 de rato, dirigido contra o complexo CD3 receptor celular T, foi usado para inibir a rejeição de transplantes renais (ver, por exemplo, Eason, J. D., *et al.* (1995) *Transplantation 59*: 300-305; Suthanthiran, M. e Strom, T. B. (1994) *New Engl. J. Med. 331*: 365-375). Em consequência, os anticorpos, e as porções de anticorpos, da invenção, podem ser usados para inibir a rejeição de transplantes, incluindo rejeições de aloenxertos e xenoenxertos, e para inibir GVHD. Embora o anticorpo ou porção de anticorpo possam ser usados sozinhos, mais preferivelmente ele é usado em combinação com um ou mais de outros agentes que inibem a resposta imune contra o aloenxerto ou inibem GVHD. Por exemplo, em uma modalidade, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção são usados em combinação com OKT3 para inibir as reações induzidas por OKT3. Em outra modalidade, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção são usados em combinação com um ou mais anticorpos direcionados a outros alvos envolvidos em regular as respostas imune, tais como as moléculas CD25 de superfície celular (receptor-α interleucina-2), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80/(B7-1)

e/ou CD86 (B7-2). Em outra modalidade ainda, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção são ousados em combinação com um ou mais agentes imunossupressivos gerais, tais como ciclosporina A ou FK506.

E. MALIGNIDADE

O fator de necrose tumoral tem sido implicado em induzir a caquexia, estimulando o crescimento tumoral, intensificando o potencial metastático e mediando a citotoxicidade nas malignidades. Em consequência, os anticorpos, e porções de anticorpo, da invenção, podem ser usados no tratamento de malignidades, para inibir o crescimento tumoral ou a metástase e/ou para aliviar a caquexia secundária à malignidade. O anticorpo, ou porção de anticorpo, pode ser administrado sistêmica ou localmente ao sítio do tumor.

F. DISTÚRBIOS PULMONARES

O fator de necrose tumoral tem sido implicado na fisiopatologia da síndrome da angústia respiratória do adulto (ARDS), incluindo o estímulo da ativação de leucócitos endoteliais, dirigindo a citotoxicidade a pneumócitos e induzindo à síndrome do derrame vascular. Consequentemente, os anticorpos, e as porções de anticorpos, da invenção, podem ser usados para tratar de vários distúrbios pulmonares, incluindo a síndrome da angústia respiratória do adulto (ver, por exemplo, a Publicação PCT WO 91/04054), pulmão de choque, doença inflamatória pulmonar crônica, sarcoidose pulmonar, fibrose e silicose pulmonares. O anticorpo, ou porção de anticorpo, pode ser administrado sistêmica ou localmente à superfície dos pulmões, por exemplo como um aerossol. Um anticorpo, ou porção do anticorpo, da invenção, também pode ser administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais úteis no tratamento de distúrbios pulmonares, como ainda discutido na subseção III.

G. DISTÚRBIOS INTESTINAIS

O fator da necrose tumoral tem sido implicado na fisiopatologia de distúrbios inflamatórios dos intestinos (ver, por exemplo, Tracy, K. J. *et al.*

(1986) *Science 234*: 470-474; Sun, X-M. *et al.* (1988) *J. Clin. Invest. 81*: 1328-1331; MacDonald, T. T. *et al.* (1990) *Clin. Exp. Immunol. 81*: 301-305). Os anticorpos quiméricos anti-hTNFα de murinos têm sido submetidos a testes clínicos para tratamento da doença de Crohn (van Dullemen, H. M. *et al.* (1995) *Gastroenterology 109*: 129-135). Os anticorpos humanos, e porções de anticorpos, da invenção, também podem ser usados para tratar distúrbios intestinais, tais como doença idiopática inflamatória dos intestinos, que inclui duas síndromes, a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Um anticorpo, ou porção de anticorpo, da invenção, também pode ser administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais úteis no tratamento de distúrbios intestinais, como examinado ainda na subseção III.

H. DISTÚRBIOS CARDÍACOS

Os anticorpos, e porções de anticorpos, da invenção, também podem ser usados para tratar vários distúrbios cardíacos, incluindo a isquemia do coração (ver, por exemplo, a Publicação do Pedido de Patente Européia EP 453 898) e a insuficiência cardíaca (fraqueza do músculo cardíaco) (ver, por exemplo, a Publicação PCT WO 94/20139).

I. OUTROS

Os anticorpos, e as porções de anticorpos, da invenção, também podem ser usados para tratar de vários outros distúrbios, em que a atividade do TNFα é prejudicial. Exemplos de outras doenças e distúrbios, em que a atividade do TNFα tem sido implicada na fisiopatologia, e que deste modo podem ser tratadas usando-se um anticorpo, ou porção de anticorpo, da invenção, incluem os distúrbios inflamatórios dos ossos e a doença de reabsorção óssea (ver, por exemplo, Bertolini, D. R. *et al.* (1986) *Nature 319*: 516-518; Konig, A. *et al.* (1988) *J. Bone Miner. Res. 3*: 621-627; Lerner, U. H. e Ohlin, A. (1993) *J. Bone Miner. Res. 8*: 147-155; e Shankar, G. e Stern, P. H. (1993) *Bone 14*: 871-876), hepatite, incluindo hepatite alcoólica (ver, por exemplo, McClain, C. J. e Cohen, D. A. (1989) *Hepatology 9*: 349-351; Felver,

M. E. *et al.* (1990) *Alcohol. Clin. Exp. Res. 14*: 255-259; e Hansen, J. *et al.* (1994) *Hepatology 20*: 461-474), hepatite viral (Sheron, N. *et al.* (1991) *J. Hepatol. 12*: 241-245; e Hussain, M. J. *et al.* (1994) *J. Clin. Pathol. 47*: 1112-1115), e hepatite fulminante; distúrbios de coagulação (ver, por exemplo, van der Poll, T. *et al.* (1990) *N. Engl. J. Med. 322*: 1622-1627; e van der Poll, T. *et al.* (1991) *Prog. Clin. Biol. Res. 367*: 55-60), queimaduras (ver, por exemplo, Giroir, B. P. *et al.* (1994) *Am. J. Physiol. 267*: H118-124; e Liu, X. S. *et al.* (1994) *Burns 20*: 40-44), lesão por reperfusão (ver, por exemplo, Scales, W. E. *et al.* (1994) *Am. J. Physiol. 267*: G1122-1127; Serrick, C. *et al.* (1994) *Transplantation 58*: 1158-1162; e Yao, Y. M. *et al.* (1995) *Resuscitation 29*: 157-168), formação de quelóides (ver, por exemplo, McCauley, R. L. *et al.* (1992) *J. Clin. Immunol. 12*: 300-308), formação do tecido de cicatrizes; pirexia; doença periodontal; obesidade e toxicidade da radiação.

Esta invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos, que não devem ser interpretados como limitativos. Os conteúdos de todas as referências, patentes e pedidos de patentes publicados citados na totalidade deste relatório descritivo, são aqui incorporados por referência.

EXEMPLO 1: ANÁLISE CINÉTICA DA LIGAÇÃO DE ANTICORPOS HUMANOS A hTNFα

A interações de ligação de tempo real entre o ligando (TNFα recombinante biotinilado humano (rhTNFα) imobilizado em uma matriz biossensora) e o analisado (anticorpos em solução), foram medidas por ressonância de plásmon superficial (SPR), usando-se o sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). O sistema utiliza as propriedades óticas do SPR para detectar alterações em concentrações proteínicas dentro de uma matriz biossensora de dextrana. As proteínas são covalentemente fixadas à matriz de dextrana, em concentrações conhecidas. Os anticorpos são injetados através da matriz de dextrana, e a ligação específica entre os anticorpos injetados e ligando imobilizado, resulta em uma concentração proteínica da

matriz aumentada e na modificação resultante no sinal da SPR. Estas modificações no sinal da SPR são registradas como unidades de ressonância (RU) e são apresentadas com respeito a tempo ao longo do eixo dos y de um sensorgrama.

Para facilitar a imobilização do rhTNFα biotinilado na matriz biossensora, a estreptavidina é covalentemente ligada através de grupos de amina livre à matriz de dextrana, mediante primeiramente ativação dos grupos carboxílicos na matriz com N-hidroxissuccinimida (NHS) 100 mM e cloridreto de N-etil-N'-(3-dietilaminopropil) carbodiimida (EDC). A seguir, a estreptavidina é injetada através da matriz ativada. Trinta e cinco microlitros de estreptavidina (25 µg/ml), diluídos em acetato de sódio, pH 4,5, são injetados através do biossensor ativado e as aminas livres na proteína são fixadas diretamente aos grupos carboxílicos ativados. Os ésteres EDC da matriz não reacionada são desativados por uma injeção de etanolamina 1 M. Pedaços do biossensor acoplados à estreptavidina também são comercialmente disponíveis (Pharmacia BR-1000-16, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ).

O rhTNF biotinilado foi preparado primeiramente dissolvendo-se 5,0 mg de éster N-hidroxissuccinimida de ácido (D-biotinil-e-aminocapróico de biotina; Boehringer Mannheim Cat. 1008 960) em 500 µl de dimetilsulfóxido, para produzir 10 mg/ml de uma solução. Dez microlitros de biotina foram adicionados por mililitro de rhTNFα (em 2,65 mg/ml), para uma relação molar de biotina para rhTNFα de 2:1. A reação foi misturada brandamente e incubada por duas horas em temperatura ambiente no escuro. Uma coluna PD-10, Sephadex G-25M (Pharmacia Catálogo 17-0851-01) foi equilibrada com 25 ml de PBS frio e carregada com 2 ml de rhTNFα-biotina por coluna. A coluna foi eluída com 10 x 1 ml de PBS frio. As frações foram coletadas e interpretadas em OD280 (1,0 OD = 1,25 mg/ml). As frações apropriadas foram reunidas e armazenadas a -80°C até o uso. O rhTNFα biotinilado também é comercialmente disponível (R & D Systems, Catálogo

FTA00, Minneapolis, MN).

O rhTNFα biotinilado a ser imobilizado na matriz através da estreptavidina foi diluído em tampão fluente de PBS (Gibco Cat. 14190-144, Gibco BRL, Grand Island, NY), suplementado com tensoativo P20 0,05% (BIAcore) (Pharmacia BR-1000-54, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Para determinar a capacidade dos anticorpos específicos do rhTNFα, de se ligarem a rhTNFα imobilizado, um ensaio de ligação foi conduzido como segue. Alíquotas de rhTNFα biotinilado (25 nM; alíquotas de 10 µl) foram injetadas através da matriz de dextrana acoplada com estreptavidina em um índice de fluxo de 5 µl/min. Antes da injeção da proteína e imediatamente após, o tampão de PBS sozinho fluiu através de cada célula de fluxo. A diferença líquida no sinal entre a linha de base e aproximadamente 30 segundos após a conclusão da injeção de rhTNFα biotinilado foi tomada para representar o valor da ligação (aproximadamente 500 RU). A ligação direta do anticorpo específico para rhTNFα, para o rhTNFα biotinilado imobilizado, foi medida. Os anticorpos (20 µm/ml) foram diluídos em tampão fluente de PBS e 25 µl de alíquotas, foram injetados através das matrizes de proteína imobilizadas em um índice de fluxo de 5 µl/minuto. Antes da injeção do anticorpo, e imediatamente após, o tampão de PBS sozinho fluiu através de cada célula de fluxo. A diferença líquida em sinal da linha de base e o sinal após a conclusão da injeção do anticorpo foi tomada para representar o valor da ligação da amostra particular. As matrizes biossensoras foram regeneradas usando-se HCl 100 mM antes da injeção da amostra seguinte. Para determinar as constantes do índice de dissociação (K_{off}), sobre o índice (K_{on}), índice de associação (K_a) e o índice de dissociação (K_d), foi usado o software (versão 2.1) de avaliação cinética BIAcore.

Os resultados representativos da ligação do D2E7 (anticorpo de comprimento completo IgG4) ao rhTNFα biotinilado, em comparação com o MAK 195 mAb de camundongos (fragmento $F(ab')_2$), são apresentados abaixo

na Tabela 1.

TABELA 1: LIGAÇÃO DO IgG4 OU MAK 195 DO D2E7 AO rhTNFα BIOTINILADO

Anticorpo	[Ab], nM	rhTNFα, fixado, RUs	Ab, fixado, RUs	rhTNFα/Ab	K_{off}, s^{-1}, (média)
D2E7	267	373	1215	1,14	$8,45 \times 10^{-5}$
	133	420	1569	1,30	$5,42 \times 10^{-5}$
	67	434	1633	1,31	$4,75 \times 10^{-5}$
	33	450	1532	1,19	$4,46 \times 10^{-5}$
	17	460	1296	0,98	$3,47 \times 10^{-5}$
	8	486	936	0,67	$2,63 \times 10^{-5}$
	4	489	536	0,38	$2,17 \times 10^{-5}$
	2	470	244	0,18	$3,68 \times 10^{-5}$
					$(4,38 \times 10^{-5})$
MAK 195	400	375	881	1,20	$5,38 \times 10^{-5}$
	200	400	1080	1,38	$4,54 \times 10^{-5}$
	100	419	1141	1,39	$3,54 \times 10^{-5}$
	50	427	1106	1,32	$3,67 \times 10^{-5}$
	25	446	957	1,09	$4,41 \times 10^{-5}$
	13	464	708	0,78	$3,66 \times 10^{-5}$
	6	474	433	0,47	$7,37 \times 10^{-5}$
	3	451	231	0,26	$6,95 \times 10^{-5}$
					$(4,94 \times 10^{-5})$

Em uma segunda série de experiências, as interações cinéticas moleculares entre uma forma de comprimento completo de IgG1 do D2E7 e o rhTNF biotinilado, foram quantitativamente analisadas usando-se a tecnologia BIAcore, como descrita acima, e as constantes dos índices cinéticos foram derivadas, resumidas abaixo nas Tabelas 2, 3 e 4.

TABELA 2: CONSTANTES DO ÍNDICE DE DISSOCIAÇÃO APARENTE DA INTERAÇÃO ENTRE O D2E7 E O rhTNF BIOTINILADO

Experiência	K_d (s^{-1})
1	$9,58 \times 10^{-5}$
2	$9,26 \times 10^{-5}$
3	$7,60 \times 10^{-5}$
Média	$8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5}$

TABELA 3: CONSTANTES DO ÍNDICE DE ASSOCIAÇÃO APARENTE DA INTERAÇÃO ENTRE D2E7 E O rhTNF BIOTINILADO

Experiência	K_a (M^{-1}, s^{-1})
1	$1,33 \times 10^{-5}$
2	$1,05 \times 10^{-5}$
3	$3,36 \times 10^{-5}$
Média	$1,91 \pm 1,26 \times 10^{-5}$

TABELA 4: ÍNDICE CINÉTICO APARENTE E CONSTANTES DE AFINIDADE DE D2E7 E rhTNF BIOTINILADO

Experiência	K_a (M^{-1}, s^{-1})	K_d (s^{-1})	K_d (M)
1	$1,33 \times 10^{-5}$	$9,58 \times 10^{-5}$	$7,20 \times 10^{-10}$
2	$1,05 \times 10^{-5}$	$9,26 \times 10^{-5}$	$8,82 \times 10^{-10}$
3	$3,36 \times 10^{-5}$	$7,60 \times 10^{-5}$	$2,26 \times 10^{-10}$
Média	$1,91 \pm 1,26 \times 10^{-5}$	$8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5}$	$6,09 \pm 3,42 \times 10^{-10}$

As constantes dos índices de dissociação e de associação foram calculadas mediante análise das regiões de dissociação e de associação dos sensorgramas por software de análise BIA. As cinéticas de reação química convencional foram admitidas para a interação entre D2E7 e a molécula de rhTNF biotinilado: cinéticas de uma dissociação de ordem zero e uma associação de primeira ordem. Por causa da análise, a interação apenas entre um braço do anticorpo bivalente D2E7 e uma unidade do rhTNF biotinilado trimérico, foi considerada na escolha dos modelos moleculares para a análise dos dados cinéticos. Três experiências independentes foram realizadas e os resultados foram analisados separadamente. A constante (k_d) média do índice de dissociação aparente da interação entre D2E7 e o rhTNF biotinilado, foi de $8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5}$ s^{-1}, e a constante k_a média do índice de associação aparente foi de $1,91 \pm 1,26 \times 10^{5}$ M^{-1} s^{-1}. A constante (K_d) de dissociação intrínseca aparente foi então calculada pela fórmula: $K_d = k_d/k_a$. Assim, a média K_d do anticorpo D2E7 para rhTNF derivada dos parâmetros cinéticos, foi de $6,09 \pm 3,42 \times 10^{-10}$ M. Diferenças secundárias nos valores cinéticos para a forma IgG1 de D2E7 (apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4) e a forma IgG4 do D2E7 (apresentada na Tabela 1 e nos Exemplos 2 e 3), não são consideradas como sendo diferenças verdadeiras resultantes da presença, de regiões constantes, ou

de um IgG1, ou de um IgG4, mas, ao invés, são consideradas como sendo atribuíveis a medições de concentração de anticorpos mais acuradas, usadas para a análise cinética do IgG1. Consequentemente, os valores cinéticos para a forma IgG1 do D2E7 aqui apresentado, são considerados como sendo os parâmetros cinéticos mais precisos para o anticorpo D2E7.

EXEMPLO 2: MUTAGÊNESE DE CINTILOGRAFIA DA ALANINA DOS DOMÍNIOS CDR3 DE D2E7

Uma série de mutações únicas de alanina foi introduzida por processos padrão juntamente com o domínio CDR3 das regiões VL D2E7 e VH D2E7. As mutações de cadeia leve são ilustradas na Figura 1B (LD2E7*.A1, LD2E7*.A3, LD2E7*.A4, LD2E7*.A5, LD2E7*.A7 e LD2E7*.A8, tendo uma mutação de alanina nas posições 1, 3, 4, 5, 7 ou 8, respectivamente, do domínio CDR3 VL D2E7). As mutações de cadeia pesada são ilustradas na Figura 2B (HD2E7*.A1, HD2E7*.A2, HD2E7*.A3, HD2E7*.A4, HD2E7*.A5, HD2E7*.A6, HD2E7*.A7, HD2E7*.A8 e HD2E7*.A9, tendo uma mutação de alanina nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ou 11, respectivamente, do domínio CDR3 VH D2E7). As cinéticas de interação de rhTNFα com um anticorpo composto de VL e VH D2E7 do tipo selvagem, foram comparadas àquelas dos anticorpos compostos de 1) um VL D2E7 do tipo selvagem unido com um VH D2E7 substituído por alanina; 2) um VH D2E7 do tipo selvagem unido com um VL D2E7 substituído por alanina; ou 3) um VL D2E7 substituído por alanina unido com um VH D2E7 substituído por alanina. Todos os anticorpos foram testados como moléculas IgG4 de comprimento completo.

A cinética de interação dos anticorpos com rhTNF foi determinada por ressonância de plásmon superficial, como descrito no Exemplo 1. Os índices K_{off} quanto aos diferentes pares VH/VL acham-se resumidos abaixo na Tabela 5:

TABELA 5: LIGAÇÃO DE MUTANTES DE CINTILOGRAFIA DE ALANINA DE D2E7, A rhTNFα BIOTINILADO

VH	VL	$K_{off}(s^{-1})$
D2E7 VH	D2E7 VL	9.65×10^{-5}
HD2E7*.A1	D2E7 VL	1.4×10^{-4}
HD2E7*.A2	D2E7 VL	4.6×10^{-4}
HD2E7*.A3	D2E7 VL	8.15×10^{-4}
HD2E7*.A4	D2E7 VL	1.8×10^{-4}
HD2E7*.A5	D2E7 VL	2.35×10^{-4}
HD2E7*.A6	D2E7 VL	2.9×10^{-4}
HD2E7*.A7	D2E7 VL	1.0×10^{-4}
HD2E7*.A8	D2E7 VL	3.1×10^{-4}
HD2E7*.A9	D2E7 VL	8.1×10^{-4}
D2E7 VH	LD2E7*.A1	6.6×10^{-5}
D2E7 VH	LD2E7*.A3	NÃO DETECTADO
D2E7 VH	LD2E7*.A4	1.75×10^{-4}
D2E7 VH	LD2E7*.A5	1.8×10^{-4}
D2E7 VH	LD2E7*.A7	1.4×10^{-4}
D2E7 VH	LD2E7*.A8	3.65×10^{-4}
HD2E7*.A9	LD2E7*.A1	1.05×10^{-4}

Estes resultados demonstram que a maioria das posições dos domínios CDR3 da região VL e região VH de D2E7, são sensíveis a substituição por um resíduo único de alanina. A substituição de uma única alanina nas posições 1, 4, 5 ou 7 do domínio CDR3 VL D2E7, ou nas posições 2, 5, 6, 8, 9 ou 10 do domínio CDR3 VH C2C7, não afeta significativamente o índice de dissociação da ligação de hTNFα, em comparação com o anticorpo parenteral D2E7 do tipo selvagem. A substituição de alanina na posição 8 do CDR3 VL D2E7, ou na posição 3 do CDR3 VH D2E7, dá um K_{off} quatro vezes mais rápido, e uma substituição de alanina nas posições 4 ou 11 de CDR3 VH D2E7, dá um K_{off} 8 vezes mais rápido, indicando que estas posições são mais críticas para ligação ao hTNFα. No entanto, uma substituição de alanina única nas posições 1, 4, 5, 7 ou 8 do domínio CDR3 VL D2E7, ou nas posições 2, 3,

4, 5, 6, 8, 9, 10 ou 11 do domínio CDR3 VH D2E7 ainda resulta em um anticorpo anti-hTNFα tendo um K_{off} de 1 x 10^{-3} seg^{-1} ou menos.

EXEMPLO 3: ANÁLISE DE LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS RELACIONADOS A D2E7

Uma série de anticorpos relacionados na sequência a D2E7 foi analisada quanto à sua ligação a rhTNFα, em comparação com o D2E7, mediante ressonância de plásmon superficial, conforme descrito no Exemplo 1. As sequências de aminoácidos das regiões VL analisadas são mostradas nas Figuras 1A e 1B. As sequências de aminoácidos das regiões VH analisadas são mostradas nas Figuras 2A e 2B. Os índices K_{off} para os vários pares de VH/VL (no formato indicado, quer como um anticorpo IgG1 de comprimento completo, ou como um IgG4, ou como um scFv), acham-se resumidos abaixo na Tabela 6:

TABELA 6: LIGAÇÃO DE ANTICORPOS RELACIONADOS AO D2E7, A rhTNFα BIOTINILADO

VH	VL	Formato	K_{off} (s^{-1})
D2E7 VH	D2E7 VL	IgG1/IgG4	9.65 x 10^{-5}
VH1-D2	LOE7	IgG1/IgG4	7,7 x 10^{-5}
VH1-D2	LOE7	scFv	4.6 x 10^{-4}
VH1-D2.N	LOE7.T	IgG4	2,1 x 10^{-5}
VH1-D2.Y	LOE7.A	IgG4	2.7 x 10^{-5}
VH1-D2.N	LOE7.A	IgG4	3.2 x 10^{-5}
VH1-D2	EP B12	scFv	8.0 x 10^{-4}
VH1-D2	2SD4 VL	scFv	1.94 x 10^{-3}
3C-H2	LOE7	scFv	1.5 x 10^{-3}
2SD4 VH	LOE7	scFv	6,07 x 10^{-3}
2SD4 VH	2SD4 VL	scFv	1.37 x 10^{-2}
VH1A11	2SD4 VL	scFv	1,34 x 10^{-2}
VH1B12	2SD4 VL	scFv	1.01 x 10^{-2}
VH1B11	2SD4 VL	scFv	9.8 x 10^{-3}
VH1E4	2SD4 VL	scFv	1.59 x 10^{-2}
VH1F6	2SD4 VL	scFv	2.29 x 10^{-2}
VH1D8	2SD4 VL	scFv	9.5 x 10^{-3}
VH1G1	2SD4 VL	scFv	2,14 x 10^{-2}
2SD4 VH	EP B12	scFv	6,7 x 10^{-3}
2SD4 VH	VL10E4	scFv	9,6 x 10^{-3}
2SD4 VH	VL100A9	scFv	1,33 x 10^{-2}
2SD4 VH	VL100D2	scFv	1,41 x 10^{-2}
2SD4 VH	VL10F4	scFv	1,11 x 10^{-2}
2SD4 VH	VLLOE5	scFv	1,16 x 10^{-2}
2SD4 VH	VLL0F9	scFv	6,09 x 10^{-3}
2SD4 VH	VLL0F10	scFv	1.34 x 10^{-2}
2SD4 VH	VLLOG7	scFv	1,56 x 10^{-2}
2SD4 VH	VLLOG9	scFv	1,46 x 10^{-2}
2SD4 VH	VLLOH1	scFv	1,17 x 10^{-2}
2SD4 VH	VLLOH10	scFv	1,12 x 10^{-2}
2SD4 VH	VL1B7	scFv	1,3 x 10^{-2}
2SD4 VH	VL1C1	scFv	1,36 x 10^{-2}
2SD4 VH	VL1C7	scFv	2.0 x 10^{-2}
2SD4 VH	VL0.1F4	scFv	1.76 x 10^{-2}
2SD4 VH	VL0.1H8	scFv	1,14 x 10^{-2}

Os índices de dissociação lenta (isto é, $K_{off} \leq 1 \times 10^{-4}$ seg^{-1}) para os anticorpos de comprimento completo (isto é, formato IgG), tendo um VL

selecionado de D2E7, LOE7, LOE7.T e LOE7.A, que têm, ou uma treonina, ou uma alanina na posição 9, indicam que a posição 9 do CDR3 VL D2E7 pode ser ocupada por qualquer um destes dois resíduos sem substancialmente afetar o K_{off}. Em consequência, um motivo de consenso para o CDR3 VL D2E7 compreende a sequência de aminoácidos: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEQ ID NO: 3). Além do mais, os índices de dissociação lenta (isto é, $K_{off} \leq 1 \times 10^{-4}$ seg^{-1}) para anticorpos tendo um VH selecionado de D2E7, VH1-D2.N e VH1-D2.Y, que têm, ou uma tirosina, ou uma asparagina, na posição 12, indicam que a posição 12 do CDR3 VH D2E7 pode ser ocupada por qualquer um destes dois resíduos, sem substancialmente afetar o K_{off}. Consequentemente, um motivo de consenso para o CDR3 VH D2E7 compreende a sequência de aminoácidos: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEQ ID NO: 4).

Os resultados apresentados na Tabela 6 demonstram que, no formato ScFv, os anticorpos contendo a região CDR3 VL ou VH do 2SD4, apresentam um K_{off} mais rápido (isto é, $K_{off} \geq 1 \times 10^{-3}$ seg^{-1}) em comparação com os anticorpos contendo a região CDR3 VL ou VH de D2E7. Dentro do CDR3 VL, o 2SD4 difere do D2E7 nas posições 2, 5 e 9. Conforme discutido acima, no entanto, a posição 9 pode ser ocupada por Ala (como em 2SD4) ou Thr (como em D2E7), sem substancialmente efetar o K_{off}. Assim, por comparação de 2SD4 e D2E7, as posições 2 e 5 do CDR3 VL D2E7, ambas argininas, podem ser identificadas como sendo críticas para a associação do anticorpo com o hTNFα. Estes resíduos podem ser diretamente envolvidos como resíduos de contato no sítio de ligação do anticorpo, ou podem contribuir criticamente para manter a arquitetura de andaime da molécula do anticorpo nesta região. Relativamente à importância da posição 2, a substituição de Arg (em LOE7, que tem o mesmo CDR3 VL que o D2E7) por Lys (em EP B12), acelera o índice de dissociação mediante um fator de dois. Com respeito à importância da posição 5, a substituição de Arg (em D2E7) por Ala (em LD2E7*.A5), como descrito no Exemplo 2, também acelera o índice de

dissociação por duas vezes. Além disso, sem qualquer Arg nas posições 2 e 5 (em 2SD4), o índice de dissociação é cinco vezes mais rápido. No entanto, deve ser observado que, não obstante a posição 5 seja importante para melhorar a ligação a hTNFα, uma modificação nesta posição pode ser anulada por modificações em outras posições, como observado em VLLOE4, VLLOH1 ou VL0,1H8.

Dentro do CDR3 VH, o 2SD4 difere do D2E7 nas posições 1, 7 e 12. Como examinado acima, no entanto, a posição 12 pode ser ocupada por Asn (como em 2SD4) ou Tyr (como em D2E7), sem afetar substancialmente o K_{off}. Assim, por comparação do 2SD4 com o D2E7, as posições 1 e 7 do CDR3 VH D2E7 podem ser identificadas como sendo críticas quanto à ligação ao hTNFα. Como examinado acima, estes resíduos podem ser diretamente envolvidos como resíduos de contato no sítio de ligação do anticorpo, ou podem contribuir criticamente para manter a arquitetura de andaime da molécula do anticorpo nesta região. Ambas as posições são importantes para ligação ao hTNFα, uma vez que, quando o CDR3 VH 3C-H2 (que tem uma modificação de valina para alanina na posição 1, com respeito ao CDR3 VH D2E7) é usado, o scFv tem um índice 3 vezes mais rápido de dissociação, do que quando o CDR3 VH D2E7 é usado, mas este índice de dissociação ainda é quatro vezes mais lento do que quando o CDR3 VH 2SD4 é usado (o qual tem modificações em ambas as posições 1 e 7, em relação ao CDR3 VH D2E7).

EXEMPLO 4: ATIVIDADE FUNCIONAL DO D2E7

Para examinar a atividade funcional do D2E7, o anticorpo foi usado em vários ensaios, que mediram a capacidade do anticorpo de inibir a atividade do hTNFα, quer *in vitro*, quer *in vivo*.

A. NEUTRALIZAÇÃO DA CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR TNFα EM CÉLULAS L929

O TNFα recombinante humano (rhTNFα) provoca a citotoxicidade celular em células L929 de murinos após um período de

incubação de 18 a 24 horas. Os anticorpos humanos anti-hTNFα foram avaliados em ensaios L929 por co-incubação de anticorpos com rhTNFα e as células, como segue. Uma placa de microtitulação de 96 reservatórios, contendo 100 µl de Abs anti-hTNFα, foi diluída em série 1/3 colocado na placa em duplicatas usando-se o meio RPMI contendo 10% de soro bovino fetal (FBS). Cinqüenta microlitros de rhTNFα foram adicionados para uma concentração final de 500 pg/ml em cada reservatório de amostras. As placas foram então incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir, 50 µl de células de fibroblastos L929 de camundongos sensíveis a TNFα foram adicionadas, para uma concentração final de 5 x 10^4 células por reservatório, incluindo 1 µg/ml de Actinomicina-D. Os controles incluíam o meio mais as células e o rhTNFα mais as células. Estes controles, e uma curva padrão de TNFα, variando de 2 ng/ml a 8,2 pg/ml, foram usados para determinar a qualidade do ensaio e prover uma janela de neutralização. As placas foram então incubadas durante a noite (18 a 24 horas) a 37°C em CO_2 5%.

Cem microlitros de meio foram removidos de cada reservatório, e foram adicionados 50 µl de 5 mg/ml de brometo de 3(4,4-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil tetrazólio (MTT; comercialmente disponível da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em PBS. As placas foram então incubadas por 4 horas a 37°C. Cinqüenta microlitros de sulfato dodecílico de sódio 20% (SDS) foram então adicionados a cada reservatório, e as placas foram incubadas durante a noite a 37°C. A densidade ótica em 570/630 nm foi medida, as curvas foram representadas graficamente para cada amostra e os IC_{50} foram determinados por processos padrão.

Os resultados representativos para os anticorpos humanos tendo vários pares VL e VH, em comparação com o mAb MAK 195 de murinos, são apresentados na Figura 3 e na Tabela 7 abaixo.

TABELA 7: NEUTRALIZAÇÃO DA CITOXICIDADE L929 INDUZIDA POR TNFα

VH	VL	Estrutura	IC_{50}, M
D2E7	D2E7	scFv	1.1×10^{-10}
D2E7	D2E7	IgG4	4.7×10^{-11}
2SD4	2SD4	scFv/IgG1/IgG4	3.0×10^{-7}
2SD4	LOE7	scFv	4.3×10^{-8}
VH1-D2	2SD4	scFv	1.0×10^{-8}
VH1-D2	LOE7	scFv/IgG1/IgG4	3.4×10^{-10}
VH1.D2.Y	LOE7.T	IgG4	8.1×10^{-11}
VH1-D2.N	LOE7.T	IgG4	1.3×10^{-10}
VH1-D2.Y	LOE7.A	IgG4	2.8×10^{-11}
VH1-D2.N	LOE7.A	IgG4	6.2×10^{-11}
MAK 195	MAK 195	scFv	1.9×10^{-8}
MAK 195	MAK195	$F(ab')_2$	6.2×10^{-11}

Os resultados da Figura 3 e da Tabela 7 demonstram que o anticorpo anti-hTNFα humano D2E7, e os vários anticorpos relacionados a D2E7, neutralizam a citotoxicidade L929 induzida por TNFα com uma capacidade aproximadamente equivalente àquela do mAb MAK 195 anti-hTNFα de murinos.

Em outra série de experiências, a capacidade da forma do IgG1 de D2E7 para neutralizar a citotoxicidade L929 induzida por TNFα foi examinada como descrito acima. Os resultados das três experiências independentes, e a sua média, estão resumidos abaixo na Tabela 8:

TABELA 8: NEUTRALIZAÇÃO DA CITOTOXICIDADE L929 INDUZIDA POR TNFα, POR IgG1 D2E7

Experiência	IC_{50} [M]
1	$1,26 \times 10^{-10}$
2	$1,33 \times 10^{-10}$
3	$1,15 \times 10^{-10}$
Média	$1,25 \pm 0,01 \times 10^{-10}$

Esta série de experiências confirmou que D2E7, na forma IgG1 de comprimento completo, neutraliza a citotoxicidade L929 induzida por TNFα, com um IC_{50} médio [M] de $1,25 \pm 0,01 \times 10^{-10}$.

B. INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DO TNFα A RECEPTORES DE TNFα EM CÉLULAS U-937

A capacidade dos anticorpos anti-hTNFα humanos, de inibir a ligação de hTNFα aos receptores de hTNFα na superfície de células, foi examinada usando-se a linhagem celular U-937 (ATCC nº CRL 1593), uma linhagem celular histiocítica humana que expressa os receptores de hTNFα. As células U-937 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal 10% (Hyclone A-1111, Hyclone Laboratories, Logan, UT), glutamina-L (4 nM), solução tampão HEPES (10 mM), penicilina (100 μg/ml) e estreptomicina (100 μg/ml). Para examinar a atividade de anticorpos IgG de comprimento completo, as células U0937 foram pré-incubadas com PBS suplementado com 1 mg/ml de IgG humano (Sigma I-4506, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 45 minutos sobre gelo, e depois as células foram lavadas por três vezes com tampão de ligação. Quanto ao ensaio de ligação do receptor, as células U-937 (5 x 10^6 células/reservatório) foram incubadas em um tampão de ligação (PBS suplementado com albumina de soro bovino 0,2%) em placas de microtitulação de 95 reservatórios (Costar 3799, Costar Corp., Cambridge, MA), juntamente com rhTNFα rotulado ^{125}I (3 x 10^{-10} M; 25 μCi/ml; obtido da NEN Research Products, Wilmington, DE), com ou sem anticorpos anti-hTNFα, em um volume total de 0,2 ml. As placas foram incubadas sobre gelo por 1,5 horas. Depois, 75 μl de cada amostra foram transferidos para tubos de teste de 1,0 ml (Sarstedt 72.700, Sarstedt Corp., Princeton, NJ) contendo dibutilftalato (Sigma D-2270, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e dinonilftalato (ICN 210733, ICN, Irvine, CA). Os tubos de teste continham 300 μl de uma mistura de dibutilftalato e dinonilftalato, relação em volume de 2:1, respectivamente. O rhTNFα livre (isto é, não fixado) rotulado ^{125}I foi removido por microcentrifugação durante cinco minutos. Depois, a extremidade de cada tubo de teste contendo uma pelota celular foi cortada com o auxílio de uma tesoura de microtubo (Bel-Art

210180001, Bel-Art Products, Pequannock, NJ). A pelota celular contém rhTNFα rotulado ^{125}I fixado ao receptor de TNFα p60 ou p80, enquanto a fase aquosa acima da mistura de óleo contém excedente de rhTNFα livre rotulado ^{125}I. Todas as pelotas celulares foram coletadas em um tubo de contagem (Falcon 2052, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ), e contadas em um contador de cintilação.

Os resultados representativos são apresentados na Figura 4. O valor do IC_{50} quanto à inibição D2E7 da ligação do hTNFα aos receptores hTNFα nas células U-937, é aproximadamente de 3×10^{-10} M nestas experiências. Estes resultados demonstram que o anticorpo anti-hTNFα humano D2E7 inibe a ligação do rhTNFα aos receptores de hTNFα nas células U-937 em concentrações aproximadamente equivalentes àquelas do mAb MAK 195 de anti-hTNFα de murinos.

Em outra série de experiências, a capacidade da forma IgG1 de D2E7 para inibir a ligação de rhTNFα a receptores hTNFα em células U-937, foi examinada como descrito acima. Os resultados das três experiências independentes, e a sua média, acham-se resumidos abaixo na Tabela 9:

TABELA 9: INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DO RECEPTOR DE TNF EM CÉLULAS U-937 POR IgG1 DE D2E7

Experiência	IC_{50} [M]
1	$1,70 \times 10^{-10}$
2	$1,49 \times 10^{-10}$
3	$1,50 \times 10^{-10}$
Média	$1,56 \pm 0,12 \times 10^{-10}$

Esta série de experiências confirmou que o D2E7, na forma IgG1 de comprimento completo, inibe a ligação do receptor TNF em células U-937, com um IC_{50} médio [M] de $1,56 \pm 0,12 \times 10^{-10}$.

Para pesquisar a potência inibitória de D2E7 na ligação de ^{125}I-rhTNF ligando aos receptores individuais p55 e p75, um radioimunoensaio de fase sólida foi realizado. Para medir os valores de IC_{50} de D2E7 para receptores de TNF separados, concentrações variáveis do anticorpo foram incubadas com

concentração de 3 x 10^{-10} de ^{125}I-rhTNF. A mistura foi então ensaiada em placas separadas contendo, ou os receptores p55, ou os receptores p75 em uma maneira dependente da dose. Os resultados acham-se resumidos abaixo na Tabela 10:

TABELA 10: INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DO RECEPTOR TNF AO TNFR p55 E p75 POR IgG1 DE D2E7.

	IC_{50} [M]	
Reagente	p55 TNFR	p75TNFR
D2E7	1,47 x 10^{-9}	1,26 x 10^{-9}
rhTNF	2,31 x 10^{-9}	2,70 x 10^{-9}

A inibição da ligação ^{125}I-rhTNF aos receptores TNF p55 e p75 em células U937 por D2E7, seguiu uma curva sigmóide simples, indicando valores de IC_{50} similares para cada receptor. Nos experiências de radioimunoensaio de fase sólida (RIA) com os receptores TNF recombinantes, os valores de IC_{50} para inibição da ligação ^{125}I-rhTNF aos receptores p55 e p75 por D2E7, foram calculados como 1,47 x 10^{-9} e 1,26 x 10^{-9} M, respectivamente. O decréscimo em valores do IC_{50} na fase sólida foi provavelmente devido à densidade mais elevada dos receptores no formato RIA, tendo em vista que o rhTNF não rotulado também se inibiu com valores similares de IC_{50}. Os valores de IC_{50} para a inibição da ligação de ^{125}I-rhTNF aos receptores p55 e p75 por rhTNF não rotulado foram de 2,31 x 10^{-9} e 2,70 x 10^{-9} M, respectivamente.

C. <u>INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE ELAM-1 SOBRE AS HUVEC</u>

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) podem ser induzidas a expressar a molécula 1 de aderência dos leucócitos celulares endoteliais (ELAM-1) em sua superfície celular, mediante tratamento com rhTNFα, a qual pode ser detectada mediante reação das HUVEC tratadas com rhTNFα com um anticorpo ELAM-1 de camundongo anti-humano. A capacidade dos anticorpos humanos anti-hTNFα de inibirem esta expressão induzida por TNFα de ELAM-1 nas HUVEC, foi examinada como segue: As HUVEC (ATCC nº CRL 1730) foram colocadas em placa de 96 reservatórios

(5 x 10^4 células/reservatório) e incubadas durante a noite a 37°C. No dia seguinte, diluições em série de anticorpo humano anti-hTNFα (1:10) foram preparadas em placas de microtitulação, começando-se com 20 a 100 μg/ml de anticorpo. Uma solução de estoque de rhTNFα foi preparada em 4,5 ng/ml, alíquotas de rhTNFα foram adicionadas a cara reservatório contendo anticorpo, e os conteúdos foram bem misturados. Os controles incluíam meio sozinho, meio mais anticorpo anti-hTNFα e meio mais rhTNFα. As placas das HUVEC foram removidas da sua incubação de durante a noite a 37°C, e o meio foi suavemente aspirado de cada reservatório. Duzentos microlitros da mistura anticorpo-rhTNFα foram transferidos para cada reservatório das placas das HUVEC. As placas das HUVEC foram então ainda incubadas a 37°C durante 4 horas. A seguir, um estoque de anticorpo anti-ELAM-1 de murinos foi diluído a 1:1000 em RPMI. O meio em cada reservatório da placa das HUVEC foi suavemente aspirado, 50 μl/reservatório da solução anti-ELAM-1 - anticorpo foram adicionados e as placas das HUVEC foram incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente. Uma solução de anticorpo Ig anticamundongo rotulada ^{125}I foi preparada em RPMI (aproximadamente 50.000 cpm em 50 μl). O meio em cada reservatório das placas das HUVEC foi suavemente aspirado, os reservatórios foram lavados por duas vezes com RPMI e 50 μl da solução Ig anticamundongo rotulada ^{125}I foram adicionados a cada reservatório. As placas foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente e, depois, cada reservatório foi lavado por três vezes com RPMI. Cento e oitenta microlitros de SDS 5% foram adicionados a cada reservatório, para lisar as células. O lisado celular de cada reservatório foi então transferido para um tubo e contado em um contador de cintilação (cintiloscópio).

Resultados representativos são apresentados na Figura 5. O valor do IC_{50} para a inibição do D2E7 da expressão induzida por hTNFα de ELAM-1 nas HUVEC, é de aproximadamente 6 x 10^{-11} M nestas experiências. Estes resultados demonstram que o anticorpo anti-hTNFα humano D2E7 inibe

a expressão induzida por hTNFα de ELAM-1 nas HUVEC em concentrações aproximadamente equivalentes àquelas dos mAb MAK 195 anti-hTNFα de murinos.

Em outra série de experiências, a capacidade da forma IgG1 do D2E7 de inibir a expressão induzida por hTNFα, de ELAM-1 nas HUVEC, foi examinada como descrito acima. Os resultados das três experiências independentes, e sua média, acham-se resumidos abaixo na Tabela 11:

TABELA 11: INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DO ELAM-1 INDUZIDO POR TNFα, PELO RECEPTOR IgG1 DO D2E7

Experiência	IC_{50} [M]
1	$1,95 \times 10^{-10}$
2	$1,69 \times 10^{-10}$
3	$1,90 \times 10^{-10}$
Média	$1,85 \pm 0,14 \times 10^{-10}$

Esta série de experiências confirmou que o D2E7, na forma de IgG1 de comprimento completo, inibe a expressão de ELAM-1 induzida por TNFα nas HUVEC com um IC_{50} médio [M] de $1,85 \pm 0,14 \times 10^{-10}$.

A potência de neutralização do IgG1 do D2E7 também foi examinada quanto à expressão induzida por rhTNF das duas outras moléculas de aderência, ICAM-1 e VCAM-1. Uma vez que a curva de titulação do rhTNF para a expressão de ICAM-1 em 16 horas foi muito semelhante à curva da expressão do ELAM-1, a mesma concentração de rhTNF foi usada nas experiências de neutralização do anticorpo. As HUVEC foram incubadas com rhTNF na presença de concentrações variáveis de D2E7 em um incubador de CO_2 a 37°C durante 16 horas, e a expressão de ICAM-1 foi medida por anticorpo anti-ICAM-1 de camundongos, seguido por anticorpo anticamundongos de carneiro rotulado ^{125}I. Duas experiências independentes foram realizadas e os valores do IC_{50} foram calculados. Um anticorpo IgG1 humano não relacionado não inibiu a expressão de ICAM-1.

O procedimento experimental para testar a inibição da

1, exceto que mAb anti-VCAM-1 foi usado, ao invés de mAb anti-ELAM-1. Três experiências independentes foram realizadas e os valores do IC_{50} foram calculados. Um anticorpo IgG1 humano não relacionado não inibiu a expressão de VCAM-1.

Os resultados acham-se resumidos abaixo na Tabela 12:

TABELA 12: INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE ICAM-1 E VCAM-1 POR IgG1 DO D2E7

Inibição ICAM-1		IC_{50} [M]	
Experiência	IC50 [M]	Experiência	IC_{50} [M]
1	$1,84 \times 10^{-10}$	1	$1,03 \times 10^{-10}$
2	$2,49 \times 10^{-10}$	2	$9,26 \times 10^{-11}$
		3	$1,06 \times 10^{-10}$
Média	$2,17 \pm 0,46 \times 10^{-10}$	Média	$1,01 \pm 0,01 \times 10^{-10}$

Estas experiências demonstram que o tratamento das células endoteliais primárias da veia umbilical humana com o rhTNF levado a expressão ótima de moléculas de aderência: ELAM-1 e VCAM-1 em quatro horas, e a expressão máxima supra-regulada de ICAM-1 em 16 horas. O D2E7 foi capaz de inibir a expressão das três moléculas de aderência em uma maneira dependente da dose. Os valores de IC_{50} para inibição de ELAM-1, ICAM-1 e VCAM-1 foram de $1,85 \times 10^{-10}$, $2,17 \times 10^{-10}$ e $1,01 \times 10^{-10}$ M, respectivamente. Estes valores são muito similares, indicando necessidades similares quanto à dose do sinal de ativação de rhTNF para induzir a expressão de ELAM-1, ICAM-1 e VCAM-1. De forma interessante, o D2E7 foi similarmente eficaz no ensaio de inibição mais longo da expressão de ICAM-1. O ensaio de inibição do ICAM-1 requereu 16 horas de co-incubação de rhTNF e D2E7 com HUVEC, em oposição às 4 horas requeridas para os ensaios de inibição do ELAM-1 e do VCAM-1. Tendo em vista que o D2E7 tem um índice lento de dissociação para o rhTNF, é concebível que, durante as 16 horas do período de co-incubação, não havia nenhuma competição significativa pelos receptores de TNF nas HUVEC.

D. NEUTRALIZAÇÃO DE hTNFα *IN VIVO*

Três diferentes sistemas *in vivo* foram empregados para demonstrar que o D2E7 é eficaz na inibição da atividade do hTNFα *in vivo*.

I. Inibição da letalidade induzida por tnf em camundongos sensibilizados por D-galactosamina

A injeção de TNFα (rhTNFα) recombinante humano a camundongos sensibilizados por D-galactosamina, causa letalidade dentro de um período de tempo de 24 horas. Tem sido observado que os agentes de neutralização do TNFα evitam a letalidade neste modelo. Para examinar a capacidade de anticorpos anti-hTNFα humanos neutralizarem hTNFα *in vivo* neste modelo, camundongos C57B1/6 foram injetados com concentrações variáveis de IgG1 de D2E7, ou uma proteína de controle, em PBS, intraperitonealmente (i.p.). Os camundongos foram provados 30 minutos mais tarde com 1 μg de rhTNFα e 20 mg de D-galactosamina em PBS i.p., e observados 24 horas mais tarde. Estas quantidades de rhTNFα e D-galactosamina foram previamente determinadas para se obter 80 a 90% de letalidade nestes camundongos.

Resultados representativos, apresentados como um gráfico de barras de % de sobrevivência versus concentração de anticorpos, são apresentados na Figura 6. As barras pretas representam o D2E7, ao passo que as barras hachuradas representam MAK 195. A injeção de 2,5 a 25 μg de anticorpo de D2E7 por camundongo, protegeu os animais da letalidade induzida por TNFα. O valor de ED_{50} é de aproximadamente 1 a 2,5 μg/camundongo. O anticorpo positivo de controle, MAK 195, foi similar em sua capacidade protetora. A injeção de D2E7 na ausência de rhTNFα não teve qualquer efeito prejudicial nos camundongos. A injeção de um anticorpo IgG1 não específico humano não ofereceu qualquer proteção contra a letalidade induzida por TNFα.

Em uma segunda experiência, quarenta e nove camundongos foram divididos em 7 grupos iguais. Cada grupo recebeu doses variáveis de

D2E7 trinta minutos antes de receber uma dose LD_{80} da mistura rhTNF/D-galactosamina (1,0 μg de rhTNF e 20 mg de D-galactosamina por camundongo). O grupo 7 de controle recebeu o anticorpo capa IgG1 humano normal em dose de 25 μg/camundongo. Os camundongos foram examinados 24 horas mais tarde. A sobrevivência para cada grupo está resumida abaixo na Tabela 13.

TABELA 13: SOBREVIVÊNCIA 24 HORAS APÓS O TRATAMENTO COM D2E7

Grupo	Sobrevivência (vivos/total)	Sobrevivência (%)
1 (sem anticorpo)	0/7	0
2 (1 μg)	1/7	14
3 (2,6 μg)	5/7	71
4 (5,2 μg)	6/7	86
5 (26 μg)	6/7	86
6 (26 μg; sem rhTNF)	7/7	100
7 (25 μg Hu IgG1)	1/7	14

II. **Inibição da pirexia do coelho induzida por TNF**

A eficácia do D2E7 em inibir a resposta à pirexia induzida por rhTNF em coelhos, foi examinada. Grupos destes coelhos fêmeas NZW pesando aproximadamente 2,5 kg cada, foram injetados intravenosamente com D2E7, rhTNF e complexos imunes de D2E7 e rhTNF. As temperaturas retais foram verificadas por sondas termístor em um registrador térmico Kaye, a cada minuto, por aproximadamente 4 horas. O TNF recombinante humano em solução salina, injetado em 5 μg/kg, eliciou uma elevação na temperatura maior do que 0,4°C em aproximadamente 45 minutos após a injeção. A preparação do anticorpo por si, em solução salina em uma dose de 138 μg/kg, não eliciou um aumento de temperatura nos coelhos até 140 minutos após a administração. Em todas as outras experiências, D2E7 ou reagentes de controle (IgG1 humano ou um veículo salino) foram injetados i.v. nos coelhos, o que, 15 minutos mais tarde, foi seguido por uma injeção de rhTNF em solução salina a 5 μg/kg i.v. Os resultados representativos das várias experiências acham-se resumidos abaixo na Tabela 14:

TABELA 14: INIBIÇÃO DA PIREXIA INDUZIDA POR rhTNF COM D2E7, EM COELHOS.

	Elevação da Temp. *, °C			Rel. molar	Temp. de pico
Dose D2E7 (μg/kg)	rhTNF	rhTNF + D2E7	% Inib. **	D2E7: rhTNF	Minutos pós rhTNF
14	0,53	0,25	53	1	60
24	0,43	0,13	70	1,6	40
48	0,53	0,03	94	3,3	50
137	0,53	0,00	100	9,5	60
792	0,80	0,00	100	55	60

* = temperatura de pico

** = % de inibição = (1-{aumento de temperatura com rhTNF & D2E7/aumento da temperatura com rhTNF sozinho}) x 100.

O pré-tratamento intravenoso com D2E7 em uma dose de 14 μg/kg, parcialmente inibiu a resposta pirogênica, em comparação com os coelhos pré-tratados com solução salina apenas. O D2E7 administrado em 137 μg/kg suprimiu totalmente a resposta pirogênica do rhTNF na mesma experiência. Em uma segunda experiência, o D2E7 administrado em 24 μg/kg também suprimiu parcialmente a resposta pirogênica, em comparação com os coelhos pré-tratados com solução salina apenas. A relação molar do D2E7 para rhTNF foi de 1/6:1 nesta experiência. Em uma terceira experiência, o D2E7 injetado i.v. em 48 μg/kg (relação molar D2E7:rhTNF = 3,3:1) suprimiu totalmente a resposta pirogênica, em comparação com os coelhos pré-tratados com o IgG1 humano de controle em solução salina a 30 μg/kg. Na experiência final, os coelhos pré-tratados com D2E7 (792 μg/kg) em uma relação molar muito elevada para rhTNF (55:1) não desenvolveram qualquer elevação na temperatura, a qualquer tempo, até 4 horas de observação. O tratamento dos coelhos com complexos imune gerados de uma mistura de D2E7 e rhTNF incubado a 37°C por 1 horas, em uma relação molar de 55:1, sem subsequente administração de rhTNF, também não eliciaram qualquer elevação na temperatura na mesma experiência.

III. **Prevenção da poliartrite em camundongos transgênicos Tg 197**

O efeito do D2E7 no desenvolvimento da doença foi investigado em um modelo de artrite de murinos transgênicos. Os camundongos transgênicos (Tg 197) foram gerados para que expressem o TNF humano tipo selvagem (modificado na região 3' além das sequências de codificação) e estes camundongos desenvolvem a poliartrite crônica com 100% de incidência em 4 a 7 semanas de idade (ver *EMBO J* (1991) *10*: 4025-4031 para outra descrição do modelo de poliartrite Tg 197).

Os animais transgênicos foram identificados por PCR em 3 dias de idade. As ninhadas de camundongos transgênicos foram divididas em seis grupos. Os camundongos transgênicos foram verificados por análise de hibridização *slot-blot* em 15 dias de idade. Os protocolos de tratamento para os seis grupos foram como segue: Grupo 1 = sem tratamento; Grupo 2 = solução salina (veículo); Grupo 3 = D2E7 a 1,5 μg/g; Grupo 4 = D2E7 a 15 μg/g; Grupo 5 = D2E7 a 30 μg/g; e Grupo 6 = controle do isótipo IgG1 a 30 μg/g. Uma ninhada com camundongos não transgênicos também foi incluída no estudo, para servir de controle (Grupo 7 - não transgênico; sem tratamento). Cada grupo recebeu três injeções i.p. por semana, dos tratamentos indicados. As injeções continuaram por 10 semanas. A cada semana, as modificações macroscópicas na morfologia das juntas foram registradas para cada animal. Em 10 semanas, todos os camundongos foram sacrificados e o tecido dos camundongos foi coletado em formalina. O exame microscópico do tecido foi realizado.

O peso dos animais em gramas foi tomado para cada camundongo no início de cada semana. Ao mesmo tempo, medições do tamanho das juntas (em mm) também foram feitas, como uma medição da gravidade da doença. O tamanho das juntas foi estabelecido como uma média de três medições no tornozelo direito traseiro, usando-se um micrômetro. A contagem artrítica foi registrada semanalmente como segue: 0 = sem artrite (aparência e flexão normal); + = artrite suave (distorção das juntas); ++ =

artrite moderada (inchação, deformação das juntas) e +++ = artrite grave (ancilose detectada na flexão e movimento gravemente prejudicado). A classificação histopatológica com base no manchamento de hematoxilina/eosina das seções das juntas, baseou-se no seguinte: 0 = nenhuma doença detectável; 1 = proliferação da membrana sinovial; 2 = espessamento sinovial intenso; 3 = destruição da cartilagem e erosão do osso.

O efeito do tratamento com D2E7 no tamanho médio da junta dos camundongos transgênicos artríticos, é mostrado no gráfico da Figura 9. A classificação histopatológica e artrítica dos camundongos transgênicos Tg 197, com 11 semanas de idade, está resumida abaixo na Tabela 15:

TABELA 15: EFEITO DO D2E7 NA CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E ARTRÍTICA EM CAMUNDONGOS Tg 197

Grupo	Tratamento	Classif. histopatológica	Classif. artrítica
1	nenhum	3 (7/70)	+++ (7/7)
2	solução salina	3 (8/8)	+++ (8/8)
6	Controle IgG1	3 (9/9)	+++ (7/9)
3	D2E7 a 1,5 μg/g	0 (6/8)	0 (8/8)
4	D2E7 a 15 μg/g	0 (7/8)	0 (8/8)
5	D2E7 a 30 μg/g	0 (8/8)	0 (8/8)

Esta experiência demonstrou que o anticorpo D2E7 tem um efeito benéfico definido em camundongos transgênicos expressando o TNF humano do tipo selvagem (Tg 197) sem qualquer artrite evidente após o período de estudo.

E. **Neutralização do D2E7 dos TNFα de outras espécies**

A especificidade da ligação do D2E7 foi examinada mediante avaliação da sua capacidade de neutralizar os fatores da necrose tumoral de várias espécies de primatas e de camundongo, usando-se um ensaio de citotoxicidade L929 (como descrito no Exemplo 4, subseção A, acima). Os resultados estão resumidos na Tabela 16, abaixo:

TABELA 16: CAPACIDADE DO D2E7 DE NEUTRALIZAR O TNF DE ESPÉCIES DIFERENTES NO ENSAIO L929

TNFα*	Fonte	IC_{50} para D2E7 Neutralização (M)**
Humano	Recombinante	$7,8 \times 10^{-11}$
Chimpanzé	PBMC estimulado por LPS	$5,5 \times 10^{-11}$
Babuíno	Recombinante	$6,0 \times 10^{-11}$
Sagüí	PBMC estimulado por LPS	$4,0 \times 10^{-10}$
Cynomolgus	PBMC estimulado por LPS	$8,0 \times 10^{-11}$
Reso	PBMC estimulado por LPS	$3,0 \times 10^{-11}$
Canino	PBMC estimulado por LPS	$2,2 \times 10^{-10}$
Suíno	Recombinante	$1,0 \times 10^{-7}$
Murino	Recombinante	$>1,0 \times 10^{-7}$

Os resultados da Tabela 16 demonstram que o D2E7 pode neutralizar a atividade de cinco TNFα de primatas, aproximadamente equivalente ao TNFα humano e, além do mais, pode neutralizar a atividade do TNFα canino (cerca de dez vezes pior do que o TNFα humano) e o TNFα porcino e de camundongos (cerca de ~1000 vezes pior do que o TNFα humano). Além disso, a ligação do D2E7 ao rhTNFα de fase de solução não foi inibida por outras citocinas, tais como a linfotoxina (TNFβ), IL-1-α, IL-1-β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN-gama e TGF-β, indicando que o D2E7 é muito específico quanto ao seu ligando TNFα.

F. **Carência de liberação da citocina pelo sangue humano total incubado com D2E7**

Neste exemplo, a capacidade do D2E7 de induzir, por si, as células sanguíneas humanas normais para secretar citocinas ou derramar as moléculas celulares superficiais, foi examinada. O D2E7 foi incubado com sangue total diluído de três doadores normais diferentes, em concentrações variáveis, por 24 horas. Um controle positivo de LPS foi realizado ao mesmo tempo, em uma concentração previamente determinada para estimular as células sanguíneas imunocompetentes a secretar citocinas. Os sobrenadantes foram colhidos e testados em um painel de dez citocinas solúveis, *kits* ELISA de molécula receptora e de aderência: IL-1-α, IL-1-β, IL-1 antagonista

receptora, IL-6, IL-8, TNFα, receptor 1 TNF solúvel, receptor II TNF solúvel, ICAM-1 solúvel e E-selectina solúvel. Nenhum acréscimo significativo de citocinas ou derrame das moléculas celulares superficiais foram medidos como resultado da co-incubação do anticorpo D2E7, em concentrações até 343 μg/ml. As culturas de controle sem a adição do anticorpo também não produziu qualquer quantidade mensurável de citocinas, enquanto o controle da co-cultura de LPS produziu valores elevados na faixa de elevado picograma e baixo nanograma. Estes resultados indicam que o D2E7 não induziu as células do sangue total a secretar citocinas ou a derramar proteínas celulares superficiais acima dos níveis normais em culturas *ex vivo*.

A parte de formação da presente apresentação é a Listagem de Sequência anexa, cujo conteúdo é resumido na tabela abaixo:

SEQ ID NO:	Cadeia de anticorpo	Região	Tipo de sequência
1	D2E7	VL	aminoácido
2	D2E7	VH	aminoácido
3	D2E7	VL CDR3	aminoácido
4	D2E7	VH CDR3	aminoácido
5	D2E7	VL CDR3	aminoácido
6	D2E7	VH CDR2	aminoácido
7	D2E7	vl CDR2	aminoácido
8	D2E7	VH CDR1	aminoácido
9	2SD4	VL	aminoácido
10	2SD4	VL CDR3	aminoácido
11	2SD4	VL CDR3	aminoácido
12	EP B12	VL CDR3	aminoácido
13	VL10E4	VL CDR3	aminoácido
14	VL100A9	VL CDR3	aminoácido
15	VLL100D2	VL CDR3	aminoácido
16	VLL0F4	VL CDR3	aminoácido
17	LOE5	VL CDR3	aminoácido
18	VLLOG7	VL CDR3	aminoácido
19	VLLOG9	VL CDR3	aminoácido
20	VLLOH1	VL CDR3	aminoácido
21	VLLOH10	VL CDR3	aminoácido
22	VL1B7	VL CDR3	aminoácido
23	VL1C1	VL CDR3	aminoácido
24	VL0.1F4	VL CDR3	aminoácido
25	VL0.1H8	VL CDR3	aminoácido
26	LOE7.A	VL CDR3	aminoácido
27	2SD4	VH CDR3	aminoácido
28	VH1B11	VH CDR3	aminoácido
29	VH1D8	VH CDR3	aminoácido
30	VH1A11	VH CDR3	aminoácido
31	VH1B12	VH CDR3	aminoácido
32	VH1E4	VH CDR3	aminoácido
33	VH1F6	VH CDR3	aminoácido
34	3C-H2	VH CDR3	aminoácido
35	VH1-D2.N	VH CDR3	aminoácido
36	D2E7	VL	ácido nucleico
37	D2E7	VH	ácido nucleico

EQUIVALENTES

Aqueles versados na arte reconhecerão, ou estarão aptos a averiguar, usando nada mais do que a experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção aqui descrita. Tais equivalentes são entendidos como abarcados pelas reivindicações seguintes.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE:

(A) NOME: BASF Aktiengesellschaft

(B) RUA: Carl-Bosch Str. 38

(C) CIDADE: 67056 Ludwigshafen

(D) ESTADO: Rheinland-Pfalz

(E) PAÍS: República Federal da Alemanha

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Anticorpos Humanos que se ligam a TNFα Humano

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 37

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) DESTINATÁRIO: LAHIVE & COCKFIELD

(B) RUA: 60 State Street, suite 510

(C) CIDADE: Boston

(D) ESTADO: Massachusetts

(E) PAÍS: Estados Unidos

(F) CÓDIGO POSTAL: 02109-1875

(v) FORMA LEGÍVEL DE COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: disco flexível

(B) COMPUTADOR: PC IBM compatível

(C) SISTEMA DE OPERAÇÃO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release 1,0, Versão 1:25

(vi) DADOS DO PEDIDO ATUAL:

(A) NÚMERO DO PEDIDO:

(B) DATA DE ARQUIVAMENTO:

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:

(A) NÚMERO DO PEDIDO: U.S. 08/599.226

(B) DATA DE DEPÓSITO: 09 DE FEVEREIRO DE 1996

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:

(A) NÚMERO DO PEDIDO: U.S. 60/031.476

(B) DATA DE DEPÓSITO: 25 DE NOVEMBRO DE 1996

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÃO DO REPRESENTANTE/AGENTE:

(A) NOME: DeConti, Giulio A., Jr.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 31.503

(C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/CERTIFICADO: BBI-043CPPC

(ix) INFORMAÇÃO DE TELECOMUNICAÇÃO:

(A) TELEFONE: (617) 227-7400

(B) TELEFAX: (617) 227-5941

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 107 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 1:

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 121 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 2:

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
```

```
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) ASPECTO:

(A) NOME/CHAVE: sítio modificado

(B) LOCALIZAÇÃO: 9

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /note= "Xaa é Thr ou Ala"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 3:

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) ASPECTO:

(A) NOME/CHAVE: sítio modificado

(B) LOCALIZAÇÃO: 12

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /note= "Xaa é Tyr ou Asn"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 4:

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 5:

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 17 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 6:

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

(2) INFORMAÇAO PARA A SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 7:

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 8:

Asp Tyr Ala Met His

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 107 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 9:

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

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

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

```
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
                85                  90                  95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 121 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEO. ID. NO: 10:

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 11:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 12:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 13:

Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 14:

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 15:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 16:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 16:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 17:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 18:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 19:

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 20:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 21:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 22:

Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 23:

Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 24:

Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 25:

Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 26:

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 27:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn

1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 28:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys

1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 29:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 30:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp

1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 31:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 32:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr

1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 33:

Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr

1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 34:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr

1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 35:

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn

1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 321 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) FILAMENTO: duplo

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 36:

```
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGGGA CAGAGTCACC    60
ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA   120
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAATCAGG GGTCCCATCT   180
CGGTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT   240
GAAGATGTTG CAACTTATTA CTGTCAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG   300
GGGACCAAGG TGGAAATCAA A                                             321
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 363 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO: 37:

```
GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC    60
TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCGGCAAGCT   120
CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GGTCTCAGCT ATCACTTGGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT   180
GCGGACTCTG TGGAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT   240
CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG   300
TACCTTAGCA CCGCGTCCTC CCTTGACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGT CACCGTCTCG   360
AGT                                                                363
```

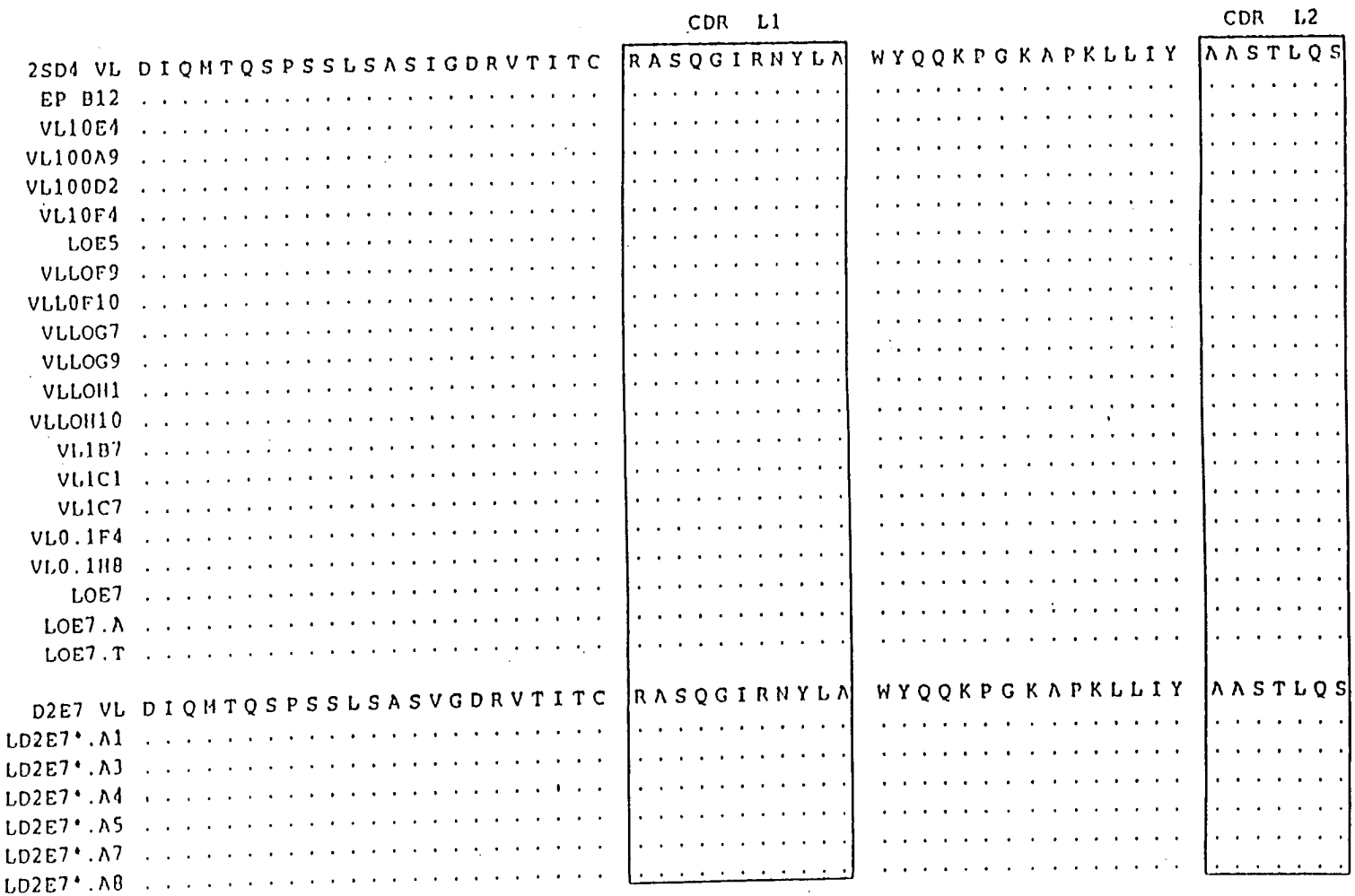

CDR L1
CDR L2
2SD4 VL DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITC RASQGIRNYLA WYQQKPGKAPKLLIY AASTLQS
EP B12
VL10E4
VL100A9
VL100D2
VL10F4
LOE5
VLLOF9
VLL0F10
VLLOG7
VLLOG9
VLLOH1
VLLOH10
VL1B7
VL1C1
VL1C7
VL0.1F4
VL0.1H8
LOE7
LOE7.A
LOE7.T
D2E7 VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGIRNYLA WYQQKPGKAPKLLIY AASTLQS
LD2E7*.A1
LD2E7*.A3
LD2E7*.A4
LD2E7*.A5
LD2E7*.A7
LD2E7*.A8

FIGURA 1A

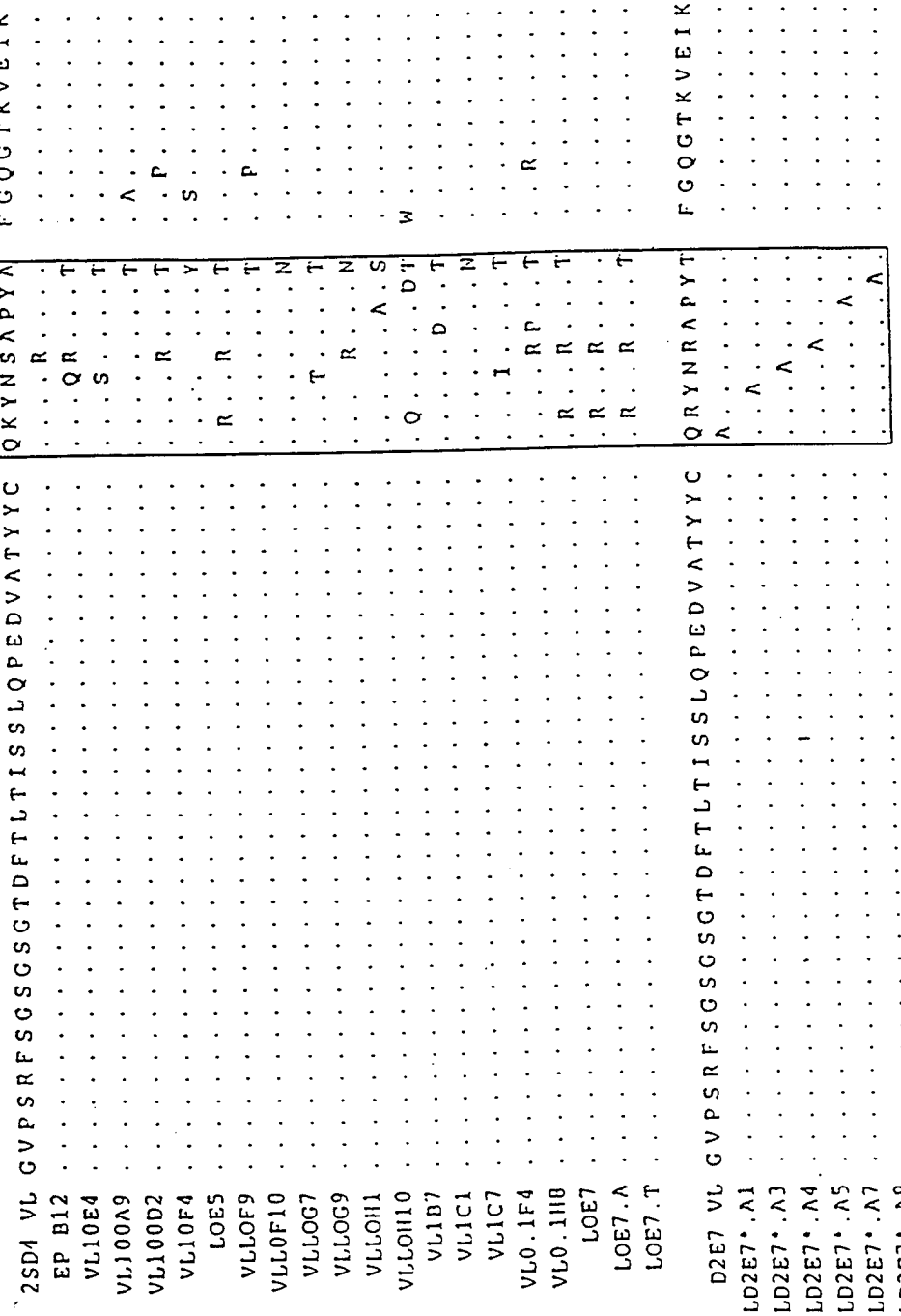

CDR L3
1 2 3 4 5 6 7 8 9
2SD4 VL GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QKYNSAPYA FGQGTKVEIK
EP B12
VL10E4
VL100A9
VL100D2
VL10F4
LOE5
VLLOF9
VLLOF10
VLLOG7
VLLOG9
VLLOH1
VLLOH10
VL1B7
VL1C1
VL1C7
VL0.1F4
VL0.1H8
LOE7
LOE7.A
LOE7.T
D2E7 VL GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QRYNRAPYT FGQGTKVEIK
LD2E7*.A1
LD2E7*.A3
LD2E7*.A4
LD2E7*.A5
LD2E7*.A7
LD2E7*.A8

FIGURA 1B

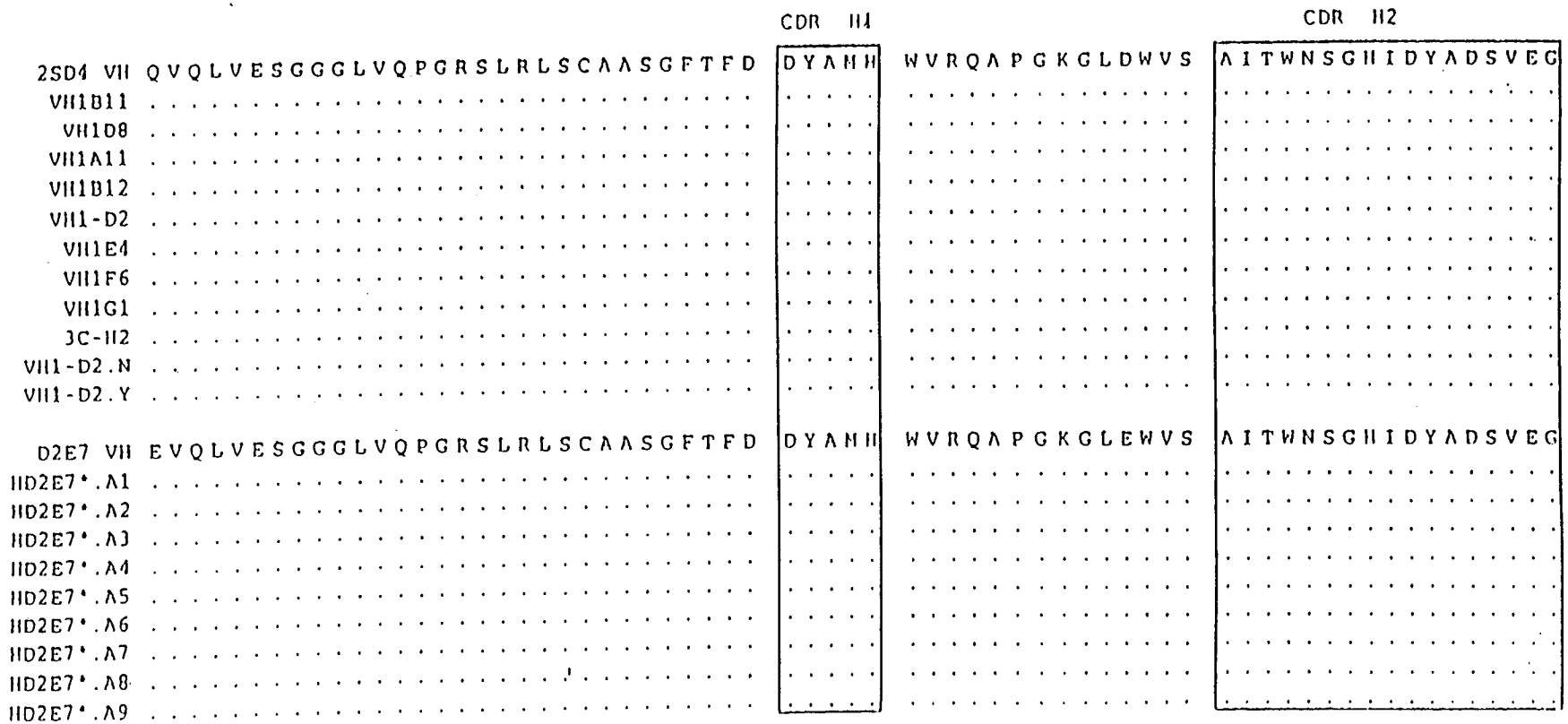

CDR H1
CDR H2
2SD4 VH QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD DYAMH WVRQAPGKGLDWVS AITWNSGHIDYADSVEG
VH1B11
VH1D8
VH1A11
VH1B12
VH1-D2
VH1E4
VH1F6
VH1G1
3C-H2
VH1-D2.N
VH1-D2.Y
D2E7 VH EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD DYAMH WVRQAPGKGLEWVS AITWNSGHIDYADSVEG
HD2E7*.A1
HD2E7*.A2
HD2E7*.A3
HD2E7*.A4
HD2E7*.A5
HD2E7*.A6
HD2E7*.A7
HD2E7*.A8
HD2E7*.A9

FIGURA 2A

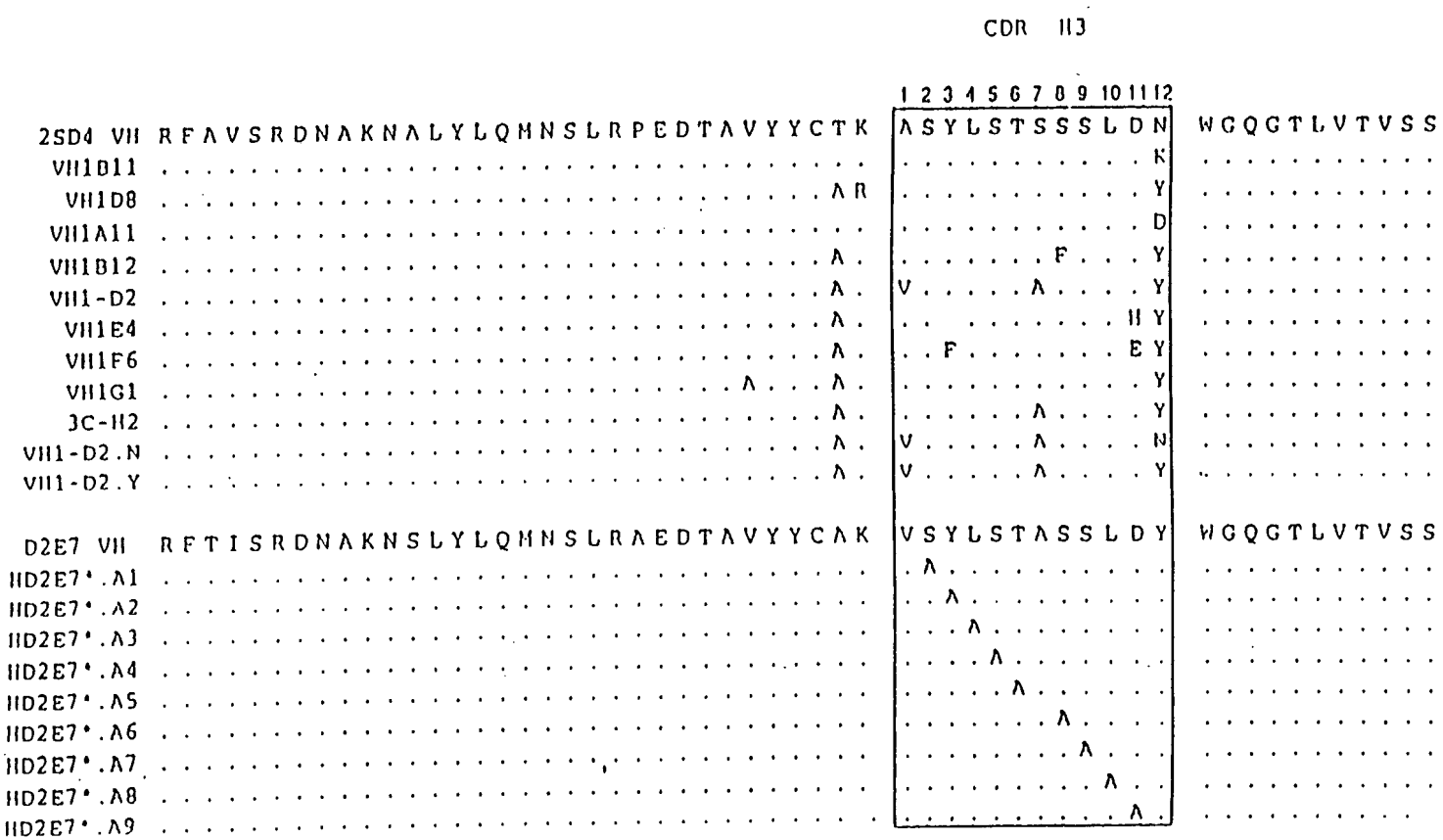

CDR H3
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
2SD4 VH R F A V S R D N A K N A L Y L Q M N S L R P E D T A V Y Y C T K A S Y L S T S S S L D N W G Q G T L V T V S S
VH1B11 K
VH1D8 A R Y
VH1A11 D
VH1B12 A F Y
VH1-D2 A V A Y
VH1E4 A H Y
VH1F6 A F E Y
VH1G1 A A Y
3C-H2 A Y
VH1-D2.N A V A N
VH1-D2.Y A V A Y
D2E7 VH R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K V S Y L S T A S S L D Y W G Q G T L V T V S S
HD2E7*.A1 A
HD2E7*.A2 A
HD2E7*.A3 A
HD2E7*.A4 A
HD2E7*.A5 A
HD2E7*.A6 A
HD2E7*.A7 A
HD2E7*.A8 A
HD2E7*.A9 A

FIGURA 2B

FIGURA 3

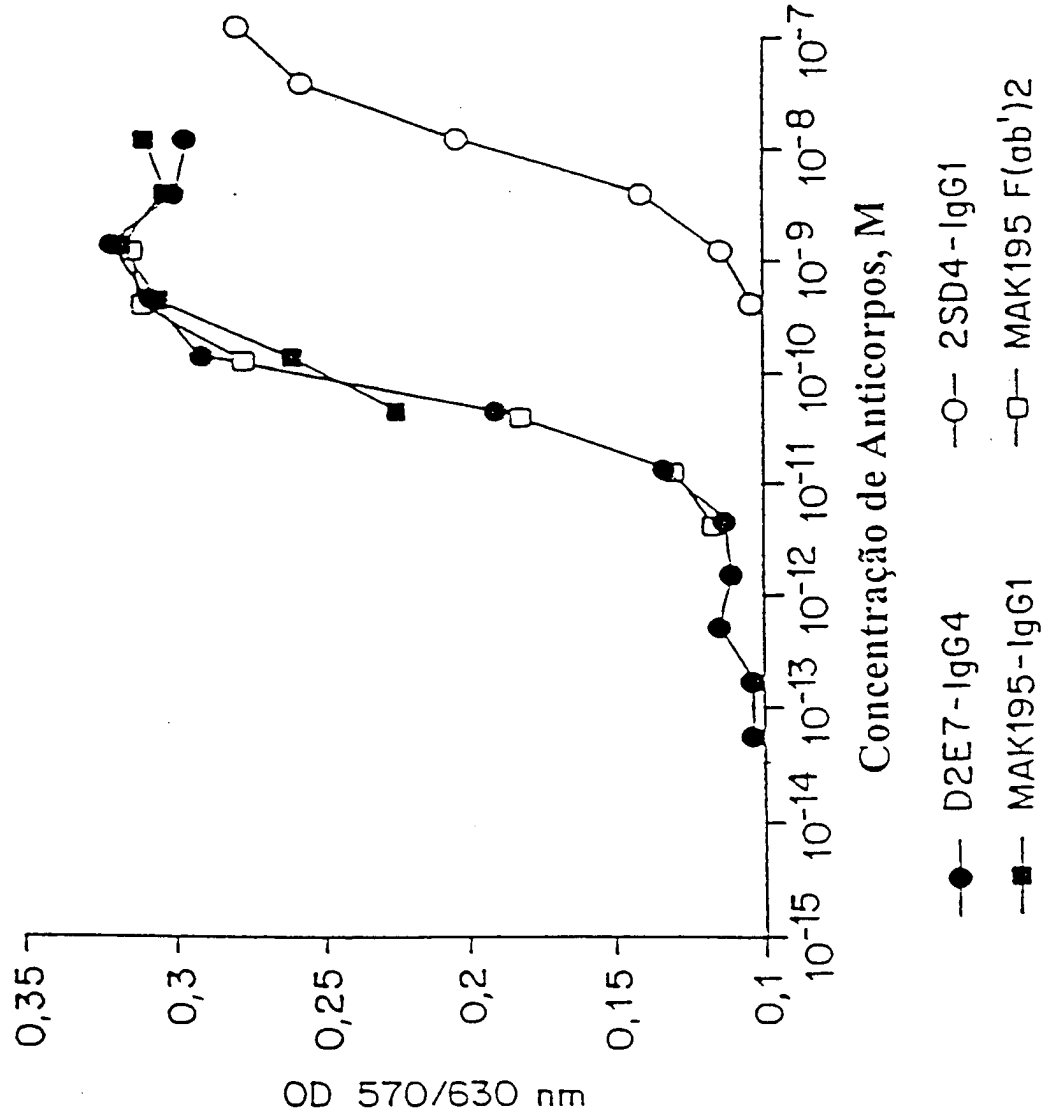

OD 570/630 nm
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
10^{-15} 10^{-14} 10^{-13} 10^{-12} 10^{-11} 10^{-10} 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7}
Concentração de Anticorpos, M
D2E7-IgG4
2SD4-IgG1
MAK195-IgG1
MAK195 F(ab')2

FIGURA 4

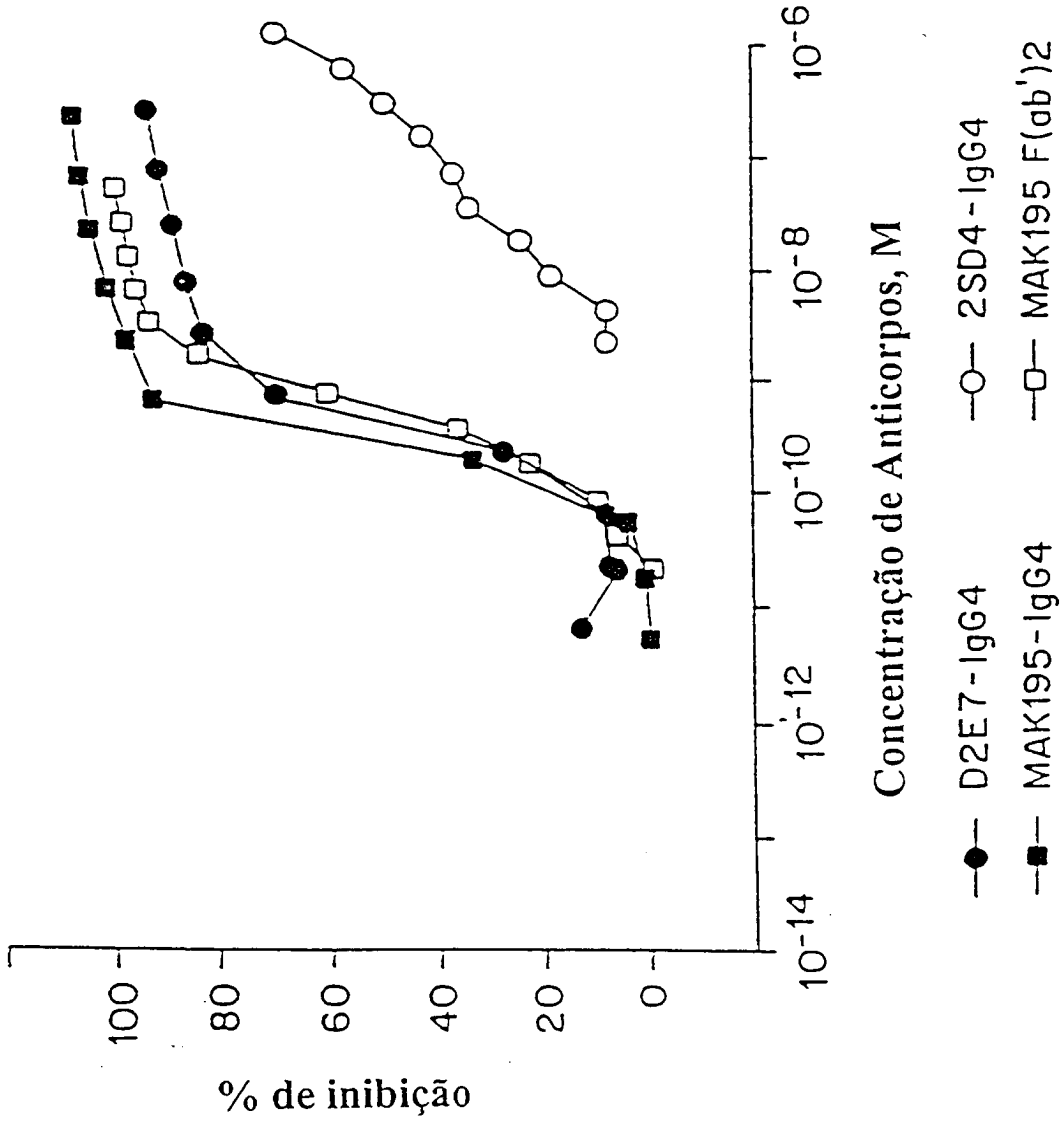

% de inibição
100
80
60
40
20
0
10-14
10-12
10-10
10-8
10-6
Concentração de Anticorpos, M
D2E7-IgG4
2SD4-IgG4
MAK195-IgG4
MAK195 F(ab')2

FIGURA 5

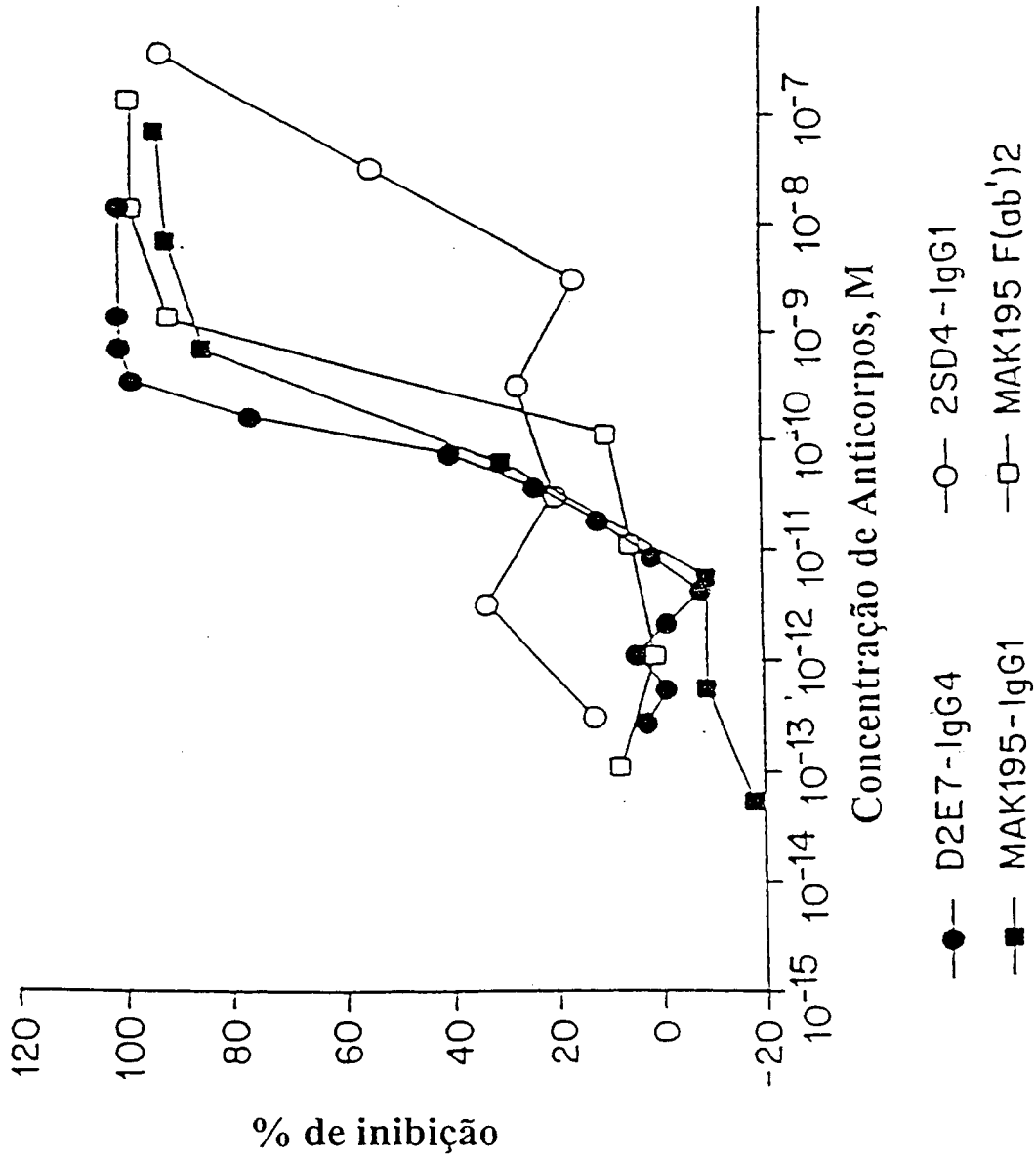
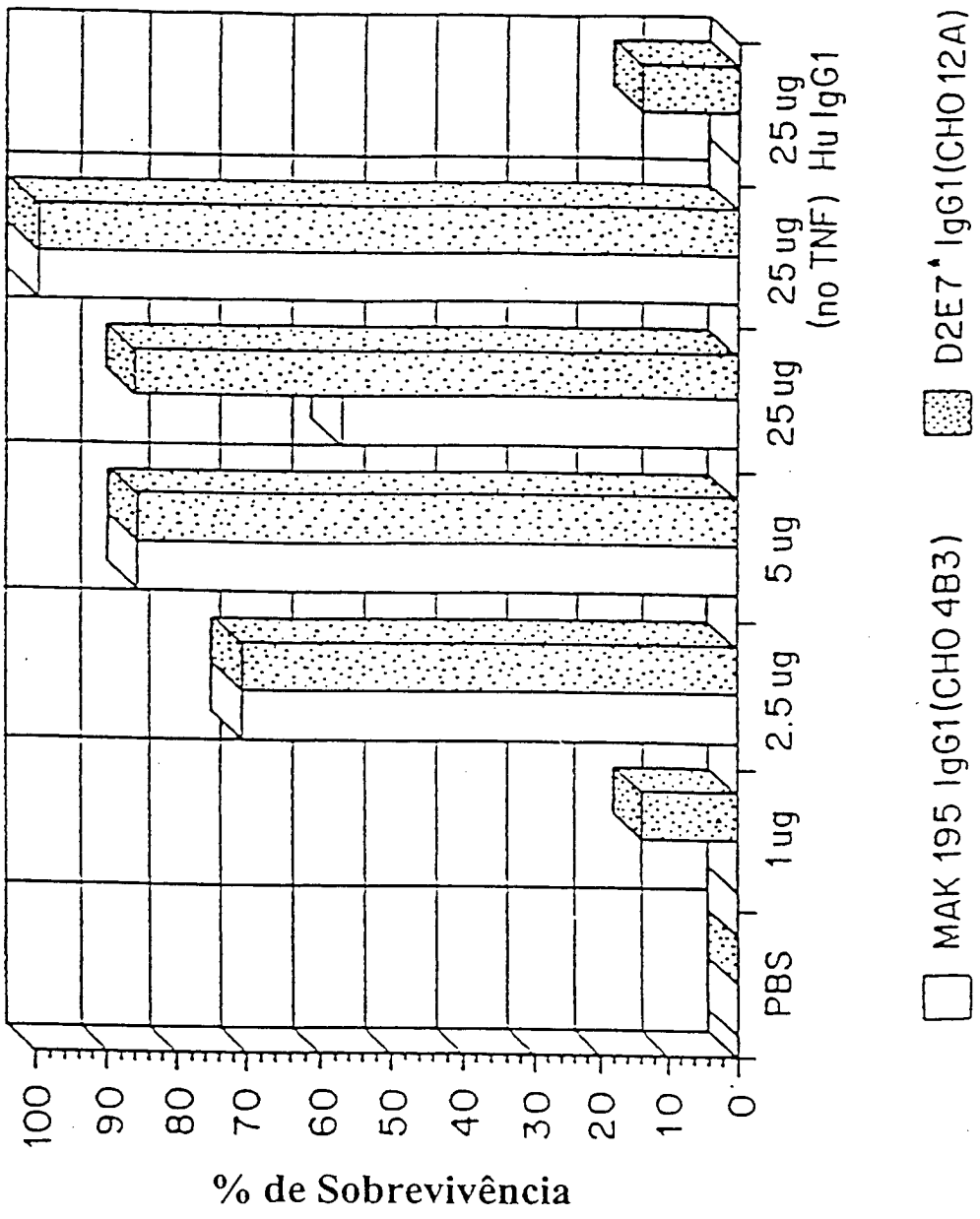

% de inibição
120
100
80
60
40
20
0
-20
10-15 10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
Concentração de Anticorpos, M
D2E7-IgG4
2SD4-IgG1
MAK195-IgG1
MAK195 F(ab')2

FIGURA 6


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% de Sobrevivência
PBS
1 ug
2.5 ug
5 ug
25 ug
25 ug (no TNF) Hu IgG1
25 ug
MAK 195 IgG1(CHO 4B3)
D2E7 IgG1(CHO 12A)

D2E7 VL

```
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA
 D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V

                                                CDR L1
GGG GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCA AGT CAG GGC ATC AGA
 G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   R

AAT TAC TTA GCC TGG TAT CAG CAA AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG
 N   Y   L   A   W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K

                                CDR L2
CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ACT TTG CAA TCA GGG GTC CCA TCT
 L   L   I   Y   A   A   S   T   L   Q   S   G   V   P   S

CGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC
 R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T   L   T   I

AGC AGC CTA CAG CCT GAA GAT GTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA AGG
 S   S   L   Q   P   E   D   V   A   T   Y   Y   C   Q   R

  CDR L3
TAT AAC CGT GCA CCG TAT ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG GTG GAA
 Y   N   R   A   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   V   E

ATC AAA
 I   K
```

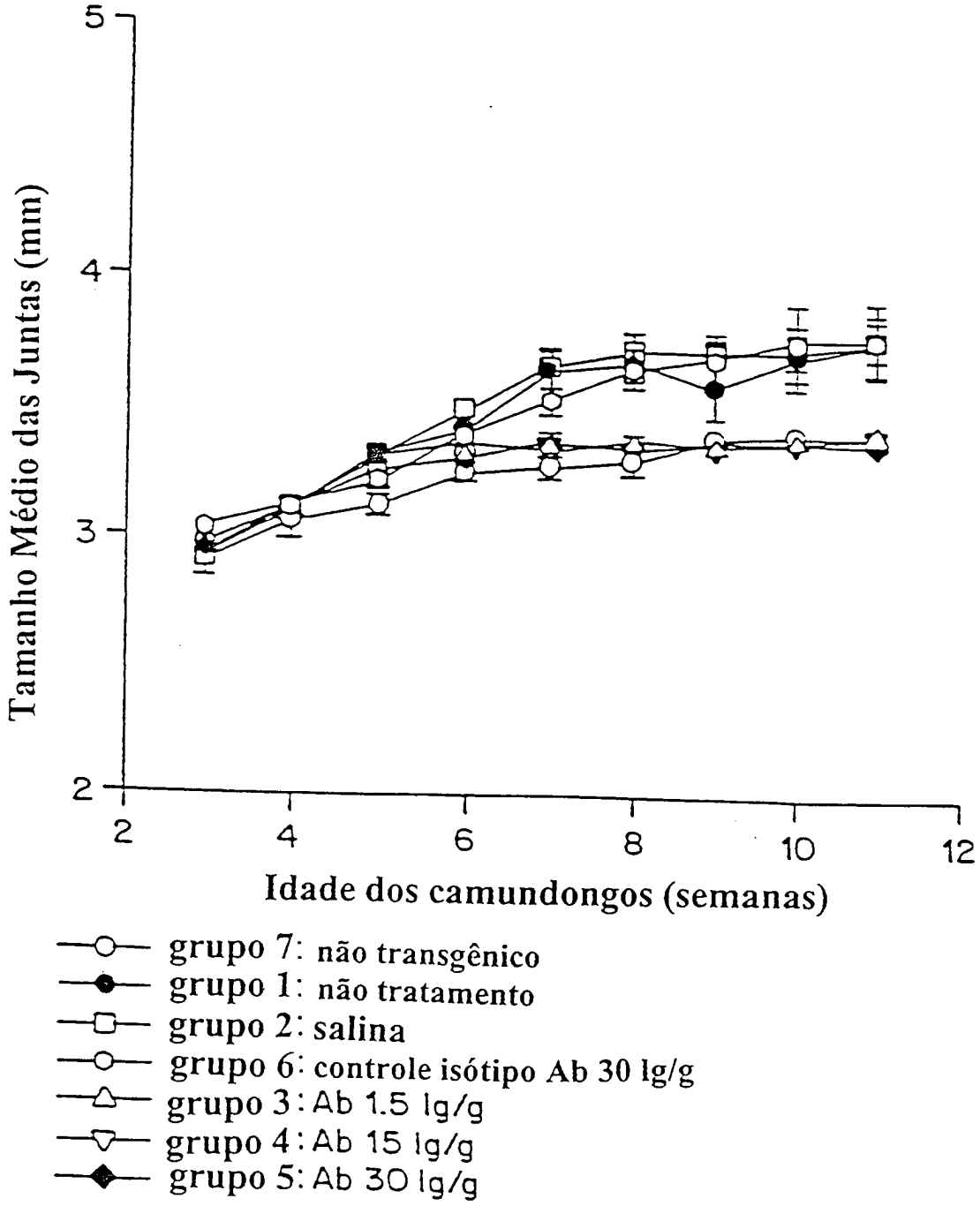
FIGURA 7

D2E7 VH

```
GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCC GGC
 E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G

AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCG GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT
 R   S   L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   D

        CDR H1
GAT TAT GCC ATG CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG
 D   Y   A   M   H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L

                                        CDR H2
GAA TGG GTC TCA GCT ATC ACT TGG AAT AGT GGT CAC ATA GAC TAT
 E   W   V   S   A   I   T   W   N   S   G   H   I   D   Y

GCG GAC TCT GTG GAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC
 A   D   S   V   E   G   R   F   T   I   S   R   D   N   A

AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAT
 K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D

                                                CDR H3
ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAA GTC TCG TAC CTT AGC ACC GCG
 T   A   V   Y   Y   C   A   K   V   S   Y   L   S   T   A

TCC TCC CTT GAC TAT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTC TCG
 S   S   L   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S

AGT
 S
```

FIGURA 8

FIGURA 9


Tamanho Médio das Juntas (mm)
5
4
3
2
2
4
6
8
10
12
Idade dos camundongos (semanas)
grupo 7: não transgênico
grupo 1: não tratamento
grupo 2: salina
grupo 6: controle isótipo Ab 30 lg/g
grupo 3: Ab 1.5 lg/g
grupo 4: Ab 15 lg/g
grupo 5: Ab 30 lg/g

REIVINDICAÇÕES

1. Vetor recombinante de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender um ácido nucléico compreendendo uma seqüência que codifica um domínio CDR3 de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:3, ou modificado da SEQ ID NO:3 por uma substituição única de alanina nas posições 1, 4, 5, 7 ou 8, ou por uma a cinco substituições conservativas de aminoácido nas posições 1, 3, 4, 6, 7, 8 e/ou 9, onde o vetor compreende um marcador selecionável e uma seqüência de controle transcricional operativamente ligada ao ácido nucléico.

2. Vetor recombinante de expressão, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve do anticorpo (LCVR).

3. Vetor recombinante de expressão, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o domínio CDR2 da LCVR do anticorpo compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:5.

4. Vetor recombinante de expressão, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o domínio CDR1da LCVR do anticorpo compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:7.

5. Vetor recombinante de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um ácido nucléico compreendendo uma seqüência que codifica um domínio CDR3 de cadeia pesada da seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:4, ou modificado da SEQ ID NO:4 por uma substituição única de

alanina nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, ou 11, ou por uma a cinco substituições conservativas de aminoácido nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e/ou 12, onde o vetor compreende um marcador selecionável e uma seqüência de controle transcricional operativamente ligada ao ácido nucléico.

6. Vetor recombinante de expressão, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada do anticorpo.

7. Vetor recombinante de expressão, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o domínio CDR2 do HCVR do anticorpo compreende a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO:6.

8. Vetor recombinante de expressão, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o domínio CDR1 do HCVR do anticorpo compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:8.

9. Vetor de expressão recombinante, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um ácido nucléico compreendendo uma seqüência que codifica um domínio CDR3 compreendendo uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID

NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 e SEQ ID NO:34, onde o vetor compreende um marcador selecionável e uma seqüência de controle transcricional operativamente ligada ao ácido nucléico.

10. Vetor recombinante de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um ácido nucléico compreendendo uma seqüência que codifica uma região variável de cadeia leve do anticorpo compreendendo a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO:1, onde o vetor compreende um marcador selecionável e uma seqüência de controle transcricional operativamente ligada ao ácido nucléico.

11. Vetor recombinante de expressão, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a região variável de cadeia leve do anticorpo e uma região constante de cadeia leve do anticorpo.

12. Vetor recombinante de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um ácido nucléico compreendendo uma seqüência que codifica uma região variável de cadeia pesada do anticorpo compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2, onde o vetor compreende um marcador selecionável e uma seqüência de controle transcricional operativamente ligada ao ácido nucléico.

13. Vetor recombinante de expressão, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a região variável de cadeia pesada do anticorpo e uma região constante de cadeia pesada do anticorpo.

14. Vetor recombinante de expressão, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a

região constante de cadeia pesada do anticorpo é uma região constante IgG1.

15. Vetor recombinante de expressão, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região constante de cadeia pesada do anticorpo é uma região constante IgG4.

16. Vetor recombinante de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um ácido nucléico compreendendo uma seqüência que codifica:

(a) uma cadeia leve do anticorpo tendo uma região variável compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:1; e

(b) uma cadeia pesada do anticorpo tendo uma região variável compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, onde o vetor compreende um marcador selecionável e uma seqüência de controle transcricional operativamente ligada ao ácido nucléico.

17. Célula hospedeira procariótica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que dentro da qual o vetor recombinante de expressão, conforme definido na reivindicação 16, tenha sido introduzido.

18. Vetor recombinante de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um ácido nucléico compreendendo SEQ ID NO:36, onde o vetor compreende um marcador selecionável e uma seqüência de controle transcricional operativamente ligada ao ácido nucléico.

19. Vetor recombinante de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um ácido nucléico

compreendendo SEQ ID NO:37, onde o vetor compreende um marcador selecionável e uma seqüência de controle transcricional operativamente ligada ao ácido nucléico.

RESUMO

"VETOR RECOMBINANTE DE EXPRESSÃO, E CÉLULA HOSPEDEIRA PROCARIÓTICA"

São apresentados os anticorpos dos seres humanos, preferivelmente os anticorpos recombinantes dos seres humanos, que especificamente se ligam ao fator α de necrose tumoral humana (hTNFα). Estes anticorpos têm alta afinidade por hTNFα (por exemplo, K_d = 10^{-8} M ou menos), um índice muito lento para dissociação do hTNFα (por exemplo, K_{off} = 10^{-3} seg^{-1} ou menos) e neutraliza a atividade do hTNFα *in vitro* e *in vivo*. Um anticorpo da invenção pode ser um anticorpo de comprimento completo ou uma porção deste de ligação de antígeno. Os anticorpos, ou as porções dos anticorpos, da invenção, são úteis para detectar hTNFα e para inibir a atividade do hTNFα, por exemplo em um indivíduo humano sofrendo de um distúrbio em que a atividade do hTNFα seja prejudicial. Os ácidos nucleicos, vetores e células hospedeiras para expressar os anticorpos recombinantes de seres humanos da invenção, e os processos de sintetização dos anticorpos recombinantes de seres humanos, são também abrangidos pela invenção.