



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0614040-8 B1



(22) Data do Depósito: 18/07/2006

(45) Data de Concessão: 04/02/2020

(54) Título: ANTICORPO ISOLADO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE A B7RP1, POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, LINHAGEM CELULAR ISOLADA E MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE B7RP1 EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA E DE PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO OU POLIPEPTÍDEO

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; A61P 37/00; A61P 11/06; A61K 39/395; G01N 33/68; (...).

(30) Prioridade Unionista: 18/07/2005 US 60/700,265.

(73) Titular(es): E.R. SQUIBB & SONS, LLC; AMGEN INC.

(72) Inventor(es): GERALD SIU; WENYAN SHEN; STEVEN KIYOSHI YOSHINAGA; HAICHUN HUANG.

(86) Pedido PCT: PCT US2006027862 de 18/07/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/011941 de 25/01/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/01/2008

(57) Resumo: ANTICORPOS NEUTRALIZADORES ANTI-B7RP1 HUMANOS. A presente invenção refere-se a anticorpos que interagem com ou se ligam a proteína-1 relacionada a 67 humana (B7RP1) e anticorpos que se ligam a e neutralizam a função de B7RP1. A invenção também refere-se a composições farmacêuticas dos ditos anticorpos e métodos para neutralizar a função de B7RP1 e, particularmente, para o tratamento de distúrbios imunes (por exemplo, resposta imune inapropriada), por administração de uma quantidade farmacêuticamente eficaz de anticorpos anti-B7RP1. Também refere-se a métodos de detecção da quantidade de B7RP1 em uma amostra usando anticorpos anti-B7RP1.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"ANTICORPO ISOLADO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE A B7RP1, POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, LINHAGEM CELULAR ISOLADA E MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE B7RP1 EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA E DE PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO OU POLIPEPTÍDEO".

[0001] Este pedido reivindica a prioridade do pedido de patente provisória norte-americana nº de série 60/700.265, depositado em 18 de julho de 2005, cuja descrição é explicitamente aqui incorporada por referência.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção refere-se a anticorpos monoclonais humanos que se ligam à proteína-1 relacionada a B7 (B7RP1). Também se descrevem composições e métodos para o tratamento de doenças e distúrbios relacionados a imunossupressão e ativação imune.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] Células T iniciam a resposta imune, medeiam funções efetoras específicas para antígenos e regulam a atividade de outros leucócitos por secreção de citocinas. Para a geração de uma resposta imune de linfócitos T (células T) apropriada, dois sinais têm de ser fornecidos à célula T pelas células apresentadoras de antígenos (APC). O antígeno tem de ser apresentado ao receptor de célula T (TCR) mediante um complexo de histocompatibilidade maior (MHC), em um evento que determina especificidade. As células T só podem reconhecer o antígeno apresentado em uma APC. Além do receptor de antígeno, uma ativação de células T apropriada também requer a interação de outras moléculas de superfície celular tanto na célula T, quanto na APC. Essas moléculas, chamadas de moléculas co-

estimuladoras, consistem em um receptor na célula responsiva e um ligante presente na célula indutora. Esse sinal co-estimulador independente de antígeno tem de ser fornecido por engajamento de membros da família B7 na APC com seus receptores em células T. Uma resposta imune produtiva leva à proliferação, diferenciação, expansão clonal e função efetora. Na ausência do segundo sinal co-estimulador, as células T sofrem de um estado de não responsividade específicas para antígenos de longa duração, chamado de anergia. Experimentos clínicos em fase II demonstraram que o bloqueio de uma via co-estimuladora é eficaz no tratamento de psoríase (Abrams et al., 2000, J Exp Med. 192: 681-94; Abrams et al., 1999, J. Clin. Invest. 103: 1243-52) e artrite reumatóide (Kremer et al., 2003, New England Journal of Medicine 349: 1907-15), indicando que essa estratégia geral é um bom alvo para terapia imunomoduladora.

[0004] Uma molécula B7 co-estimuladora particular, a proteína-1 relacionada a B7 (B7RP1), é uma proteína transmembrana do tipo 1 com uma sequência de sinal e domínio extracelular na terminação amino, um domínio extracelular compreendendo duas alças Ig, um domínio transmembrana e um domínio intracelular carboxi terminal (Publicação de Pedido PCT nº WO 00/46240). B7RP1 se liga preferencialmente a ICOS (que significa "co-estimulador induzível"; Yoshinga et al., 2000, Int. Immun. 12: 1439-1447) expressado na superfície celular de células T. ICOS desempenha um importante papel na produção tanto de citocinas do tipo 1, quanto do tipo 2 por células T ativadas (Coyle et al., 2000, Immunity 13: 95-105).

[0005] B7RP1 é o único ligante expressado constitutivamente em APCs (Yoshinaga et al., 1999, Nature 402: 827-32), ao passo que ICOS é expressado apenas em células T ativadas (McAdam et al., 2000, Journal of Immunology 165: 5035-40). A sinalização dependente de B7RP1 é requerida para a ativação da célula T efetora (isto é,

completamente ativada), assim como sua maturação a partir de seu precursor virgem (Dong et al., 2003, Journal of Autoimmunity. 21: 255-60; Coyle et al., 2000, Immunity. 13: 95-105). Consequentemente, a interação B7RP1/ICOS é requerida para respostas imunes de recordação dependentes de células T apropriadas (Dong et al., 2003, Journal of Autoimmunity. 21: 255-60).

[0006] As atuais tentativas de interferir com a via de células T co-estimuladora focalizaram principalmente em polipeptídeos co-estimuladores que bloqueiem apenas a ativação de células T, mas não focalizou na ativação e maturação. Consequentemente, essas terapias proporcionam uma inibição geral da função de células T. Em contraste, o bloqueio da interação B7RP1/ICOS em um ambiente clínico é altamente desejável, porque proporcionaria um perfil de efeitos colaterais mais limitado do que terapias de co-estimulação que bloqueiam apenas a ativação de células T virgens.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0007] A invenção apresenta anticorpos monoclonais que se ligam à proteína-1 relacionada a B7 (B7RP1). Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais são anticorpos monoclonais humanos que neutralizam as atividades biológicas de B7RP1 e são particularmente úteis para inibir parcial ou completamente a atividade co-estimuladora imune de B7RP1. Também são apresentadas pela invenção células, particularmente células de hibridoma, que produzem os anticorpos monoclonais da invenção. Em aspectos particulares, os anticorpos da invenção se ligam especificamente à região H ou D de B7RP1, conforme aqui descrito.

[0008] A invenção também apresenta proteínas de fusão compreendendo a sequência de uma região Fc de anticorpo e uma ou mais sequências identificadas como SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 40. Essas moléculas podem ser preparadas usando-se métodos descritos,

por exemplo, no Pedido de Patente Internacional, Publicação nº WO 00/24782, que é aqui incorporada por referência. Essas moléculas podem ser expressadas, por exemplo, em células de mamíferos (por exemplo, células de ovário de hamster chinês) ou células bacterianas (por exemplo, células de E. coli).

[0009] Em certos aspectos, a invenção apresenta anticorpos compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia pesada compreende uma região constante de cadeia pesada selecionada das regiões constantes de cadeia pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE ou quaisquer de suas variações alélicas (conforme discutido em Kabat et al., 1991, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Quinta Edição, Departamento Norte-americano de Saúde e Serviços Humanos, Publicação NIH nº 91/3242), aqui incorporado por referência, e a região variável da cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrita na qualquer uma das SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 14, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional. Um anticorpo da invenção compreende uma sequência de aminoácidos da região constante de cadeia pesada de IgG2, conforme descrita na SEQ ID NO: 41, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional, ou uma sequência de aminoácidos da região constante de cadeia pesada de IgG1, conforme descrita na SEQ ID NO: 42, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional. Em certas modalidades, os anticorpos são anticorpos monoclonais, anticorpos humanos ou, de preferência, anticorpos monoclonais humanos.

[00010] Em certos aspectos, a invenção apresenta anticorpos compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia leve compreende uma região constante com uma sequência de

aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 43 ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional, e a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional. Em certas modalidades, os anticorpos são anticorpos monoclonais, anticorpos humanos ou, de preferência, anticorpos monoclonais humanos.

[00011] Em certos aspectos, os anticorpos da invenção compreendem uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a região variável da cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional. Em outros aspectos, a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 1, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

[00012] Em outros aspectos, os anticorpos da invenção compreendem uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a região variável da cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 9, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional. Em outros aspectos, a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 2, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

[00013] Em aspectos adicionais, a cadeia pesada compreende pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) com uma sequência de aminoácidos conforme descrita em qualquer uma de SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO: 40, ou seu fragmento de

imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional. Em ainda outros aspectos, a cadeia leve compreende pelo menos uma CDR com uma sequência de aminoácidos conforme descrita em qualquer uma de SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 26, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

[00014] A invenção também apresenta anticorpos que se ligam especificamente a B7RP1, em que a cadeia pesada compreende uma região variável compreendendo uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional, e a cadeia leve compreende uma região variável compreendendo uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 1, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

[00015] Além disso, a invenção apresenta anticorpos que se ligam especificamente a B7RP1, em que a cadeia pesada compreende uma região variável compreendendo uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 9, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional, e a cadeia leve compreende uma região variável compreendendo uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 2, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

[00016] Em certos aspectos, a invenção também apresenta anticorpos compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada, e em que a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência que tenha pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos cerca de 99% de identidade com a sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 14, e em que a cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve, e em que a região variável de cadeia leve compreende uma sequência que tenha pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos cerca de 99% de identidade com a sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, e em que o anticorpo se liga especificamente a B7RP1.

[00017] A invenção também apresenta anticorpos que se ligam especificamente a B7RP1, em que a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 44 ou SEQ ID NO: 46, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional, e a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 45, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

[00018] A invenção também apresenta anticorpos que se ligam especificamente a B7RP1, em que a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 47, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional, e a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 48, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

[00019] Em certos aspectos, a invenção apresenta anticorpos compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada, e em que a região variável de cadeia pesada compreende pelo menos

uma CDR com uma sequência que tenha pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos cerca de 99% de identidade com a sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO: 40, e em que a cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve, e em que a região variável de cadeia leve compreende pelo menos uma CDR com uma sequência que tenha pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos cerca de 99% de identidade com a sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 26, e em que o anticorpo se liga especificamente a B7RP1.

[00020] A invenção também apresenta anticorpos de cadeia única, anticorpos Fv de cadeia única, anticorpos F(ab), anticorpos F(ab)' e anticorpos (Fab')₂.

[00021] Em aspectos particulares, a invenção apresenta uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos conforme descrita na SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 26, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

[00022] Além disso, a invenção apresenta uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos conforme descrita em qualquer uma de SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO: 40, ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

[00023] A invenção também refere-se a anticorpos humanos isolados que se ligam especificamente a B7RP1, em que o anticorpo compreende: (a) regiões de armação de cadeia pesada humanas, uma região de CDR1 de cadeia pesada humana, uma região de CDR1 de cadeia pesada humana e uma região de CDR3 de cadeia pesada

humana; e (b) regiões de armação de cadeia leve humanas, uma região de CDR1 de cadeia leve humana, uma região de CDR1 de cadeia leve humana e uma região de CDR3 de cadeia leve humana. Em certos aspectos, a região de CDR1 de cadeia pesada humana pode ser a região de CDR1 de cadeia pesada conforme mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 27, 30 ou 35, e a região de CDR1 de cadeia leve humana pode ser a região de CDR1 de cadeia leve mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 15, 18 ou 24. Em outros aspectos, a região de CDR2 de cadeia pesada humana pode ser a região de CDR2 de cadeia pesada conforme mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 28, 31, 33, 36 ou 39, e a região de CDR2 de cadeia leve humana pode ser a região de CDR2 de cadeia leve mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 16, 19 ou 21. Em ainda outros aspectos, a região de CDR3 de cadeia pesada humana pode ser a região de CDR3 de cadeia pesada conforme mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 29, 32, 34, 37, 38 ou 40, e a região de CDR3 de cadeia leve humana pode ser a região de CDR3 de cadeia leve mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 17, 20, 22, 23, 25 ou 26.

[00024] Os anticorpos da invenção se caracterizam pela capacidade de se ligarem especificamente a B7RP1. Além disso, os anticorpos da invenção têm a capacidade de antagonizar pelo menos uma atividade *in vitro* e/ou *in vivo* associada a polipeptídeos B7RP1. A invenção apresenta anticorpos humanos anti-B7RP1 humano isolados com alta afinidade de ligação para polipeptídeos B7RP1, em que os anticorpos se ligam a um polipeptídeo B7RP1 humano e se dissociam do polipeptídeo B7RP1 humano com uma constante de dissociação (K_D) de cerca de 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, ou menos, conforme determinado usando-se KinExA, ou que inibem a sobrevivência induzida por B7RP1 em um ensaio de

neutralização *in vitro* com uma EC₅₀ de cerca de 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M, 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹¹ M, 10⁻¹² M, ou menos.

[00025] A invenção também apresenta anticorpos humanos isolados ou seus fragmentos de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcionais que se ligam especificamente a B7RP1, em que os anticorpos ou fragmentos compreendem uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada, em que:

a) a CDR1 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 27, a CDR2 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 28, e a CDR3 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 29;

b) a CDR1 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 30, a CDR2 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 31, e a CDR3 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 32;

c) a CDR1 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 27, a CDR2 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 33, e a CDR3 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 34;

d) a CDR1 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 35, a CDR2 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 36, e a CDR3 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 37;

e) a CDR1 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 27, a CDR2 de cadeia

pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 33, e a CDR3 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 38; ou

f) a CDR1 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 35, a CDR2 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 39, e a CDR3 de cadeia pesada tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 40.

[00026] A invenção também apresenta anticorpos humanos isolados ou seus fragmentos de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcionais que se ligam especificamente a B7RP1, em que os anticorpos ou fragmentos compreendem uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve, em que:

a) a CDR1 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 15, a CDR2 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 16, e a CDR3 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 17;

b) a CDR1 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 18, a CDR2 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 19, e a CDR3 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 20;

c) a CDR1 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 15, a CDR2 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 21, e a CDR3 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 22;

d) a CDR1 de cadeia leve tem uma sequência de

aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 18, a CDR2 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 19, e a CDR3 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 23;

e) a CDR1 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 24, a CDR2 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 16, e a CDR3 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 25; ou

f) a CDR1 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 24, a CDR2 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 16, e a CDR3 de cadeia leve tem uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID NO: 26.

[00027] A invenção também apresenta anticorpos que competem com a ligação dos anticorpos aqui descritos a B7RP1. Em certos aspectos, um anticorpo competitivo da invenção compete com a ligação de um anticorpo que compreende qualquer uma das SEQ ID NO: 1 – 40 a B7RP1 humano.

[00028] Também são parte da invenção sequências polinucleotídicas que codifiquem anticorpos humanos anti-B7RP1 humano, vetores compreendendo as sequências polinucleotídicas que codificam anticorpos humanos anti-B7RP1 humano, células hospedeiras transformadas com vetores incorporando polinucleotídeos que codificam anticorpos humanos anti-B7RP1 humano, formulações compreendendo anticorpos humanos anti-B7RP1 humano e métodos para sua preparação e uso.

[00029] A invenção também apresenta métodos para detectar B7RP1 em uma amostra biológica, compreendendo a etapa de contato da amostra com um anticorpo da invenção ou seu fragmento de

ligação a antígeno. Um anticorpo anti-B7RP1 da invenção pode ser empregado em qualquer método de ensaio conhecido, como ensaios de ligação competitiva, ensaios intercalados diretos e indiretos, ensaios de imunoprecipitação e ensaios imunossorventes ligados a enzima (ELISA) (vide, Sola, 1987, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158, CRC Press, Inc.) para a detecção e quantificação de B7RP1. Os anticorpos podem ser ligar a B7RP1 com uma afinidade que seja apropriada para o método de ensaio que é empregado.

[00030] Além disso, a invenção apresenta métodos para o tratamento de uma doença associada à produção aumentada de B7RP1, sensibilidade aumentada a B7RP1 e/ou doenças relacionadas ao controle de respostas de células T, compreendendo a etapa de administração de uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um anticorpo da invenção ou seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional a uma indivíduo necessitado.

[00031] As modalidades da invenção ficarão evidentes com a seguinte descrição detalhada e reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00032] A figura 1A representa a sequência de região variável de anticorpo 16H (SEQ ID NO: 7) e a sequência de região variável 16H de linhagem germinativa (16Hg) correspondente (SEQ ID NO: 8).

[00033] A figura 1B apresenta resultados de ensaios de co-estimulação usando anti-CD3 e proteína de fusão hB7RP1-Fc, demonstrando que 16Hg retém suas atividades biológicas em comparação com 16H.

[00034] A figura 2 mostra os resultados do ensaio de ligação Biacore® com anticorpos 16H, 16Hg e 5D.

[00035] A figura 3 mostra os resultados do ensaio de ligação

KinExA com anticorpo 5D.

[00036] A figura 4 mostra os resultados do ensaio de ligação KinExA com anticorpo 2H.

[00037] A figura 5 mostra os resultados do ensaio de ligação KinExA com anticorpo 2H de linhagem germinativa (2Hg).

[00038] A figura 6 apresenta os resultados de ensaios de ensaios de competição por ligação que mostram que o anticorpo 16H compete com ICOS-Fc pela ligação com B7RP-1, analisado por citometria de fluxo.

[00039] A figura 7 apresenta um resumo de uma análise de polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNP) de B7RP-1.

[00040] A figura 8 apresenta um resumo da análise de um conjunto de anticorpos monoclonais anti-B7RP-1 humano em ensaios de competição ELISA. Os valores mostrados estão em IC₅₀s para inibição de ligação de uma proteína de fusão ICOS-Fc.

[00041] A figura 9A mostra a coloração fluorescente do domínio extracelular (ECD) de B7RP1 com anticorpos 16H, 5D e ICOS marcados.

[00042] A figura 9B mostra uma eficácia de ligação similar de anticorpos 16H e 5D a uma variante SNP de B7RP1.

[00043] A figura 9C apresenta os resultados de ensaios de co-estimulação com anticorpos 16H e 5D e variantes SNP.

[00044] A figura 10A mostra um ensaio de co-estimulação em placa com anticorpos monoclonais 1B7v2 em comparação com inúmeros anticorpos monoclonais B7RP-1 antimurino diferentes.

[00045] As figuras 10B, 10C e 10D mostram os resultados de experimentos de desafio com antígenos, analisados para IgM (figura 10B), IgG2a (figura 10C) e IgG1 (figura 10D) séricas específicas para o antígeno.

[00046] A figura 11 apresenta resultados de ELISA demonstrando

que os níveis séricos de IL-5 são reprimidos por anticorpos 1B7v2.

[00047] A figura 12A mostra que anticorpos 16H podem se ligar a B7RP1 de macaco *Cynomolgus* (painel direito) e B7RP1 humano (painel esquerdo).

[00048] A figura 12B mostra que os anticorpos 16H, 16Hg e 5D podem inibir a ativação de células T dependente de B7RP1/ICOS de macaco *Cynomolgus*.

[00049] A figura 13A apresenta os valores de títulos de macacos *Cynomolgus* individuais e médio do grupo no dia 53 e dia 57 após o desafio secundário com toxóide tetânico no dia 42 em animais tratados com anticorpos 16H.

[00050] A figura 13B apresenta os valores de títulos de macacos *Cynomolgus* individuais e médio do grupo no dia 53 e dia 57 após o desafio secundário com toxóide tetânico no dia 42 em animais tratados com anticorpos 5D.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE CERTAS MODALIDADES

[00051] Os cabeçalhos de seções aqui usados são apenas para fins organizacionais e não devem ser tomados como limitativos da matéria descrita. Todas as referências citadas neste pedido são expressamente aqui incorporadas por referência para qualquer finalidade.

Definições

[00052] Técnicas convencionais podem ser usadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeos e cultura de tecido e transformação (por exemplo, eletroporação, lipofecção). Reações enzimáticas e técnicas de purificação podem ser efetuadas de acordo com as especificações do fabricante ou conforme comumente realizado na técnica ou conforme aqui descrito. As técnicas e procedimentos precedentes podem ser geralmente efetuados de acordo com métodos bem-conhecidos na técnica e conforme descritos

em várias referências gerais e mais específicas que sejam citadas e discutidas no presente relatório. Vide, por exemplo, Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., que é aqui incorporado por referência para qualquer finalidade. A menos que sejam dadas definições específicas, a nomenclatura utilizada com relação a, e os procedimentos e técnicas laboratoriais de química analítica, química orgânica sintética e química médica e farmacêutica aqui descritas são aquelas bem-conhecidas e comumente usadas na técnica. Da mesma forma, podem-se usar técnicas convencionais para sínteses químicas, análises químicas, preparação, formulação e distribuição farmacêutica, e tratamento de pacientes.

[00053] Conforme utilizados de acordo com a presente descrição, os seguintes termos, a menos que indicado de outra forma, devem ser entendidos como possuindo os seguintes significados. As expressões "propriedade biológica", "característica biológica" e o termo "atividade" com referência a um anticorpo da presente invenção são aqui usados de maneira intercambiável e incluem, mas não se limitam a, afinidade e especificidade de epítipo (por exemplo, anticorpo humano anti-B7RP1 humano que se ligam a B7RP1 humano), capacidade de antagonizar a atividade do polipeptídeo-alvo (por exemplo, atividade de B7RP1), a estabilidade *in vivo* do anticorpo e as propriedades imunogênicas do anticorpo. Outras propriedades ou características biológicas identificáveis de um anticorpo reconhecidas na técnica incluem, por exemplo, reatividade cruzada (isto é, com homólogos não humanos de B7RP1, ou com outras proteínas ou tecidos, geralmente) e capacidade de preservar altos níveis de expressão de proteína em células de mamíferos. As propriedades ou características acima mencionadas podem ser observadas ou medidas usando-se técnicas reconhecidas na técnica, incluindo, mas não limitadas a, ELISA, ELISA

competitivo, análise de ressonância de plasmon de superfície, ensaios de neutralização *in vitro* e *in vivo* (por exemplo, Exemplo 2) e imunohistoquímica com seções de tecido de diferentes fontes, incluindo seres humanos, primatas ou qualquer outra fonte apropriada. Atividades e propriedades biológicas particulares de anticorpos humanos anti-B7RP1 humano são descritas em maiores detalhes nos Exemplos abaixo.

[00054] O termo "polinucleotídeo isolado", conforme aqui usado, significa um polinucleotídeo de DNA genômico, cDNA, RNA ou de origem sintética ou de alguma combinação deles, em que, em virtude de sua origem, o polinucleotídeo isolado (1) não esteja associado a todo ou a uma parte de um polinucleotídeo com o qual o polinucleotídeo isolado seja encontrado na natureza, (2) esteja ligado a um polinucleotídeo ao qual não esteja ligado na natureza, ou (3) não ocorra na natureza como parte de uma sequência maior.

[00055] O termo "polinucleotídeo", conforme aqui citado, significa polímeros de ácido nucléico de fita simples ou fita dupla de pelo menos 10 nucleotídeos de comprimento. Em certas modalidades, os nucleotídeos que compõem o polinucleotídeo podem ser ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. As ditas modificações incluem modificações de bases, como bromuridina, modificações da ribose, como arabinosida e 2',3'-didesoxirribose, e modificações de ligações internucleotídicas, como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforodisselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato e fosforoamidato. O termo "polinucleotídeo" inclui especificamente formas de fita simples e dupla de DNA ou RNA.

[00056] O termo "oligonucleotídeo" aqui citado inclui nucleotídeos de ocorrência natural e modificados, ligados entre si por ligações oligonucleotídicas de ocorrência natural e/ou de ocorrência não

natural. Os oligonucleotídeos são um subconjunto de polinucleotídeos compreendendo membros que sejam em geral de fita simples e tenham um comprimento de 200 nucleotídeos ou menos. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos têm 10 a 60 nucleotídeos de comprimento. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos têm 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 a 40 nucleotídeos de comprimento. Os oligonucleotídeos podem ser de fita simples ou de fita dupla, por exemplo, para uso na construção de um mutante genético. Oligonucleotídeos da invenção podem ser oligonucleotídeos em sentido ou anti-sentido com referência a uma sequência codificadora de proteína.

[00057] O termo "nucleotídeos de ocorrência natural" inclui desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo "nucleotídeos modificados" inclui nucleotídeos com grupos de açúcar modificados ou substituídos e dimílares. O termo "ligações oligonucleotídicas" inclui ligações oligonucleotídicas como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforodisselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato e similares. Vide, por exemplo, LaPlanche et al., 1986, Nucl. Acids Res., 14: 9081; Stec et al., 1984, J. Am. Chem. Soc., 106: 6077; Stein et al., 1988, Nucl. Acids Res., 16: 3209; Zon et al., 1991, Anti-Cancer Drug Design, 6: 539; Zon et al., 1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed.), Oxford University Press; Stec et al., patente norte-americana nº 5.151.510; Uhlmann e Peyman, 1990, Chemical Reviews, 90: 543, cujas descrições são aqui incorporadas por referência para qualquer finalidade. Um oligonucleotídeo pode incluir um marcador detectável para permitir a detecção do oligonucleotídeo ou sua hibridização.

[00058] O termo "proteína isolada" aqui citado significa que a presente proteína (1) é livre de pelo menos algumas outras proteínas

com as quais seria encontrada na natureza, (2) é essencialmente livre de outras proteínas da mesma fonte, por exemplo, da mesma espécie, (3) é expressada por uma célula de uma espécie diferente, (4) foi separada de pelo menos 50 por cento dos polinucleotídeos, lipídios, carboidratos ou outros materiais com os quais esteja associada na natureza, (5) não está associada (por interação covalente ou não covalente) com partes de uma proteína com a qual a "proteína isolada" esteja associada na natureza, (6) está operacionalmente associada (por interação covalente ou não covalente) com um polipeptídeo com o qual não esteja associado na natureza, ou (7) não ocorre na natureza. Essa proteína isolada pode ser codificada por DNA genômico, cDNA, mRNA ou outro RNA, de origem sintética, ou qualquer de suas combinações. Em uma modalidade, a proteína isolada é substancialmente livre de proteínas ou polipeptídeos ou outros contaminantes que sejam encontrados em seu ambiente natural que interfiram com seu uso (terapêutico, diagnóstico, profilático, de pesquisa ou outro).

[00059] Um anticorpo "isolado" é um que tenha sido identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que interferem com usos diagnósticos ou terapêuticos do anticorpo e podem incluir enzimas, hormônios e outras substâncias proteináceas e não proteináceas. Em certas modalidades, o anticorpo é purificado (1) a mais de 95% ou mais de 99% em peso de anticorpo, conforme determinado pelo método de Lowry, (2) a um grau suficiente para se obterem pelo menos 15 resíduos da sequência de aminoácidos N-terminal ou interna com o uso de um sequenciador de copo giratório, ou (3) até a homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras usando-se coloração azul de Coomassie ou prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo in situ

dentro de células recombinantes, pois pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente.

[00060] Os termos "polipeptídeo" ou "proteína" significam moléculas com a sequência de proteínas nativas, isto é, proteínas produzidas por células de ocorrência natural e especificamente não recombinantes, ou células geneticamente manipuladas ou recombinantes, e podem compreender moléculas com a sequência de aminoácidos da proteína nativa ou moléculas com deleções de, adições a e/ou substituições de um ou mais aminoácidos da sequência nativa. Os termos "polipeptídeo" e "proteína" englobam especificamente anticorpos anti-B7RP1, ou sequências que tenham deleções de, adições a e/ou substituições de um ou mais aminoácidos de um anticorpo anti-B7RP1.

[00061] O termo "fragmento polipeptídico" refere-se a um polipeptídeo que tenha uma deleção amino terminal, uma deleção carboxila terminal e/ou uma deleção interna. Em certas modalidades, os fragmentos têm pelo menos 5 a cerca de 500 aminoácidos de comprimento. Deve-se notar que, em certas modalidades, os fragmentos têm pelo menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ou 450 aminoácidos de comprimento. Fragmentos polipeptídicos particularmente úteis incluem domínios funcionais, incluindo domínios de ligação, particularmente de ligação a antígeno, particularmente em que o antígeno é um epítopo de B7RP1 humano. No caso de um anticorpo anti-B7RP1, fragmentos utilizáveis incluem, mas não se limitam a, uma região de CDR, um domínio variável de cadeia pesada ou leve, uma parte de uma cadeia de anticorpo ou apenas sua região variável incluindo duas CDRs e similares.

[00062] O termo "agente de ligação específica" refere-se a uma molécula de ocorrência natural ou não natural que se ligue especificamente a um alvo. Exemplos de agentes de ligação

específicos incluem, mas não se limitam a, proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios. Em certas modalidades, um agente de ligação específico é um anticorpo.

[00063] O termo "agente de ligação específica a B7RP1" refere-se a um agente de ligação específica que se ligue especificamente a qualquer parte de B7RP1. Em certas modalidades, um agente de ligação específica a B7RP1 é um anticorpo que se ligue especificamente a B7RP1.

[00064] A título de exemplo, um anticorpo "se liga especificamente" a um alvo, se o anticorpo, quando marcado, puder sofrer competição pelo seu alvo pelo anticorpo não marcado correspondente.

[00065] O termo "fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional", conforme aqui usado, refere-se a um fragmento polipeptídico que contenha pelo menos as CDRs das cadeias pesada e leve da imunoglobulina. Um fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional da invenção é capaz de se ligar a um antígeno. Em certas modalidades, o antígeno é um ligante que se liga especificamente a um receptor. Nessas modalidades, a ligação de um fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional da invenção impede a ligação do ligante a seu receptor, interrompendo a resposta biológica resultante da ligação do ligante ao receptor. Em uma modalidade, um fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional da invenção se liga especificamente a B7RP1. De preferência, o fragmento se liga especificamente a B7RP1 humano.

[00066] O termo "de ocorrência natural" ou "nativo", conforme aqui usado e aplicado a um objeto, refere-se ao fato de que o objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência polipeptídica ou polinucleotídica que esteja presente em um organismo (incluindo vírus) que possa ser isolado de uma fonte na natureza e que não tenha sido intencionalmente modificado pelo homem é de

ocorrência natural. O termo "de ocorrência não natural" ou "não nativo", conforme aqui usado, refere-se a um material que não seja encontrado na natureza ou que tenha sido estruturalmente modificado ou sintetizado pelo homem. Por exemplo, "de ocorrência não natural" pode se referir a uma variante, como uma variante de polinucleotídeo que possa ser produzida usando-se técnicas de mutagênese conhecidas na técnica ou uma variante de polipeptídeo produzida por essa variante de polinucleotídeo. Essas variantes incluem, por exemplo, aquelas produzidas por substituições, deleções ou adições de nucleotídeos que possam envolver um ou mais nucleotídeos. Variantes polinucleotídicas podem ser alteradas em regiões codificadoras ou não codificadoras ou em ambas. Alterações nas regiões codificadoras podem produzir substituições, deleções ou adições de aminoácidos conservadoras. Particularmente entre estas estão substituições, adições, deleções e substituições conservadoras silenciosas, que não alterem as propriedades e atividades de um anticorpo para B7RP1 da invenção. Aqueles versados na técnica podem determinar prontamente como gerar essa variante usando métodos bem-conhecidos na técnica.

[00067] O termo "operacionalmente ligado" significa que os componentes aos quais o termo se aplica estão em uma relação que os permita realizar suas funções inerentes sob condições adequadas. Por exemplo, uma sequência de controle "operacionalmente ligada" a uma sequência codificadora de proteína está ligada a ela de modo que a expressão da sequência codificadora de proteína seja conseguida sob condições compatíveis com a atividade transcricional das sequências de controle.

[00068] O termo "sequência de controle", conforme aqui usado, refere-se a sequências polinucleotídicas que possam efetuar a expressão, processamento ou localização intracelular de sequências

codificadoras às quais estejam operacionalmente ligadas. A natureza dessas sequências de controle pode depender do organismo hospedeiro. Em modalidades particulares, sequências de controle para procariotas podem incluir um promotor, um sítio de ligação ribossomal e uma sequência de término de transcrição. Em outras modalidades particulares, sequências de controle para eucariotas podem incluir promotores compreendendo um ou uma pluralidade de sítios de reconhecimento para fatores de transcrição, sequências intensificadoras de transcrição, sequências de término de transcrição e sequências de poliadenilação. Em certas modalidades, "sequências de controle" podem incluir sequências líderes e/ou sequências de parceiro de fusão.

[00069] O termo "vetor" inclui uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar para dentro de uma célula outro ácido nucléico ao qual tenha sido ligado. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que refere-se a uma alça de DNA de fita dupla circular à qual segmentos de DNA adicionais possam ser ligadas. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma células hospedeira na qual sejam introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos com uma origem bacteriana de replicação e vetores epissomais de mamíferos). Outros vetores (por exemplo, vetores não epissomais de mamíferos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira por introdução na célula hospedeira e, dessa forma, são replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais estejam operacionalmente ligados. Esses vetores são aqui chamados de "vetores de expressão recombinante" (ou simplesmente "vetores de expressão"). Em geral, vetores de expressão utilizáveis na prática de técnicas de DNA

recombinante frequentemente estão na forma de plasmídeos. No presente relatório, "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados de maneira intercambiável, pois o plasmídeo é a forma de vetor mais comumente usada. Entretanto, a invenção se destina a incluir essas outras formas de vetores de expressão, como vetores virais (por exemplo, retrovírus de replicação defeituosa, adenovírus e vírus adenoassociados), que sirvam a funções equivalentes.

[00070] A expressão "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira") inclui uma célula na qual um vetor de expressão recombinante tenha sido introduzido. Aqueles versados na técnica devem entender que esses termos pretendem se referir não apenas à célula sujeita particular, mas também à descendência dessa célula. Como certas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas devido a mutação ou influências ambientais, essa descendência pode não ser, de fato, idêntica à célula original, mas ainda está incluída dentro do âmbito do termo "células hospedeira", conforme aqui usado. Uma ampla variedade de sistemas de expressão hospedeiros pode ser usada para expressar os anticorpos da presente invenção, incluindo sistemas de expressão bacteriana, em levedura, de baculovírus e mamíferos (assim como sistemas de expressão de descrição em fago). Um exemplo de um vetor de expressão bacteriana adequado é o pUC19. Para expressar um anticorpo de maneira recombinante, uma célula hospedeira é transfectada com um ou mais vetores de expressão recombinante portadores de fragmentos de DNA que codifiquem as cadeias leve e pesada de imunoglobulina do anticorpo, de modo que as cadeias leve e pesada sejam expressadas na célula hospedeira e possam ser secretadas no meio em que as células hospedeiras são cultivadas, os anticorpos podendo ser recuperados desse meio. Metodologias de DNA recombinante padronizadas são usadas para se obterem genes de cadeia leve e

pesada de anticorpo, incorporar esses genes em vetores de expressão recombinante e introduzir os vetores em células hospedeiras, como aquelas descritas em Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories, Ausubel, F. M. et al. (Eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates (1989) e na patente norte-americana nº 4.816.397, de Boss et al.

[00071] O termo "transdução" é usado para se referir à transferência de genes de uma bactéria para outra, normalmente por um fago. "Transdução" também refere-se à aquisição e transferência de sequências celulares eucarióticas por retrovírus.

[00072] O termo "transfecção" é usado para se referir à captação de DNA estranho ou exógeno por uma célula, e uma célula foi "transfectada" quando o DNA exógeno tiver sido introduzido dentro da membrana celular. Inúmeras técnicas de transfecção são bem-conhecidas na técnica e são aqui apresentadas. Vide, por exemplo, Graham et al., 1973, Virology 52: 456; Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis et al., 1986, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier; e Chu et al., 1981, Gene 13: 197. Essas técnicas podem ser usadas para introduzir uma ou mais frações de DNA exógeno em células hospedeiras adequadas.

[00073] O termo "transformação", conforme aqui usado, refere-se a uma alteração nas características genéticas de uma célula, e uma célula foi transformada quando tiver sido modificada para conter um novo DNA. Por exemplo, uma célula é transformada quando é geneticamente modificada a partir de seu estado nativo. Após a transfecção ou transdução, o DNA transformador pode se recombinar com o DNA da célula por integração física em um cromossomo da célula, ou pode ser mantido transitoriamente como um elemento

epissomal sem ser replicado, ou pode se replicar independentemente como um plasmídeo. Considera-se que uma célula foi transformada de maneira estável, quando o DNA é replicado com a divisão da célula.

[00074] O termo "antígeno" refere-se a uma molécula ou parte de uma molécula capaz de ser ligada por um agente de ligação seletiva, como um anticorpo, e, além disso, capaz de ser usada em um animal para produzir anticorpos capazes de ligação a um epítopo desse antígeno. Um antígeno pode ter um ou mais epítopos.

[00075] Em certas modalidades, variantes de anticorpos incluem variantes de glicosilação, em que o número e/ou tipo de sítios de glicosilação foi alterado em comparação com as sequências de aminoácidos do polipeptídeo de origem. Em certas modalidades, variantes de proteínas compreendem um número maior ou menor de sítios de glicosilação ligados a N do que a proteína nativa. Um sítio de glicosilação ligado a N se caracteriza pela sequência: Asn-Xaa-Ser ou Asn-Xaa-Thr, em que o resíduo de aminoácido designado por Xaa pode ser qualquer resíduo de aminoácido, exceto prolina. A substituição de resíduos de aminoácidos para criar essa sequência fornece um novo sítio em potencial para a adição de uma cadeia de carboidrato ligada a N. Alternativamente, substituições que eliminem essa sequência removerão uma cadeia de carboidrato ligada a N existente. Também se apresenta um rearranjo de cadeias de carboidratos ligadas a N, em que um ou mais sítios de glicosilação ligados a N (tipicamente aqueles que sejam de ocorrência natural) são eliminados, e um ou mais novos sítios ligados a N são criados. Variantes de anticorpos adicionais incluem variantes de cisteína, em que um ou mais resíduos de cisteína são deletados ou substituídos por outro aminoácido (por exemplo, serina), em comparação com a sequência de aminoácidos de origem. Variantes de cisteína podem ser úteis quando os anticorpos têm de ser redobrados em uma

conformação biologicamente ativa, como depois do isolamento de corpúsculos de inclusão insolúveis. Variantes de cisteína em geral têm menos resíduos cisteína do que a proteína nativa e, tipicamente, têm um número par para minimizar interações resultantes de cisteínas não pareadas.

[00076] Em modalidades adicionais, variantes de anticorpos podem incluir anticorpos compreendendo um fragmento Fc modificado ou uma região constante de cadeia pesada modificada. Um fragmento Fc, que significa "fragmento que se cristaliza", ou uma região constante de cadeia pesada pode ser modificada por mutação para conferir a um anticorpo características de ligação alteradas. Vide, por exemplo, Burton e Woof, 1992, *Advances in Immunology* 51: 1-84; Ravetch e Bolland, 2001, *Annu. Rev. Immunol.* 19: 275-90; Shields et al., 2001, *Journal of Biol. Chem.* 276: 6591-6604; Telleman e Junghans, 2000, *Immunology* 100: 245-251; Medesan et al., 1998, *Eur. J. Immunol.* 28: 2092-2100; todos aqui incorporados por referência). Essas mutações podem incluir substituições, adições, deleções ou quaisquer de suas combinações e são tipicamente produzidas por mutagênese direcionada a sítio usando um ou mais oligonucleotídeos mutagênicos, de acordo com métodos aqui descritos, assim como de acordo com métodos conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 3ª ed., 2001, Cold Spring Harbor, N.Y., e Berger e Kimmel, *METHODS IN ENZYMOLOGY*, Volume 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, CA., que são aqui incorporados por referência).

[00077] De acordo com certas modalidades, as substituições de aminoácidos podem (1) reduzir a suscetibilidade a proteólise, (2) reduzir a suscetibilidade à oxidação, (3) alterar a afinidade de ligação e/ou (4) conferir ou modificar outras propriedades físico-químicas ou

funcionais nesses polipeptídeos. De acordo com certas modalidades, substituições únicas ou múltiplas de aminoácidos (em certas modalidades, substituições de aminoácidos conservadoras) podem ser feitas na sequência de ocorrência natural (em certas modalidades, na parte do polipeptídeo fora do(s) domínio(s) formador(es) de contatos intermoleculares). Em certas modalidades, uma substituição de aminoácido conservadora tipicamente não altera substancialmente as características estruturais da sequência de origem (por exemplo, um aminoácido substituto devem romper ou tender a romper a estrutura secundária que caracteriza uma sequência de origem, como uma hélice). Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipeptídeos reconhecidas na técnica são descritas em PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES (Creighton, Ed.), 1984, W. H. Freeman and Company, New York; INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE (C. Branden e J. Tooze, eds.), 1991, Garland Publishing, New York, N.Y.; e Thornton et al., 1991, Nature 354: 105, todos aqui incorporados por referência.

[00078] "Anticorpo" ou "peptídeo(s) de anticorpo" refere-se a um anticorpo intacto, ou seu fragmento de ligação, que compete com o anticorpo intacto para ligação específica. Em certas modalidades, os fragmentos de ligação são produzidos por técnicas de DNA recombinante. Em modalidades adicionais, os fragmentos de ligação são produzidos por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. Os fragmentos de ligação incluem, mas não se limitam a, F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv e anticorpos de cadeia única.

[00079] A invenção apresenta anticorpos que compreendem uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que as cadeias pesada e leve formam juntas uma estrutura de ligação a antígeno capaz de se ligar especificamente a B7RP1. Uma cadeia pesada de comprimento total inclui um domínio de região variável, V_H, e três domínios de região

constante, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . O domínio V_H está na terminação amino do polipeptídeo, e o domínio C_{H3} está na terminação carboxila. O termo "cadeia pesada", conforme aqui usado, engloba uma cadeia pesada de comprimento total e seus fragmentos. Uma cadeia leve de comprimento total inclui um domínio de região variável, V_L , e um domínio de região constante, C_L . Como a cadeia pesada, o domínio de região variável da cadeia leve está na terminação amino do polipeptídeo. O termo "cadeia leve", conforme aqui usado, engloba uma cadeia leve de comprimento total e seus fragmentos. Um fragmento $F(ab)$ é composto por uma cadeia leve e as regiões C_{H1} e variável de uma cadeia pesada. Uma cadeia pesada de uma molécula $F(ab)$ não pode formar uma ligação dissulfeto com outra molécula de cadeia pesada. Um fragmento $F(ab')$ contém uma cadeia leve e uma cadeia pesada que contém mais da região constante, entre os domínios C_{H1} e C_{H2} , de modo que uma ligação dissulfeto intercadeias possa se formar entre duas cadeias pesadas para formar uma molécula $F(ab')_2$. A região F_v compreende as regiões variáveis tanto da cadeia pesada, quanto da leve, mas não tem as regiões constantes. Anticorpos de cadeia única são moléculas F_v em que as regiões variáveis de cadeia pesada e leve foram conectadas por um ligante flexível para formar uma única cadeia polipeptídica, que forma uma região de ligação a antígeno. Anticorpos de cadeia única são discutidos em detalhes na Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 88/01649 e nas patentes norte-americanas nº 4.946.778 e 5.260.203.

[00080] Um anticorpo bivalente diferente de um anticorpo "multiespecífico" ou "multifuncional", em certas modalidades, é entendido como compreendendo sítios de ligação com especificidade antigênica idêntica.

[00081] Na avaliação da ligação e especificidade de anticorpo de

acordo com a invenção, um anticorpo inibe substancialmente a adesão de um ligante a um receptor, quando um excesso de anticorpo reduz a quantidade de ligante ligado ao receptor em pelo menos cerca de 20%, 40%, 60%, 80%, 85% ou mais (conforme medido, *inter alia*, com o uso de um ensaio de ligação competitiva *in vitro*).

[00082] "Anticorpo neutralizador" significa uma molécula de anticorpo que seja capaz de bloquear ou reduzir substancialmente uma função efetora de um antígeno-alvo ao qual se liga. Portanto, um anticorpo anti-B7RP1 "neutralizador" é capaz de bloquear ou reduzir substancialmente uma função efetora, como ligação a receptor e/ou geração de uma resposta celular, de B7RP1. "Reduzir substancialmente" pretende significar pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85% ou pelo menos cerca de 90% de redução de uma função efetora do antígeno-alvo (por exemplo, B7RP1 humano).

[00083] O termo "epítopo" inclui qualquer sítio em um antígeno que seja capaz de se ligar especificamente a uma imunoglobulina ou receptor de célula T. Em certas modalidades, determinantes de epítomos incluem agrupamentos de moléculas de superfície quimicamente ativos, como aminoácidos, cadeias laterais de açúcares, grupos fosforila ou grupos sulfonila, e, em certas modalidades, podem ter características estruturais tridimensionais específicas e/ou características de carga específicas. Um epítopo é uma região de um antígeno que seja ligada por um anticorpo. Em certas modalidades, diz-se que um anticorpo se liga especificamente a um antígeno, quando reconhece preferencialmente seu antígeno-alvo em uma mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas. Em certas modalidades, diz-se que um anticorpo se liga especificamente a um antígeno, quando a constante de dissociação em equilíbrio é de

cerca de 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, ou menos de cerca de 10^{-12} M.

[00084] Um anticorpo se liga "essencialmente ao mesmo epítopo" como um anticorpo de referência, quando os dois anticorpos reconhecem epítopos idênticos ou estericamente superpostos. Os métodos mais amplamente usados e rápidos para determinar se dois anticorpos se ligam a epítopos idênticos ou estericamente superpostos são ensaios de competição, que podem ser configurados em todos os inúmeros diferentes formatos, usando antígeno marcado ou anticorpo marcado. Normalmente, o antígeno é imobilizado em um substrato, e a capacidade de anticorpos não marcados de bloquearem a ligação de anticorpos marcados é medida usando-se isótopos radioativos ou marcadores enzimáticos.

[00085] O termo "agente" é aqui usado para designar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica ou um extrato preparado a partir de materiais biológicos.

[00086] Conforme aqui usado, os termos "marcador" ou "marcado" refere-se à incorporação de um marcador detectável, por exemplo, por incorporação de um aminoácido radiomarcado ou fixação a um polipeptídeo de frações biotina que possam ser detectadas por avidina marcada (por exemplo, estreptavidina compreendendo um marcador detectável, como um marcador fluorescente, um marcador quimioluminescente ou uma atividade enzimática que possa ser detectada por métodos ópticos ou colorimétricos). Em certas modalidades, o marcador também pode ser terapêutico. Vários métodos de marcação de polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser vantajosamente usados nos métodos aqui apresentados. Exemplos de marcadores para polipeptídeos incluem, mas não se limitam a, radioisótopos ou radionuclídeos, como ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{125}I e ^{131}I ,

marcadores fluorescentes (por exemplo, isotiocianato de fluoresceína ou FITC, rodamina ou fósforos lantanídeos), marcadores enzimáticos (por exemplo, peroxidase de rábano, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), marcadores quimioluminescentes, marcadores haptênicos, como grupos biotínica, e epítomos polipeptídicos predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências de par de zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação a metais ou etiquetas de epítomos). Em certas modalidades, os marcadores são fixados por braços espaçadores (como $(CH_2)_n$, em que $n < \text{cerca de } 20$) de vários comprimentos, para reduzir o bloqueio estérico em potencial.

[00087] O termo "amostra biológica", conforme aqui usado, inclui, mas não se limita a, qualquer quantidade de uma substância de um ser vivo ou ser anteriormente vivo. Esses seres vivos incluem, mas não se limitam a, seres humanos, camundongos, macacos, ratos, coelhos e outros animais. Essas substâncias incluem, mas não se limitam a, sangue, soro, urina, células, órgãos, tecidos, ossos, medula óssea, linfonodos e pele.

[00088] O termo "agentes farmacêutico ou fármaco", conforme aqui usado, refere-se a um composto químico ou composição capaz de induzir um efeito terapêutico desejado, quando apropriadamente administrado a um paciente. A expressão "quantidade farmacêuticamente eficaz", com referência a uma composição farmacêutica compreendendo um ou uma pluralidade dos anticorpos da invenção, deve ser entendida como significando, de acordo com a invenção, uma quantidade da dita composição farmacêutica que seja capaz de abolir, em um paciente, a diminuição no limiar de sensibilidade a estímulos externos, com o retorno desse limiar de sensibilidade a um nível comparável como observado em sujeitos saudáveis.

[00089] Um "distúrbio" é qualquer condição que se beneficie do tratamento de acordo com a presente invenção. "Distúrbio" e "condição" são aqui usados de maneira intercambiável e incluem distúrbios crônicos e agudos do sistema imune ou doenças do sistema imune associadas a uma resposta imune inapropriada, incluindo aquelas condições patológicas que predisponham o mamífero ao distúrbio em questão. Inúmeras condições e distúrbios que se beneficiariam do tratamento de acordo com a presente invenção são descritos, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional nº PCT/US00/01871 (Publicação nº WO 00/46240), cuja descrição é incorporada por referência em sua inteireza.

[00090] Os termos "doença do sistema imune" e "condição do sistema imune" englobam qualquer condição médica ou distúrbio associado a níveis aumentados de B7RP1, sensibilidade aumentada a B7RP1 ou doenças mediadas por células T, incluindo, mas não limitadas a, doença auto-imune, sobrevivência a enxerto, transplante de medula óssea e órgãos, alo-sensibilização devida a transfusões sanguíneas, síndrome do choque tóxico, doenças mediadas por células B dependentes de células T, doenças inflamatórias crônicas associadas à disfunção crônica de células imunes, distúrbios linfoproliferativos (como mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström e crioglobulinemias) e câncer. Exemplos não limitativos de doenças auto-imunes incluem lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, púrpura trombocitopênica imune (ITP), esclerose múltipla, diabetes e psoríase. Exemplos não limitativos de doenças inflamatórias crônicas incluem doença inflamatória do intestino (como doença de Crohn e colite ulcerativa), doença de Grave, tireoidite de Hashimoto e diabetes melito.

[00091] Os termos "doença do sistema imune" e "condição do sistema imune" também englobam qualquer condição clínica que seja

melhorada pela inibição da produção de anticorpos, como reações de hipersensibilidade. Reações de hipersensibilidade podem ser causadas, por exemplo, por febre do feno, alergias, asma, atopia e edema agudo.

[00092] Exemplos não limitativos de doenças que causam reações de hipersensibilidade mediadas por anticorpos incluem lúpus eritematoso sistêmico, artrite (como artrite reumatóide, artrite reativa, artrite psoriaca), nefropatias (como glomerulonefrite, nefropatias membranosas, mesangiocapilares, segmentares focais, necrotizantes focais, em crescente e proliferativas, como tubulopatias), distúrbios cutâneos (como pênfigo e penfigóide, eritema nodoso), endocrinopatias (como tireoidite, doença de Grave, doença de Hashimoto, diabetes melito dependente de insulina), várias pneumopatias (como alveolite extrínseca), várias vasculopatias, doença celíaca, doenças com produção aberrante de IgA, muitas anemias e trombocitopenias, síndrome de Guillain-Barre e miastenia gravis.

[00093] Conforme aqui usados, os termos "quantidade eficaz" e "quantidade terapeuticamente eficaz", quando usados com referência a uma composição de veículo ou farmacêutica compreendendo um ou mais anticorpos humanos anti-B7RP1 humano, refere-se a uma quantidade ou dosagem suficiente para produzir um resultado desejado (isto é, quando para terapia com o veículo anticorpos humanos anti-B7RP1 humano da presente invenção, o resultado desejado é a modulação desejada de respostas de células T, por exemplo) ou para sustentar uma diminuição observável no nível de uma ou mais atividades biológicas de B7RP1. Mais especificamente, uma quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade do(s) anticorpo(s) humano(s) anti-B7RP1 humano suficiente para inibir, durante algum período de tempo, um ou mais dos processos

patológicos clinicamente definidos associados à condição em questão, por exemplo, distúrbios e doenças imunes, em um sujeito tratado *in vivo* com o agente. Na presente invenção, uma "quantidade eficaz" de um anticorpo anti-B7RP1 pode modular as respostas de células T em um paciente. Nos métodos da presente invenção, o termo "controlar" e suas variantes gramaticais são usados para se referirem à prevenção, inibição parcial ou completa, redução, retardo ou alentejamento de um evento indesejável, por exemplo, uma resposta imune. A quantidade eficaz pode variar dependendo do veículo ou anticorpo(s) humano(s) anti-B7RP1 humano selecionado(s) e também é dependente de vários fatores e condições relacionadas ao sujeito a ser tratado e à gravidade do distúrbio. Por exemplo, se o veículo ou anticorpo(s) humano(s) anti-B7RP1 humano tiver de ser administrado *in vivo* fatores como a idade, peso e saúde do paciente, assim como curvas de resposta a dose e dados de toxicidade obtidos em trabalho pré-clínico com animais estariam entre aqueles considerados. Se o agente tiver de ser contatado com as células *in vitro*, também se projetariam vários estudos pré-clínicos *in vitro* para avaliar parâmetros como captação, meia-vida, dose, toxicidade e outros. A determinação de uma quantidade eficaz ou quantidade terapeuticamente eficaz para um dado agente está dentro da capacidade daqueles versados na técnica.

[00094] Conforme aqui usados, os termos "proteína-1 relacionada a B7" e "B7RP1" são definidos como todas as espécies de mamíferos da sequência nativa B7RP1, que é descrita na Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 00/46240, que é aqui incorporada por referência.

[00095] Conforme aqui usado, "substancialmente puro" ou "substancialmente purificado" significa um composto ou espécie que seja a espécie predominante presente (isto é, em bases molares, é mais abundante que qualquer outra espécie individual na composição).

Em certas modalidades, uma fração substancialmente purificada é uma composição em que a espécie compreenda pelo menos cerca de 50 por cento (em bases molares) de todas as espécies macromoleculares presentes. Em certas modalidades, uma composição substancialmente pura compreenderá mais de cerca de 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% de todas as espécies macromoleculares presentes na composição. Em certas modalidades, a espécie é purificada até ficar essencialmente homogênea (espécies contaminantes não podem ser detectadas na composição por métodos de detecção convencionais), em que a composição consiste essencialmente em uma única espécie macromolecular.

[00096] O termo "paciente" inclui sujeitos humanos e animais.

[00097] "Tratamento" ou "tratar" refere-se tanto a tratamento terapêutico, quanto profilático ou medidas preventivas. Aqueles necessitados de tratamento incluem aqueles já como distúrbio, assim como aqueles propensos a ter o distúrbio ou aqueles em que o distúrbio deva ser prevenido.

[00098] A menos que requerido de outra forma pelo contexto, termos singulares devem incluir plurais, e termos plurais devem incluir o singular.

[00099] De acordo com certas modalidades da invenção, anticorpos direcionados a B7RP1 podem ser usados para tratar distúrbios do sistema imune e doenças do sistema imune, incluindo, mas não limitados a, aqueles acima mencionados.

[000100] Em um aspecto da invenção, apresentam-se anticorpos monoclonais completamente humanos gerados contra e com especificidade biológica e imunológica para ligação a B7RP1. Em outro aspecto, a invenção apresenta ácidos nucleicos compreendendo sequências de nucleotídeos que codificam sequências de aminoácidos para moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada e leve,

particularmente sequências correspondendo a suas regiões variáveis. Modalidades particulares desse aspecto da invenção são sequências correspondendo a regiões determinantes de complementaridade (CDRs), especificamente de CDR1 a CDR3, das cadeias pesadas e leves apresentadas pela invenção. Em ainda outro aspecto, a invenção apresenta células de hibridoma e linhagens celulares que expressam as moléculas de imunoglobulina e anticorpos, como anticorpos monoclonais da invenção. A invenção também apresenta preparações biológica e imunologicamente purificadas de anticorpos, como anticorpos monoclonais gerados contra e com especificidade biológica e imunológica para ligação a B7RP1 humano.

[000101] A capacidade de clonar e reconstruir loci humanos com tamanho de megabases em cromossomos artificiais de levedura (YACs) e de introduzi-los na linhagem germinativa de camundongo proporciona uma abordagem vantajosa para elucidar os componentes funcionais de loci muito grandes ou grosseiramente mapeados, assim como gerar modelos úteis de doença humana. Além disso, a utilização dessa tecnologia para substituição de loci de camundongo por seus equivalentes humanos fornece insights únicos na expressão e regulação de produtos de genes humanos durante o desenvolvimento, sua comunicação com outros sistemas e seu envolvimento na indução e progressão de doenças.

[000102] Uma importante aplicação prática dessa estratégia é a "humanização" do sistema imune humoral de camundongo. A introdução de loci de imunoglobulina (Ig) humana em camundongos, em que os genes de Ig endógenos tenham sido inativados, oferece a oportunidade de estudar mecanismos subjacentes à expressão e montagem programadas de anticorpos, assim como seu papel no desenvolvimento de células B. Além disso, essa estratégia proporciona uma fonte para a produção de anticorpos monoclonais completamente

humanos (MAbs).

[000103] O termo "anticorpo humano" inclui anticorpos com regiões variáveis e constantes substancialmente correspondentes a sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Em certas modalidades, anticorpos humanos são produzidos em mamíferos não humanos, incluindo, mas não limitados a roedores, como camundongos e ratos, e lagomorfos, como coelhos. Em certas modalidades, os anticorpos humanos são produzidos em células de hibridoma. Em certas modalidades, os anticorpos humanos são produzidos de maneira recombinante.

[000104] O termo "recombinante" com referência a um anticorpo inclui anticorpos que sejam preparados, expressados, criados ou isolados por meios recombinantes. Exemplos representativos incluem anticorpos expressados usando-se um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira, anticorpos isolados de uma biblioteca combinatória de anticorpos humanos recombinantes, anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que seja transgênico para genes de imunoglobulinas humanas (vide, por exemplo, Taylor et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295); ou anticorpos preparados, expressados, criados ou isolados por qualquer meio que envolva a junção de sequências de genes de imunoglobulinas humanas a outras sequências de DNA. Esses anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulinas de linhagem germinativa humanas.

[000105] Anticorpos humanos têm pelo menos três vantagens com relação a anticorpos não humanos e quiméricos para uso em terapia humana:

- 1) porque a parte efetora do anticorpo é humana, pode interagir melhor com outras partes do sistema imune humano (por

exemplo, destruir células alvo mais eficientemente por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC));

2) o sistema imune humano não deve reconhecer o anticorpo humano como estranho, e, conseqüentemente, a resposta de anticorpo contra esse anticorpo injetado deve ser menor do que contra um anticorpo não humano totalmente estranho ou um anticorpo quimérico parcialmente estranho;

3) relatou-se que anticorpos não humanos injetados têm uma meia-vida na circulação humana muito mais curta do que a meia-vida de anticorpos humanos. Anticorpos humanos injetados terão uma meia-vida essencialmente idêntica à de anticorpos humanos de ocorrência natural, permitindo que sejam dadas doses menores e menos frequentes.

[000106] Assim, espera-se que anticorpos completamente humanos minimizem as respostas imunogênicas e alérgicas intrínsecas a MAbs de camundongos ou derivados de camundongos, e, dessa forma, aumentem a eficácia e segurança dos anticorpos administrados. Anticorpos completamente humanos da invenção, portanto, podem ser usados no tratamento de doenças e distúrbios associados à resposta imune inapropriada, seu tratamento requerendo administração repetida de anticorpos. Assim, uma vantagem particular dos anticorpos anti-B7RP1 da invenção é que os anticorpos são completamente humanos e podem ser administrados a pacientes de maneira não aguda, minimizando, ao mesmo tempo, reações adversas comumente associadas a anticorpos anticamundongo humanos ou outros anticorpos não completamente humanos anteriormente descritos de espécies não humanas.

[000107] Aqueles versados na técnica podem manipular cepas de camundongos deficientes na produção de anticorpos de camundongos

com grandes fragmentos dos loci de Ig humana, de modo que esses camundongos produzam anticorpos humanos na ausência de anticorpos de camundongo. Grandes fragmentos de Ig humana podem preservar a grande diversidade de gene variável, assim como a regulação apropriada da produção e expressão do anticorpo. Mediante exploração da maquinaria celular do camundongo para diversificação e seleção de anticorpos e a falta de tolerância imunológica a proteínas humanas, o repertório de anticorpos humanos reproduzidos nessas cepas de camundongos fornece anticorpos de alta afinidade contra qualquer antígeno de interesse, incluindo antígenos humanos. Usando-se tecnologia de hibridoma, MAbs humanos específicos para antígenos com a especificidade desejada podem ser produzidos e selecionados.

[000108] Animais transgênicos (por exemplo, camundongos) também podem ser usados para produzir anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, a transferência do arranjo de gene de imunoglobulina de linhagem germinativa humana nesses camundongos mutantes de linhagem germinativa resultará na produção de anticorpos humanos com um desafio antigênico (vide, por exemplo, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-2555; Jakobovits et al., 1993, Nature 362: 255-258; Bruggemann et al., 1993, Year in Immun. 7: 33, 1994, Nature 148: 1547-1553) e, 1996, Nature Biotechnology 14: 826; Gross et al., 2000, Nature 404: 995-999; e patentes norte-americanas nº 5.877.397, 5.874.299, 5.814.318, 5.789.650, 5.770.429, 5.661.016, 5.633.425, 5.625.126, 5.569.825 e 5.545.806 (todos aqui incorporados por referência em sua inteireza para todas as finalidades)). Anticorpos humanos também podem ser produzidos em bibliotecas de descrição de fago (Hoogenboom e Winter, 1992, J. Mol. Biol. 227: 381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581). As técnicas de Cole et al. e Boerner

et al. também são disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., 1985, MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, p. 77; e Boerner et al., 1991, J. Immunol. 147: 86-95).

[000109] Anticorpos humanos recombinantes também podem ser submetidos à mutagênese *in vitro* (ou, quando se usa um animal transgênico para sequências de Ig humana, mutagênese somática *in vivo*) e, portanto, as sequências de aminoácidos das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas daquelas relacionadas a sequências de V_H e V_L de linhagem germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório de linhagem germinativa de anticorpos humanos *in vivo*.

[000110] Em certas modalidades, aqueles versados na técnica podem usar regiões constantes de espécies diferentes da humana, juntamente com a(s) região(ões) variável(eis) humana(s) nesses camundongos para produzir anticorpos quiméricos.

[000111] Um anticorpo biespecífico ou bifuncional é tipicamente um anticorpo híbrido artificial com dois pares de cadeia pesada/cadeia leve diferentes e dois sítios de ligação diferentes. Anticorpos biespecíficos podem ser produzidos por vários métodos, incluindo, mas não limitados a, fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos F(ab'). Vide, por exemplo, Songsivilai e Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148: 1547-1553.

[000112] A invenção apresenta anticorpos que se ligam a B7RP1 humano. Esses anticorpos podem ser produzidos por imunização com B7RP1 de comprimento total ou seus fragmentos. Os anticorpos da invenção podem ser policlonais ou monoclonais e/ou podem ser anticorpos recombinantes. Em modalidades preferidas, os anticorpos da invenção são anticorpos humanos preparados, por exemplo, por

imunização de animais transgênicos capazes de produzir anticorpos humanos (vide, por exemplo, Pedido de Patente Internacional, Publicação nº WO 93/12227).

[000113] As regiões determinantes de complementaridade (CDRs) das regiões variáveis de cadeia leve e cadeia pesada de anticorpos anti-B7RP1 da invenção podem ser enxertadas em regiões de armação (FRs) da mesma espécie ou de outras. Em certas modalidades, as CDRs das regiões variáveis de cadeia leve e cadeia pesada do anticorpo anti-B7RP1 podem ser enxertadas em FRs humanas de consenso. Para criar FRs humanas de consenso, FRs de várias sequências de aminoácidos de cadeia pesada ou cadeia leve humana são alinhadas para identificar uma sequência de aminoácidos consenso. As FRs da cadeia pesada ou cadeia leve do anticorpo anti-B7RP1 podem ser substituídas por FRs de uma cadeia pesada ou cadeia leve diferente. Aminoácidos raros nas FRs das cadeias pesada e leve do anticorpo anti-B7RP1 tipicamente não são substituídos, ao passo que o restante dos aminoácidos da FR podem ser substituídos. Aminoácidos raros são aminoácidos específicos que estão em posições em que normalmente não são encontrados em FRs. As regiões variáveis enxertadas de anticorpos anti-B7RP1 da invenção podem ser usadas com uma região constante que seja diferente da região constante do anticorpo anti-B7RP1. Alternativamente, as regiões variáveis enxertadas são parte de um anticorpo Fv de cadeia única. A enxertia de CDR é descrita, por exemplo, nas patentes norte-americanas nº 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089 e 5.530.101, que são aqui incorporadas por referência para qualquer finalidade.

[000114] Anticorpos da invenção podem ser preparados usando-se camundongos transgênicos que tenham uma parte substancial do locus produtos de anticorpo humano inserida em células produtoras de

anticorpos dos camundongos e que sejam adicionalmente manipulados para serem deficientes na produção de anticorpos endógenos, murinos. Esses camundongos são capazes de produzir moléculas de imunoglobulinas humanas e anticorpos e não produzem ou produzem quantidades substancialmente reduzidas de moléculas de imunoglobulinas e anticorpos murinos. As tecnologias utilizadas para se conseguir esses resultados são apresentadas nas patentes, pedidos e referências apresentadas no presente relatório. Em certas modalidades, aqueles versados na técnica podem empregar métodos como os descritos na Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 98/24893, que é aqui incorporada por referência para qualquer finalidade. Vide também Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15: 146-156, que é aqui incorporado por referência para qualquer finalidade.

[000115] Os anticorpos monoclonais (mAbs) da invenção podem ser produzidos por várias técnicas, incluindo metodologia de anticorpos monoclonais convencional, por exemplo, a técnica padrão de hibridização de células somáticas de Kohler e Milstein (1975, Nature 256: 495). Outras técnicas para a produção de anticorpos monoclonais podem ser empregadas, por exemplo, transformação viral ou oncogênica de linfócitos B.

[000116] Um sistema animal exemplificativo para a preparação de hibridomas é o camundongo. A produção de hibridoma no camundongo é conhecida na técnica, e protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão também são conhecidas na técnica. Parceiros de fusão (por exemplo, células de mieloma murino) e procedimentos de fusão também são conhecidos.

[000117] Em uma certa modalidade, anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra B7RP1 podem ser gerados usando-se camundongos transgênicos portadores de partes do sistema imune

humano, em vez do sistema do camundongo. Esses camundongos transgênicos, aqui chamados de camundongos "HuMab", contêm um minolocus de gene de imunoglobulina humana que codifica sequências de imunoglobulina de cadeia pesada (μ e γ) e de cadeia leve κ humanas não rearranjadas, juntamente com mutações-alvo que inativam os loci de cadeias μ e κ endógenas (Lonberg et al., 1994, Nature 368: 856-859). Portanto, os camundongos exibem expressão reduzida de IgM ou κ de camundongo em resposta à imunização, os transgenes de cadeia pesada e cadeia leve humanas introduzidos sofrem comutação de classe e mutação somática para gerar anticorpos monoclonais IgG κ humanos de alta afinidade (Lonberg et al., supra; Lonberg e Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93; Harding e Lonberg, 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci. 764: 536-546). A preparação de camundongos HuMab é descrita em detalhes em Taylor et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295; Chen et al., 1993, International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al., 1994, J. Immunol. 152: 2912-2920; Lonberg et al., 1994, Nature 368: 856-859; Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113: 49-101; Taylor et al., 1994, International Immunology 6: 579-591; Lonberg e Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93; Harding e Lonberg, 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci. 764: 536-546; Fishwild et al., 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência em sua inteireza. Vide também as patentes norte-americanas nº 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.789.650, 5.877.397, 5.661.016, 5.814.318, 5.874.299 e 5.770.429, todas de Lonberg e Kay, assim como a patente norte-americana nº 5.545.807, de Surani et al.; as Publicações de Pedidos de Patentes Internacionais nº WO 93/1227, publicado em 24 de junho de 1993; WO 92/22646, publicado em 23 de dezembro de 1992; e WO 92/03918, publicado em 19 de março de 1992, cujas descrições são aqui incorporadas por referência em sua

inteireza. Alternativamente, as cepas de camundongos transgênicos descritas nos Exemplos abaixo podem ser usadas para gerar anticorpos anti-B7RP1 humanos.

[000118] A presente invenção apresenta anticorpos monoclonais humanos que são específicos para e neutralizam polipeptídeos B7RP1 humanos bioativos. Também se apresentam sequências de aminoácidos de cadeia pesada e leve anticorpos que são altamente específicos para e neutralizam polipeptídeos B7RP1 quando se ligam a eles. Essa elevada especificidade permite que os anticorpos humanos anti-B7RP1 humano e anticorpos monoclonais humanos com especificidade similar sejam uma imunoterapia eficaz para doenças associadas a B7RP1.

[000119] Em um aspecto, a invenção apresenta anticorpos humanos isolados que se ligam ao mesmo ou essencialmente ao mesmo epítopo que o anticorpo 16H aqui apresentado.

[000120] Em um aspecto, a invenção apresenta anticorpos humanos isolados compreendendo pelo menos uma das sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NO: 1 – 40 ou 44 – 58 que se liguem a um epítopo de polipeptídeo B7RP1 com alta afinidade e tenham a capacidade de antagonizar a atividade do polipeptídeo B7RP1. Esses anticorpos podem se ligar ao mesmo ou essencialmente ao mesmo epítopo que os anticorpos anti-B7RP1 mostrados nos Exemplos aqui.

[000121] Em certas modalidades, os anticorpos isolados se ligam ao polipeptídeo B7RP1 com uma constante de dissociação (K_D) de cerca de 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M ou menos e inibem a sobrevivência induzida por B7RP1 em um ensaio de neutralização *in vitro* com uma EC_{50} de cerca de 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M ou menos. Apresentam-se aqui exemplos de anticorpos humanos anti-B7RP1 humano que atendem aos critérios de ligação e neutralização

acima mencionados.

[000122] Em certas modalidades, anticorpos humanos anti-B7RP1 humano da invenção são aqui chamados de 16H, 16Hg (linhagem germinativa), 5D, 2H, 2Hg (linhagem germinativa), 15H, 41H e 43H. O anticorpo 16H compreende sequências polipeptídicas de V_L e V_H conforme mostradas na SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 1, respectivamente. O anticorpo 16Hg compreende sequências polipeptídicas de cadeia leve variável (V_L) e de cadeia pesada variável (V_H) conforme mostradas na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 8, respectivamente. O anticorpo 5D compreende sequências polipeptídicas de V_L e V_H conforme mostradas em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 9, respectivamente. O anticorpo 2H compreende sequências polipeptídicas de V_L e V_H conforme mostradas em SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 10, respectivamente. O anticorpo 2Hg compreende sequências polipeptídicas de V_L e V_H conforme mostradas em SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 11, respectivamente. O anticorpo 15H compreende sequências polipeptídicas de V_L e V_H conforme mostradas em SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 12, respectivamente. O anticorpo 41H compreende sequências polipeptídicas de V_L e V_H conforme mostradas em SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 13, respectivamente. O anticorpo 43H compreende sequências polipeptídicas de V_L e V_H conforme mostradas em SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 14, respectivamente. As propriedades dos anticorpos humanos anti-B7RP1 humano da presente invenção são especificamente apresentadas nos Exemplos. É particularmente notável a alta afinidade pelo polipeptídeo B7RP1 e a alta capacidade de antagonizar a atividade do polipeptídeo B7RP1 aqui demonstrada.

[000123] A constante de dissociação (K_D) de um anticorpo humano anti-B7RP1 humano pode ser determinada por ressonância de plasmon de superfície, conforme geralmente descrito nos Exemplos

abaixo. Geralmente, a análise de ressonância de plasmon de superfície mede interações de ligação em tempo real entre o ligante (polipeptídeo B7RP1 recombinante imobilizado em uma matriz de biossensor) e o analito (anticorpos em solução) por ressonância de plasmon de superfície (SPR) usando-se o sistema BIAcore® (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). A análise de plasmon de superfície também pode ser efetuada por imobilização do analito (anticorpos em uma matriz de biossensor) e apresentação do ligante (V recombinante em solução). A constante de dissociação (K_D) de um anticorpo humano anti-B7RP1 humano também pode ser determinada usando-se metodologia KinExA. Em certas modalidades da invenção, os anticorpos se ligam a B7RP1 com uma K_D de aproximadamente 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M ou 10^{-12} M. O termo " K_D ", conforme aqui usado, pretende se referir à constante de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular. Para fins da presente invenção, a K_D foi determinada conforme mostrado nos Exemplos abaixo.

[000124] Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são do isotipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Os anticorpos podem ser do isotipo IgG2 ou IgG1. Em outras modalidades, os anticorpos da invenção podem ser do isotipo IgM, IgA, IgE ou IgD. Em certas modalidades da invenção, os anticorpos compreendem uma cadeia leve kappa humana e uma cadeia pesada de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana. A expressão de anticorpos da invenção compreendendo uma região constante de cadeia pesada de IgG1 ou IgG2 é descrita nos Exemplos abaixo. Em modalidades particulares, as regiões variáveis dos anticorpos estão ligadas a uma região constante diferente da região constante para o isotipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em certas modalidades, os anticorpos da invenção foram clonados para expressão em células de mamíferos.

[000125] Em certas modalidades, modificações conservadoras nas cadeias pesadas e cadeias leves de anticorpos anti-B7RP1 (e modificações correspondentes nos nucleotídeos codificadores) produzirão anticorpos anti-B7RP1 com características funcionais e químicas similares às dos anticorpos anti-B7RP1 aqui apresentados. Em contraste, modificações substanciais nas características funcionais e/ou químicas de anticorpos anti-B7RP1 podem ser realizadas por seleção de substituições na sequência de aminoácidos das cadeias pesadas e leves que difiram significativamente em seu efeito sobre a manutenção (a) da estrutura do arcabouço molecular na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou (c) da maior parte da cadeia colateral.

[000126] Por exemplo, uma "substituição de aminoácido conservadora" pode envolver uma substituição de um resíduo de aminoácido nativo por um resíduo não nativo, de modo que haja pouco ou nenhum efeito sobre a polaridade ou carga do resíduo de aminoácido nessa posição. Além disso, qualquer resíduo nativo o polipeptídeo também pode ser substituído por alanina, conforme foi anteriormente descrito para "mutagênese de varredura de alanina".

[000127] Substituições de aminoácidos (conservadoras ou não conservadoras) podem ser determinadas por aqueles versados na técnica no momento em que se desejam essas substituições. Em certas modalidades, as substituições de aminoácidos podem ser usadas para identificar aqueles resíduos de aminoácidos de um anticorpo anti-B7RP1 que estejam envolvidas na especificidade e/ou afinidade de ligação do anticorpo por B7RP1 (por exemplo, resíduos que estejam envolvidos na ligação do anticorpo a um epítipo particular), como resíduos de aminoácidos nas regiões CDR1, CDR2 e/ou CDR3 das cadeias leves ou pesadas, conforme aqui descrito.

Essas substituições de aminoácidos podem aumentar ou diminuir a afinidade dos anticorpos anti-B7RP1 aqui descritos.

[000128] Pequenas alterações em uma sequência de aminoácidos, como deleção, adição ou substituição de um, ou de poucos ou mesmo de vários aminoácidos pode levar a uma forma alélica da proteína original que tenham propriedades substancialmente idênticas. Consequentemente, além dos anticorpos especificamente descritos aqui, outros anticorpos "substancialmente homólogos" podem ser prontamente projetados e fabricados utilizando-se várias técnicas de DNA recombinante bem-conhecidas por aqueles versados na técnica. Em geral, modificações dos genes podem ser prontamente realizadas por várias técnicas bem-conhecidas, como mutagênese direcionada a sítio. Consequentemente, a presente invenção considera anticorpos humanos anti-B7RP1 "variantes" ou "mutantes" com características substancialmente similares aos anticorpos humanos anti-B7RP1 aqui apresentados (vide, por exemplo, WO 00/56772, que é aqui incorporado por referência). Assim, o termo "variante" ou "mutante" com referência a um anticorpo humano anti-B7RP1 significa qualquer molécula de ligação (molécula X) (i) em que as regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada ou as regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve tomadas como um todo são pelo menos cerca de 80% homólogas, pelo menos cerca de 90% homólogas ou pelo menos cerca de 95% homólogas às regiões hipervariáveis mostradas nas SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO: 40, respectivamente, e (ii) em que a variante ou mutante é capaz de inibir a atividade de B7RP1 humano na mesma medida que um anticorpo humano anti-B7RP1 de referência com regiões de arcabouço idênticas às da molécula X. Esses anticorpos podem ser ligar a B7RP1 humano ou a B7RP1 de camundongo ou a ambos. A sequência de B7RP1 de camundongo é

descrita no WO 00/46240, que é incorporado por referência.

[000129] Ordinariamente, uma variante de anticorpo humano anti-B7RP1 terá CDRs de cadeia leve e/ou pesada, quando tomadas como um todo, que tenham pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos, pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos conforme mostrada nas SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 26 e/ou SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO: 40, respectivamente. Esses anticorpos podem se ligar a B7RP1 humano ou a B7RP1 de camundongo ou a ambos.

[000130] Uma variante de anticorpo humano anti-B7RP1 terá uma região variável de cadeia leve, quando tomada como um todo, que tenha pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos, pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência,

pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos conforme mostrada nas SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, e/ou uma região variável de cadeia pesada, quando tomada como um todo, que tenha pelo menos cerca de 70% de identidade de sequência de aminoácidos, pelo menos cerca de 75% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência, pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos conforme mostrada nas SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 14. Esses anticorpos podem se ligar a B7RP1 humano e/ou a B7RP1 de

camundongo.

[000131] Conforme será percebido por aqueles versados na técnica, muitos dos resíduos de contato com CDR em potencial são passíveis de substituição por outros aminoácidos e ainda permitem que o anticorpo retenha uma afinidade substancial pelo antígeno. Da mesma forma, muitos dos resíduos de arcabouço não em contato com as CDRs nas cadeias pesadas e leves podem acomodar substituições de aminoácidos das posições correspondentes de outros anticorpos humanos, sem perda significativa de afinidade ou não imunogenicidade do anticorpo humano. A seleção de vários aminoácidos alternativos pode ser usada para produzir versões dos anticorpos anti-B7RP1 apresentado e seus fragmentos que tenham combinações variáveis de afinidade, especificidade, não imunogenicidade, facilidade de fabricação e outras propriedades desejáveis.

[000132] Uma "variante" com referência a um polinucleotídeo pretende se referir a uma molécula de ácido nucléico com pelo menos 75% de identidade de sequência de ácido nucléico com uma sequência polinucleotídica da presente invenção. Ordinariamente, uma variante de polinucleotídeo terá pelo menos cerca de 75% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 88% de identidade de

sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência de ácido nucléico, pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência de ácido nucléico, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de ácido nucléico com uma nova sequência de ácido nucléico aqui apresentada.

[000133] Em modalidades alternativas, anticorpos da invenção podem ser expressados em linhagens celulares diferentes das linhagens celulares de hibridoma. Nessas modalidades, sequências que codifiquem anticorpos particulares podem ser usadas para transformação de uma célula hospedeira de mamífero adequada. De acordo com essas modalidades, a transformação pode ser conseguida usando-se qualquer método conhecido para a introdução de polinucleotídeos em uma célula hospedeira, incluindo, por exemplo, acondicionamento do polinucleotídeo em um vírus (ou em um vetor viral) e transdução de uma célula hospedeira com o vírus (ou vetor) ou por procedimentos de transfecção conhecidos na técnica, conforme exemplificado pelas patentes norte-americanas nº 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 e 4.959.455 (todas aqui incorporadas por referência para qualquer finalidade). Geralmente, o procedimento de transformação usado pode depender do hospedeiro a ser transformado. Métodos para introduzir polinucleotídeos heterólogos

em células de mamíferos são bem-conhecidos na técnica e incluem, mas não se limitam a, transfecção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, eletroporação, encapsulação do(s) polinucleotídeo(s) em lipossomos e microinjeção direta do DNA em núcleos.

[000134] Uma molécula de ácido nucléico que codifique a sequência de aminoácidos de uma região constante de cadeia pesada, uma região variável de cadeia pesada, uma região constante de cadeia leve ou uma região variável de cadeia leve de um anticorpo anti-B7RP1 da invenção é inserida em um vetor de expressão apropriado usando-se técnicas de ligação padronizadas. Em uma modalidade, a região constante de cadeia pesada ou de cadeia leve do anticorpo anti-B7RP1 é anexada à terminação C da região variável apropriada e é ligada em um vetor de expressão. O vetor é tipicamente selecionado para ser funcional na célula hospedeira particular empregada (isto é, o vetor é compatível com a maquinaria da célula hospedeira, de modo que a amplificação do gene e/ou a expressão do gene possam ocorrer). Para uma revisão dos vetores de expressão, vide METHODS IN ENZYMOLOGY 185 (Goeddel, ed.), 1990, Academic Press.

[000135] Tipicamente, os vetores de expressão usados em qualquer uma das células hospedeiras conterá sequências para manutenção de plasmídeo e para clonagem e expressão de sequências de nucleotídeos exógenas. Essas sequências coletivamente chamadas de "sequências de flanco", em certas modalidades, tipicamente incluirão uma ou mais das seguintes sequências de nucleotídeos: um promotor, uma ou mais sequências intensificadoras, uma origem de replicação, uma sequência de término de transcrição, uma sequência de íntron completa contendo um sítio de junção doador e um receptor, uma sequência que codifique uma sequência líder para secreção de polipeptídeo, um sítio de ligação a ribossomo, uma sequência de

poliadenilação, uma região de poliêlo para inserção do ácido nucléico que codifica o polipeptídeo a ser expressado e um elemento marcador selecionável. Cada uma dessas sequências é discutida abaixo.

[000136] Opcionalmente, o vetor pode conter uma sequência codificadora de "etiqueta", isto é, uma molécula oligonucleotídica localizada na extremidade 5' ou 3' da sequência codificadora do polipeptídeo do anticorpo anti-B7RP1; a sequência oligonucleotídica codifica poliHis (como hexaHis) ou outra "etiqueta", como FLAG, HA (vírus da hemaglutinina influenza), ou myc, para a qual existam anticorpos comercialmente disponíveis. Essa etiqueta é tipicamente fusionada ao polipeptídeo pela expressão do polipeptídeo e pode servir de meio de purificação por afinidade ou detecção do anticorpo anti-B7RP1 da célula hospedeira. A purificação por afinidade pode ser realizada, por exemplo, por cromatografia em coluna usando-se anticorpos contra a etiqueta como uma matriz de afinidade. Opcionalmente, a etiqueta pode ser subsequentemente removida do polipeptídeo do anticorpo anti-B7RP1 por vários meios, como usando certas peptidases para clivagem.

[000137] Sequências de flanco podem ser homólogas (isto é, da mesma espécie e/ou cepa como célula hospedeira), heterólogas (isto é, de uma espécie diferente da espécie ou cepa da célula hospedeira), híbridas (isto é, uma combinação de sequências de flanco de mais de uma fonte), sintéticas ou nativas. Assim, a fonte de uma sequência de flanco pode ser qualquer organismo procariótico ou eucariótico, qualquer organismo vertebrado ou invertebrado, ou qualquer planta, contanto que a sequência de flanco seja funcional na e possa ser ativada pela maquinaria da célula hospedeira.

[000138] Sequências de flanco utilizáveis nos vetores desta invenção podem ser obtidas por qualquer um dos vários métodos conhecidos na técnica. Tipicamente, sequências de flanco aqui utilizáveis terão sido

previamente identificadas por mapeamento e/ou por digestão com endonuclease de restrição e podem ser, portanto, isoladas da fonte de tecido apropriada usando-se as endonucleases de restrição apropriadas. Em alguns casos, a sequência de nucleotídeos completa de uma sequência de flanco pode ser conhecida. Aqui, a sequência de flanco pode ser sintetizada usando-se os métodos aqui descritos para síntese ou clonagem de ácidos nucléicos.

[000139] Se toda ou apenas uma parte da sequência de flanco for conhecida, pode ser obtida usando-se reação em cadeia de polimerase (PCR) e/ou por triagem de uma biblioteca genômica com uma sonda adequada, como um oligonucleotídeo e/ou fragmento de sequência de flanco da mesma espécie ou de outra. Se a sequência de flanco não for conhecida, um fragmento de DNA contendo uma sequência de flanco pode ser isolado de um pedaço maior do DNA que pode conter, por exemplo, uma sequência codificadora ou mesmo outro gene ou genes. O isolamento pode ser realizado por digestão com endonuclease de restrição para produzir o fragmento de DNA apropriado, seguido por isolamento usando-se purificação em gel de agarose, cromatografia em coluna Qiagen® (Chatsworth, CA) ou outros métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. A seleção de enzimas adequadas para atingir essa finalidade será prontamente aparente para aqueles versados na técnica.

[000140] Uma origem de replicação é tipicamente uma parte daqueles vetores de expressão procarióticos comprados comercialmente, e a origem ajuda na amplificação do vetor em uma célula hospedeira. Se o vetor de escolha não contiver um sítio de origem de replicação, pode ser sintetizado quimicamente com base em uma sequência conhecida e ligado no vetor. Por exemplo, a origem de replicação do plasmídeo pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, e várias

origens virais (por exemplo, SV40, políoma, adenovírus, vírus da estomatite vesicular (VSV) ou papilomavírus, como HPV ou BPV) são utilizáveis para vetores de clonagem em células de mamíferos. Geralmente, o componente de origem de replicação não é necessário para vetores de expressão em mamíferos (por exemplo, a origem SV40 frequentemente só é usada porque também contém o promotor precoce do vírus).

[000141] Uma sequência de término de transcrição está tipicamente localizada de 3' à extremidade de uma região codificadora de polipeptídeo e serve para terminar a transcrição. Normalmente, uma sequência de término de transcrição em células procarióticas é um fragmento rico em G-C seguido por uma sequência poli-T. Embora a sequência seja facilmente clonada de uma biblioteca ou mesmo comprada comercialmente como parte de um vetor, também pode ser prontamente sintetizada usando-se métodos para síntese de ácidos nucleicos, como aqueles aqui descritos.

[000142] Um gene marcador selecionável codifica uma proteína necessária para a sobrevivência e o crescimento de uma célula hospedeira cultivada em um meio de cultura seletiva. Genes marcadores de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, tetraciclina ou canamicina para células hospedeiras procarióticas; (b) complementam deficiências auxotróficas da célula; ou (c) suprem nutrientes críticos não disponíveis em meios complexos ou definidos. Marcadores selecionáveis exemplificativos são o gene da resistência a canamicina, o gene de resistência a ampicilina e o gene de resistência a tetraciclina. Vantajosamente, um gene de resistência a neomicina também pode ser usado para seleção tanto em células hospedeiras procarióticas, quanto eucarióticas.

[000143] Outros genes selecionáveis podem ser usados para

amplificar o gene que será expresso. A amplificação é o processo pelo qual os genes que são requeridos para a produção de uma proteína crítica para o crescimento ou sobrevivência da célula são reiterados em tandem dentro dos cromossomos de gerações sucessivas de células recombinantes. Exemplos de marcadores selecionáveis adequados para células de mamíferos incluem os genes da diidrofolato redutase (DHFR) e da timidina quinase sem promotor. Transformantes de células de mamíferos são colocados sob pressão de seleção na qual apenas os transformantes estejam unicamente adaptados para sobreviver em virtude do gene selecionável presente no vetor. A pressão de seleção é imposta por cultivo das células transformadas sob condições em que a concentração do agente de seleção no meio seja sucessivamente aumentada, levando, dessa forma, à amplificação tanto do gene selecionável, quanto do DNA que codifica outro gene, como um anticorpo que se ligue ao polipeptídeo B7RP1. Como resultado, quantidades aumentadas de um polipeptídeo, como um anticorpo anti-B7RP1, são sintetizadas a partir do DNA amplificado.

[000144] Um sítio de ligação a ribossomo normalmente é necessário para início da tradução de mRNA e se caracteriza por uma sequência de Shine-Dalgarno (procariotos) ou uma sequência de Kozak (eucariotos). O elemento está tipicamente localizado em 3' com relação ao promotor e 5' com relação à sequência codificadora do polipeptídeo a ser expresso.

[000145] Em alguns casos, como quando se deseja a glicosilação em um sistema de expressão em célula hospedeira eucariótica, podem-se manipular as várias pré- ou pró-sequências para melhorar a glicosilação ou o rendimento. Por exemplo, pode-se alterar o sítio de clivagem de peptidase de um peptídeo de sinal particular ou adicionar pró-sequências que também possam afetar a glicosilação. O produto

de proteína final pode ter, na posição -1 (com relação ao primeiro aminoácido da proteína madura) um ou mais aminoácidos adicionais incidentes à expressão, que podem não ter sido totalmente removidos. Por exemplo, o produto de proteína final pode ter um ou dois resíduos de aminoácidos encontrados no sítio de clivagem de peptidase ligados à terminação amino. Alternativamente, o uso de alguns sítios de clivagem com enzima pode resultar em uma forma ligeiramente truncada do polipeptídeo desejado, se a enzima cortar nessa área dentro do polipeptídeo maduro.

[000146] Vetores de expressão e clonagem da invenção tipicamente contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operacionalmente ligado à molécula que codifica o anticorpo anti-B7RP1. Os promotores são sequências não transcritas localizadas a montante (isto é, 5') do códon de partida de um gene estrutural (em geral até cerca de 100 a 1.000 pb) que controla a transcrição do gene estrutural. Os promotores são convencionalmente agrupados em uma de duas classes: promotores induzíveis e promotores constitutivos. Promotores induzíveis iniciam níveis aumentados de transcrição do DNA sob seu controle em resposta a alguma alteração nas condições de cultura, como a presença ou ausência de um nutriente ou uma mudança de temperatura. Promotores constitutivos, por outro lado, transcrevem uniformemente genes aos quais estejam operacionalmente ligados, isto é, com pouco ou nenhum controle sobre a expressão do gene. Um grande número de promotores, reconhecidos por várias células hospedeiras em potencial, são bem-conhecidos. Um promotor adequado está operacionalmente ligado ao DNA que codifica a cadeia pesada ou cadeia leve que compõe um anticorpo anti-B7RP1 da invenção por remoção do promotor do DNA de fonte mediante digestão com enzima de restrição e inserção da sequência promotora desejada no vetor.

[000147] Promotores adequados para uso com hospedeiros de levedura também são bem-conhecidos na técnica. Intensificadores de levedura são vantajosamente usados com promotores de levedura. Promotores adequados para uso com células hospedeiras de mamíferos são bem-conhecidos e incluem, mas não se limitam a, aqueles obtidos dos genomas de vírus, como vírus de poliomia, vírus da varíola de aves, adenovírus (como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e Vírus Símio 40 (SV40). Outros promotores de mamíferos adequados incluem promotores de mamíferos heterólogos, por exemplo, promotores do choque térmico e o promotor da actina.

[000148] Promotores adicionais que podem ser de interesse incluem, mas não se limitam a: promotor precoce de SV40 (Bernoist e Chambon, 1981, Nature 290: 304-10); promotor de CMV (Thomsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 659-663); o promotor contido na repetição terminal longa 3' do vírus de sarcome Rous (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22: 787-97); promotor da timidina quinase de herpes (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sic. USA 78: 1444-45); sequências promotora e reguladora do gene da metalotionina (Brinster et al., 1982, Nature 296: 39-42); e promotores procarióticos, como o promotor da beta-lactamase (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 75: 3727-31); ou o promotor TAC (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sic. USA, 80: 21-25). Também são de interesse as seguintes regiões de controle de transcrição de animais, que exibem especificidade de tecido e foram utilizadas em animais transgênicos: a região de controle do gene da elastase I, que é ativa em células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell 38: 639-46; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409 (1986); MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425-515); a região de controle do gene da insulina, que é ativa em células beta pancreáticas (Hanahan,

1985, *Nature* 315: 115-22); a região de controle do gene da imunoglobulina, que é ativa em células linfóides (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38: 647-58; Adames et al., 1985, *Nature* 318: 533-38; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 1436-44); a região de controle do vírus mamário de camundongo, que é ativa em células testiculares, de mama, linfóides e mastócitos (Leder et al., 1986, *Cell* 45: 485-95); a região de controle do gene da albumina, que é ativa no fígado (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1: 268-76); a região de controle do gene da alfa-feto-proteína, que é ativa no fígado (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5: 1639-48; Hammer et al., 1987, *Science* 235: 53-58); a região de controle do gene da 1-antitripsina, que é ativa no fígado (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1: 161-71); a região de controle do gene da betaglobina, que é ativa em células mielóides (Mogam et al., 1985, *Nature* 315: 338-40; Kollias et al., 1986, *Cell* 46: 89-94); a região de controle do gene da proteína básica da mielina, que é ativa em células oligodendrocíticas no cérebro (Readhead et al., 1987, *Cell* 48: 703-12); a região de controle do gene da cadeia leve 2 da miosina, que é ativa em músculos esqueléticos (Sani, 1985, *Nature* 314: 283-86); e a região de controle do gene do hormônio liberador gonadotrófico, que é ativa no hipotálamo (Mason et al., 1986, *Science* 234: 1372-78).

[000149] Uma sequência intensificadora pode ser inserida no vetor para aumentar a transcrição de DNA que codifica a cadeia leve ou pesada que compõe o anticorpo anti-B7RP1 da invenção por eucariotos superiores. Os intensificadores são elementos de ação cis do DNA, normalmente de cerca de 10 – 300 pb de comprimento, que agem sobre o promotor para aumentar a transcrição. Os intensificadores são relativamente independentes da orientação e posição, tendo sido encontrado tanto em posições 5', quanto 3' com relação à unidade de transcrição. São conhecidas várias sequências

intensificadoras disponíveis de genes de mamíferos (por exemplo, globina, elastase, albumina, alfa-feto-proteína e insulina). Tipicamente, entretanto, usa-se um intensificador de um vírus. O intensificador de SV40, o intensificador do promotor precoce de citomegalovírus, o intensificador de polioma e intensificadores de adenovírus conhecidos na técnica são elementos intensificadores exemplificativos para a ativação de promotores eucarióticos. Embora o intensificador possa estar posicionado no vetor em 5' ou 3' com relação à sequência codificadora, está tipicamente localizado em um sítio a 5' do promotor.

[000150] Vetores de expressão da invenção podem ser construídos a partir de um vetor de partida, como um vetor comercialmente disponível. Esses vetores podem ou não conter todas as sequências de flanco desejadas. Quando uma ou mais das sequências de flanco aqui descritas não estão já presentes no vetor, elas podem ser individualmente obtidas e ligadas no vetor. Métodos usados para obtenção de cada sequência de flanco são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica.

[000151] Depois que o vetor tiver sido construído, e uma molécula de ácido nucléico que codifica uma cadeia leve, uma cadeia pesada ou uma cadeia leve e uma cadeia pesada que compõem um anticorpo anti-B7RP1 tiver sido inserida no sítio apropriado do vetor, o vetor completo pode ser inserido em uma célula hospedeira adequada para amplificação e/ou expressão de polipeptídeo. A transformação de um vetor de expressão para um anticorpo anti-B7RP1 em uma célula hospedeira selecionada pode ser realizada por métodos bem-conhecidos, incluindo transfecção, infecção, co-precipitação com fosfato de cálcio, eletroporação, microinjeção, lipofecção, transfecção mediada por DEAE-dextrano ou outras técnicas conhecidas. O método selecionado será, em parte, função do tipo de célula hospedeira a ser usada. Esses métodos e outros métodos adequados são bem-

conhecidos por aqueles versados na técnica e são apresentados, por exemplo, em Sambrook et al., supra.

[000152] Uma célula hospedeira, quando cultivada sob condições apropriadas, sintetiza um anticorpo anti-B7RP1 que pode ser subsequentemente coletado do meio de cultura (se a célula hospedeira secretá-lo no meio) ou diretamente da célula hospedeira que o produz (se não for secretado). A seleção de uma célula hospedeira apropriada dependerá de vários fatores, como níveis de expressão desejados, modificações do polipeptídeo que sejam desejáveis ou necessárias para atividade (como glicosilação ou fosforilação) e facilidade de dobramento em uma molécula biologicamente ativa.

[000153] Linhagens celulares de mamíferos disponíveis como hospedeiros para expressão são bem-conhecidas na técnica e incluem, mas não se limitam a, linhagens celulares imortalizadas disponíveis na Coleção Americana de Cultura de Tipo (ATCC), incluindo, mas não limitadas a, células de ovário de hamster chinês (CHO), células HeLa, células de rim de hamster recém-nascido (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2), e inúmeras outras linhagens celulares. Em certas modalidades, as linhagens celulares podem ser selecionadas mediante determinação de quais linhagens celulares têm elevados níveis de expressão e produzem constitutivamente anticorpos com propriedades de ligação a B7RP1. Em outra modalidade, uma linhagem celular da linhagem de células B que não produz seu próprio anticorpo, mas que tem a capacidade de produzir e secretar um anticorpo heterólogo pode ser selecionada.

[000154] Anticorpos da invenção são utilizáveis para a detecção de B7RP1 em amostras biológicas e identificação de células ou tecidos que produzam a proteína B7RP1. Anticorpos da invenção que se ligam

especificamente a B7RP1 podem ser utilizados no tratamento de doenças mediadas por B7RP1. Os ditos anticorpos podem ser usados em ensaios de ligação para detectar B7RP1 e para inibir B7RP1 de formar um complexo com receptores de B7RP1. Os ditos anticorpos que se ligam a B7RP1 e bloqueiam a interação com outros compostos de ligação podem ter uso terapêutico na modulação de doenças mediadas por B7RP1. Em certas modalidades, os anticorpos contra B7RP1 podem bloquear a ligação de B7RP1 a seu receptor, o que pode resultar no rompimento da cascata de transdução de sinal induzida por B7RP1.

[000155] A presente invenção também refere-se ao uso de um ou mais anticorpos da presente invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio ou condição causada pela expressão aumentada de B7RP1 ou sensibilidade aumentada a B7RP1 em um paciente, como qualquer um dos distúrbios ou condições aqui apresentados.

[000156] Em certas modalidades, a invenção apresenta composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou de uma pluralidade dos anticorpos da invenção juntamente com um diluente, veículo, solubilizador, emulsificador, conservante e/ou adjuvante farmacêuticamente aceitável. Materiais de formulação aceitáveis são não tóxicos para receptores às dosagens e concentrações empregadas. Em modalidades preferidas, apresentam-se composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpos anti-B7RP1.

[000157] Em certas modalidades, materiais de formulação aceitáveis são não tóxicos para receptores às dosagens e concentrações empregadas.

[000158] Em certas modalidades, a composição farmacêutica pode conter materiais de formulação para modificar, manter ou preservar,

por exemplo, o pH, osmolaridade, viscosidade, clareza, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou liberação, adsorção ou penetração da composição. Nessas modalidades, materiais de formulação adequados incluem, mas não se limitam a, aminoácidos (como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina); antimicrobianos; antioxidantes (como ácido ascórbico, sulfito de sódio ou hidrogeniossulfito de sódio); tampões (como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos ou outros ácidos orgânicos); agentes de volume (como manitol ou glicina); agentes quelantes (como ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA)); agentes de formação de complexo (como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina ou hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monossacarídeos; dissacarídeos; e outros carboidratos (como glicose, manose ou dextrinas); proteínas (como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas); agentes corantes, de sabor e diluição; agentes emulsificantes; polímeros hidrofílicos (como polivinilpirrolidona); polipeptídeos de baixo peso molecular; contra-íons formadores de sal (como sódio); conservantes (como cloreto de benzalcônio, ácido benzóico, ácido salicílico, timerosal, álcool fenetílico, metilparaben, propilparaben, clorexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogênio); solventes (como glicerina, propileno glicol ou polietileno glicol); álcoois de açúcares (como manitol ou sorbitol); agentes de suspensão; tensoativos ou agentes umectantes (como Pluronic, PEG, ésteres de sorbitano, polissorbato, como polissorbato 20, polissorbato 80, Triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes de aumento da estabilidade (como sacarose ou sorbitol); agentes de aumento da tonicidade (como haletos de metais alcalinos, por exemplo, cloreto de sódio ou potássio, manitol sorbitol); veículos de distribuição; diluentes; excipientes e/ou adjuvantes farmacêuticos. Vide REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª Edição (A. R. Gennaro, ed.), 1990,

Mack Publishing Company.

[000159] Em certas modalidades, a composição farmacêutica ótima será determinada por aqueles versados na técnica dependendo, por exemplo, da via de administração desejada, formato de distribuição e dosagem desejada. Vide, por exemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra. Em certas modalidades, essas composições podem influenciar o estado físico, estabilidade, taxa de liberação *in vivo* e taxa de depuração *in vivo* dos anticorpos da invenção.

[000160] Em certas modalidades, o veículo ou carreador primário em uma composição farmacêutica pode ser de natureza aquosa ou não aquosa. Por exemplo, um veículo ou carreador adequado pode ser água para injeção, solução salina fisiológica ou fluido cérebro-espinhal artificial, possivelmente suplementado com outros materiais comuns em composições para administração parenteral. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina sérica são veículos exemplificativos adicionais. Em certas modalidades, as composições farmacêuticas da presente invenção compreendem tampão Tris de pH de cerca de 7,0 – 8,5, ou tampão acetato de pH de cerca de 4,0 – 5,5, e também podem incluir sorbitol, sacarose, Tween-20 e/ou um substituto adequados para eles. Em certas modalidades da invenção, composições de anticorpo anti-B7RP1 podem ser preparadas para armazenamento por mistura da composição selecionada, com o grau desejado de pureza, com agentes de formulação opcionais (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra), na forma de uma torta liofilizada ou solução aquosa. Além disso, em certas modalidades, o produto de anticorpo anti-B7RP1 pode ser formulado como um liofilizado usando-se excipientes apropriados, como sacarose.

[000161] As composições farmacêuticas da invenção podem ser

selecionadas para distribuição parenteral. Alternativamente, as composições podem ser selecionadas para inalação ou para distribuição através do trato digestivo, como por via oral. A preparação dessas composições farmacologicamente aceitáveis está dentro dos conhecimentos daqueles versados na técnica.

[000162] Os componentes de formulação estão presentes em concentrações que sejam aceitáveis para o sítio de administração. Em certas modalidades, usam-se tampões para manter a composição em pH fisiológico ou pH ligeiramente menor, tipicamente dentro de uma faixa de pH de cerca de 5 a cerca de 8.

[000163] Quando se considera a administração parenteral, as composições terapêuticas para uso nesta invenção podem ser fornecidas na forma de uma solução aquosa aceitável para via parenteral e livre de pirógenos, compreendendo o anticorpo anti-B7RP1 desejado em um veículo farmacologicamente aceitável. Um veículo particularmente adequado para injeção parenteral é água destilada estéril, em que o anticorpo anti-B7RP1 seja formulado como uma solução isotônica estéril, apropriadamente preservada. Em certas modalidades, a preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com um agente, como microesferas injetáveis, partículas bioerodíveis, compostos poliméricos (como ácido polilático ou ácido poliglicólico), glóbulos ou lipossomos, que possa proporcionar uma liberação controlada ou prolongada do produto, que pode ser distribuído mediante injeção de depósito. Em certas modalidades, também se pode usar ácido hialurônico, que tem o efeito de promover uma duração prolongada na circulação. Em certas modalidades, podem-se usar dispositivos implantáveis de distribuição de fármacos para introduzir a molécula de anticorpo desejada.

[000164] Composições farmacêuticas da invenção podem ser formuladas para inalação. Em certas modalidades, anticorpos anti-

B7RP1 são vantajosamente formulados como um pó seco inalável. Em certas modalidades, soluções de inalação de anticorpo anti-B7RP1 também podem ser formuladas com um propelente para distribuição por aerossol. Em certas modalidades, as soluções podem ser nebulizadas. A administração pulmonar e métodos de formulação para ele são adicionalmente descritos nos Pedido de Patente Internacional nº PCT/US94/001875, que é incorporada por referência e descreve a distribuição pulmonar de proteínas quimicamente modificadas.

[000165] Também se considera que as formulações possam ser administradas por via oral. Anticorpos anti-B7RP1 que sejam administrados dessa maneira podem ser formulados com ou sem os veículos comumente usados na combinação de formas de dosagem sólidas, como comprimidos e cápsulas. Em certas modalidades, pode-se projetar uma cápsula para liberar a parte ativa da formulação no ponto do trato gastrointestinal em que a biodisponibilidade seja maximizada, e a degradação pré-sistêmica seja minimizada. Agentes adicionais podem ser incluídos para facilitar a absorção do anticorpo anti-B7RP1. Diluentes, sabores, ceras de baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes de desintegração de comprimidos e aglutinantes também podem ser empregados.

[000166] Apresenta-se uma composição farmacêutica da invenção que compreende uma quantidade eficaz de um ou uma pluralidade de anticorpos anti-B7RP1 em mistura com excipientes não tóxicos que sejam adequados para fabricação de comprimidos. Pela dissolução dos comprimidos em água estéril, ou outro veículo apropriado, as soluções podem ser preparadas em forma de dose unitária. Excipientes adequados incluem, mas não se limitam a, diluentes inertes, como carbonato de cálcio, carbonato ou bicarbonato de sódio, lactose ou fosfato de cálcio; ou agentes de ligação, como amido,

gelatina ou goma-arábica; ou agentes lubrificantes, como estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

[000167] Composições farmacêuticas adicionais serão evidentes para aqueles versados na técnica, incluindo formulações envolvendo anticorpos anti-B7RP1 em formulações de distribuição prolongada ou controlada. Técnicas para a formulação de vários outros meios de distribuição prolongada ou controlada, como veículos de lipossomos, micropartículas bioerodíveis ou glóbulos porosos e injeções de depósito, também são conhecidas por aqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Pedido de Patente Internacional nº PCT/US93/00829, que é incorporado por referência e descreve a liberação controlada de micropartículas poliméricas porosas para a distribuição de composições farmacêuticas. Preparações de liberação prolongada podem incluir matrizes poliméricas semipermeáveis na forma de artigos modelados, por exemplo, películas ou microcápsulas. Matrizes de liberação prolongada podem incluir poliésteres, hidrogéis, polilactidas (conforme descrito na patente norte-americana nº 3.773.919 e na Publicação de Pedido de Patente Europeia nº EP 058481, que são aqui incorporados por referência), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 22: 547-556), poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277) e Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12: 98-105), acetato de etileno vinila (Langer et al., *supra*) ou ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Publicação de Pedido de Patente Europeia nº EP 133.988). Composições de liberação prolongada também podem incluir lipossomos, que podem ser preparados por qualquer um dos vários métodos conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688-3692; Publicações de Pedidos de Patentes Europeias nº EP 036.676, EP 088.046 e EP 143.949, aqui incorporadas por referência.

[000168] Composições farmacêuticas usadas para administração *in vivo* são tipicamente fornecidas como preparações estéreis. A esterilização pode ser realizada por filtração através de membranas de filtração estéril. Quando a composição é liofilizada, a esterilização usando esse método pode ser conduzida antes ou depois da liofilização e reconstituição. Composições para administração parenteral podem ser armazenadas em forma liofilizada ou em solução. Composições parenterais em geral são colocadas em um recipiente com um orifício de acesso estéril, por exemplo, uma bolsa ou frasco de solução intravenosa com uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[000169] Uma vez que a composição farmacêutica tenha sido formulada, pode ser armazenada em frascos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou como um pó desidratado ou liofilizado. Essas formulações podem ser armazenadas em forma pronta para o uso ou em uma forma (por exemplo, liofilizada), que seja reconstituída antes da administração.

[000170] A invenção também apresenta kits para a produção de uma unidade de administração de dose única. Os kits da invenção podem conter tanto um primeiro recipiente com uma proteína seca, quanto um segundo recipiente com uma formulação aquosa. Em certas modalidades da invenção, apresentam-se kits contendo seringas pré-enchidas de câmara única ou múltiplas (por exemplo, seringas para líquidos e liosseringas).

[000171] A quantidade eficaz de uma composição farmacêutica contendo anticorpo anti-B7RP1 a ser empregada terapeuticamente dependerá, por exemplo, do contexto e objetivos terapêuticos. Aqueles versados na técnica perceberão que os níveis de dosagem apropriados para tratamento variarão dependendo, em parte, da molécula distribuída, da indicação para a qual o anticorpo anti-B7RP1

está sendo usado, da via de administração e do tamanho (peso corporal, superfície corporal ou tamanho do órgão) e/ou condição (idade e saúde geral) do paciente. Em certas modalidades, o clínico pode titular a dosagem e modificar a via de administração para obter o efeito terapêutico ótimo. A dosagem típica pode variar de cerca de 0,1 µg/kg até cerca de 30 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores acima mencionados. Em certas modalidades, a dosagem pode variar de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg; de 1 µg/kg até cerca de 30 mg/kg; ou de 5 µg/kg até cerca de 30 mg/kg.

[000172] A frequência de dosagem dependerá dos parâmetros farmacocinéticos do anticorpo anti-B7RP1 particular na formulação usada. Tipicamente, o clínico administra a composição até que se atinja uma dosagem que consiga o efeito desejado. A composição pode, conseqüentemente, ser administrada como uma dose única, como duas ou mais doses (que podem ou não conter a mesma quantidade da molécula desejada) durante o tempo, ou como uma infusão contínua mediante um dispositivo de implante ou cateter. Rotineiramente, aqueles versados na técnica refinam ainda mais a dosagem apropriada, o que está dentro do âmbito de tarefas rotineiramente efetuadas por eles. Dosagens apropriadas podem ser determinadas mediante uso de dados de dose-resposta. Em certas modalidades, os anticorpos da invenção podem ser administrados a pacientes durante todo um período de tempo prolongado. A administração crônica de um anticorpo da invenção minimiza a resposta imune adversa ou alérgica comumente associada a anticorpos que sejam gerados contra um antígeno humano em um animal não humano, por exemplo, um anticorpo não completamente humano produzido em uma espécie não humana.

[000173] A via de administração da composição farmacêutica está de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, oral, mediante injeção

por vias intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracebrebroventricular, intramuscular, intra-ocular, intra-arterial, intraportal ou intralesional; por sistemas de liberação prolongada ou por dispositivos de implante. Em certas modalidades, as composições podem ser administradas por injeção de bolo ou continuamente por injeção, ou por dispositivo de implante.

[000174] A composição também pode ser administrada localmente mediante implante de uma membrana, esponja ou outro material apropriado no qual a molécula desejada tenha sido absorvida ou encapsulada. Em certas modalidades, quando se usa um dispositivo de implante, o dispositivo pode ser implantado em qualquer tecido ou órgão adequado, e a distribuição da molécula desejada pode ser por difusão, bolo de liberação controlada no tempo ou administração contínua.

[000175] Também pode ser desejável usar composições farmacêuticas de anticorpo anti-B7RP1 de acordo com a invenção ex vivo. Nesses casos, células, tecidos ou órgãos que tenham sido removidos do pacientes são descritos a composições farmacêuticas de anticorpo anti-B7RP1, após o que as células, tecidos e/ou órgãos são subsequentemente implantados de volta no paciente.

[000176] Em particular, anticorpos anti-B7RP1 podem ser distribuídos por implante de certas células que tenham sido geneticamente manipuladas, usando-se métodos como os aqui descritos, para expressar e secretar o polipeptídeo. Em certas modalidades, essas células podem ser células animais ou humanas, e podem ser autólogas, heterólogas ou xenogênicas. Em certas modalidades, as células podem ser imortalizadas. Em outras modalidades, para diminuir as chances de uma resposta imunológica, as células podem ser encapsuladas para evitar infiltração de tecidos em volta. Em modalidades adicionais, os materiais de encapsulação

são tipicamente envoltórios ou membranas poliméricas biocompatíveis e semipermeáveis que permitam a liberação do(s) produto(s) de proteína, mas impeçam a destruição das células pelo sistema imune do paciente ou por outros fatores prejudiciais dos tecidos em volta.

EXEMPLOS

[000177] Os exemplos a seguir, incluindo os experimentos conduzidos e resultados conseguidos, são apresentados apenas para fins ilustrativos e não devem ser tomados como limitativos da invenção.

Exemplo 1

[000178] Produção de Anticorpos Monoclonais Humanos Contra Proteína-1 Relacionada a B7 (B7RP1)

Antígeno

[000179] B7RP-1 humano recombinante purificado (hB7RP-1), preparado conforme descrito na Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 00/46240, que é aqui incorporada por referência, ou células CHO transfectadas para expressar hB7RP-1 foram usados como antígeno. B7RP-1 humano maduro tem a sequência de aminoácidos dos resíduos X a 302 na sequência mostrada no WO 00/46240 como SEQ ID NO: 17, em que X pode ser 19, 20, 21, 22, 24 ou 28.

Camundongos HuMab Transgênicos

[000180] Anticorpos monoclonais completamente humanos contra B7RP-1 foram preparados usando-se as cepas HCo7 e HCo12 de camundongos transgênicos HuMab, ambas expressando genes de anticorpo humano. Em ambas essas cepas de camundongos, o gene da cadeia leve kapa de camundongo endógeno foi homozigoticamente rompido conforme descrito em Chen et al. (1993) EMBO J. 12: 811-820, e o gene da cadeia pesada de camundongo endógeno foi homozigoticamente rompido conforme descrito no Exemplo 1 da

Publicação PCT WO 01/09187. Cada uma dessas cepas de camundongos é portadora de um transgene de cadeia leve kapa humana, KCo5, conforme descrito em Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. A cepa HCo7 é portadora do transgene de cadeia pesada humana HCo7, conforme descrito nas patentes norte-americanas nº 5.545.806, 5.625.825 e 5.545.807. A cepa HCo12 é portadora do transgene de cadeia pesada humana HCo12, conforme descrito no Exemplo 2 da Publicação PCT WO 01/09187.

Imunizações de HuMab

[000181] Para gerar anticorpos monoclonais completamente humanos contra B7RP-1, camundongos HuMab da cepa HCo7 ou HCo12 foram imunizados com B7RP-1 recombinante purificado ou células CHO transfectadas para expressar B7RP-1. Esquemas de imunização gerais para camundongos HuMab são descritos em Lonberg et al. (1994) Nature (368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851, e Publicação PCT WO 98/24884. Os camundongos tinham 6 – 16 semanas de idade quando da primeira infusão de antígeno. Uma preparação recombinante purificada de antígeno B7RP-1 (50 µg) ou uma preparação de células CHO transfectadas ($3,5 \times 10^6$ – 1×10^7 células) foi usada para imunizar os camundongos HuMab por via intraperitoneal.

[000182] Os camundongos transgênicos foram imunizados duas vezes com antígeno purificado em adjuvante de Freund completo por via intraperitoneal, seguido por 2 – 4 semanas de imunizações IP (até um total de 8 imunizações) com o antígeno purificado em adjuvante de Freund incompleto. A imunização com células CHO transfectadas para expressar B7RP-1 foi a mesma, exceto que o adjuvante de Freund completo e o adjuvante de Freund incompleto não foram usados com as células. A resposta imune foi monitorizada por sangramentos retroorbitais. O plasma foi triado por ELISA (conforme descrito abaixo),

e os camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-B7RP-1 foram usados para fusões. Os camundongos receberam um reforço por via intravenosa com o antígeno 3 e 2 dias antes do sacrifício e remoção do baço. Tipicamente, foram realizadas 10 – 20 fusões para cada antígeno. Um total de 28 camundongos das cepas de camundongos HCo7 e HCo12 foram imunizados com B7RP-1.

Seleção de Camundongos HuMab Produtores de Anticorpos Anti-B7RP-1

[000183] Para selecionar camundongos HuMab produtores de anticorpos que se ligam a B7RP-1, soros de camundongos imunizados foram testados por ELISA conforme descrito por Fishwild et al. (1996). Resumidamente, as placas de microtitulação foram revestidas com B7RP-1 recombinante purificado a 1 – 2 µg/mL em PBS, 50 µL/cavidade foram incubados a 4°C durante uma noite, então, bloqueados com 200 µL/cavidade de soro de galinha a 5% em PBS/Tween (0,05%). Diluições de plasma de camundongos imunizados com B7RP-1 foram adicionadas a cada cavidade e incubadas durante 1 – 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween e, então, incubadas com um anticorpo policlonal Fc de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Depois da lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/mL) e analisadas por um espectrofotômetro a OD 415 – 495. Os camundongos que desenvolveram os títulos mais elevados de anticorpos anti-B7RP-1 foram usados para fusões. As fusões foram realizadas conforme descrito abaixo, e os sobrenadantes de hibridomas foram testados quanto à atividade anti-B7RP-1 por ELISA.

Geração de Hibridomas Produtores de Anticorpos Monoclonais Humanos Contra B7RP-1

[000184] Os esplenócitos de camundongo, isolados dos camundongos HuMab, foram fusionados com PEG a uma linhagem celular de mieloma de camundongo com base em protocolos padronizados. Os hibridomas resultantes foram, então, triados quanto à produção de anticorpos específicos para o antígeno. Suspensões de células únicas de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados foram fusionadas a um quarto do número de células de mieloma de camundongo não secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581) com 50% de PEG (Sigma). As células foram plaqueadas a aproximadamente 1×10^5 /cavidade em placas de microtitulação de fundo plano, seguido por uma incubação de cerca de duas semanas em meio seletivo contendo 10% de soro bovino fetal, 10% de meio condicionado P388D1 (ATCC, CRL TIB-63), 3 – 5% de Origen (IGEN) em DMEM (Mediatech, CRL 10013, com alta glicose, L-glutamina e piruvato de sódio) mais 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mg/mL de gentamicina e 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Após 1 – 2 semanas, as células foram cultivadas em meio no qual o HAT foi substituído por HT. Cavidades individuais foram, então, triadas por ELISA (descrito acima) quanto a anticorpos IgG monoclonais anti-B7RP-1 humanos. Uma vez ocorrido um amplo crescimento do hibridoma, o meio foi monitorizado normalmente após 10 – 14 dias. Os hibridomas secretores de anticorpos foram replaqueados, novamente triados e, caso ainda positivos para IgG humana, os anticorpos monoclonais anti-B7RP-1 foram subclonados pelo menos duas vezes por diluição limitativa. Os subclones estáveis foram, então, cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização adicional.

Exemplo 2

Clonagem das Cadeias Pesada e Leve do Anticorpo Anti-B7RP1

[000185] O hibridoma que expressa o anticorpo monoclonal de

ligação a B7RP1 16H foi usado como uma fonte para isolar RNA total usando reagente TRIzol® (Invitrogen). Um oligonucleotídeo 5' RACE (amplificação rápida de extremidades de cDNA) (5'- CGA CUG GAG CAC GAG GAC ACU GAC AUG GAC UGA AGG AGU AGA AA -3'; SEQ ID NO: 69) foi ligado ao RNA usando-se os componentes e o protocolo do kit GeneRacer® (Invitrogen). A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando-se um primer aleatório com um adaptador de extensão (5'- GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT -3') (SEQ ID NO: 59), e um ensaio preparatório 5' RACE (amplificação rápida de extremidades de cDNA) foi efetuado usando-se o kit GeneRacer® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Para a preparação de cDNA codificador de cadeia leve completo, o primer direto foi o primer aninhado de GeneRacer®, e o primer reverso foi (5'- GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG -3') (SEQ ID NO: 60). Para a preparação de cDNA que codifica a região variável da cadeia pesada, o primer direto foi o primer aninhado de GeneRacer®, e o primer reverso foi (5'- TGA GGA CGC TGA CCA CAC G -3') (SEQ ID NO: 61). Os produtos de RACE foram clonados em pCR4-TOPO (Invitrogen), e as sequências foram determinadas. As sequências de consenso foram usadas para projetar primers para amplificação por PCR de cadeia de anticorpo de comprimento total.

[000186] Para a preparação de cDNA que codifica cadeia leve kapa de anti-B7RP1 16H, o primer de PCR 5' codificava a terminação amino da sequência de sinal, um sítio de enzima de restrição XbaI e uma sequência Kozak otimizada (5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA CAT GAG GGT CCT CGC TCA GCT CCT GGG -3') (SEQ ID NO: 62). O primer 3' codificava a terminação carboxila e o códon de término, assim como um sítio de restrição Sall (5'- CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C -3') (SEQ ID NO: 63). O fragmento de produto de PCR resultante foi purificado, digerido com

XbaI e SalI e, então, isolado em gel e ligado no vetor de expressão em mamíferos pDSR α 20 (vide o Pedido Internacional, Publicação nº WO 90/14363, que é aqui incorporado por referência para qualquer finalidade. pDSR α 20 foi produzido alterando-se o nucleotídeo 2.563 em pDSR α 19 de uma "guanossina" para uma "adenossina" por mutagênese direcionada a sítio).

[000187] Para a preparação de cDNA que codifica cadeia pesada de anti-B7RP1 16H, o primer de PCR 5' codificava a terminação amino da sequência de sinal, um sítio de enzima de restrição XbaI e uma sequência Kozak otimizada (5'- ACA ACA AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA GTT GGG GCT GAA CTG G -3') (SEQ ID NO: 64). O primer 3' codificava a extremidade carboxila da região variável, incluindo um sítio BsmBI de fita em sentido de ocorrência natural (5'- GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG ATT CC -3') (SEQ ID NO: 65). O produto resultante foi purificado, digerido com XbaI e BsmBI, isolado em gel e ligado no vetor pDSR α 20 contendo a região constante de IgG1 humana e também no vetor pDSR α 20 contendo a região constante de IgG2 humana. Todas as regiões variáveis de cadeia pesada de anti-B7RP1 derivadas de hibridoma, a despeito da região constante nativa associada, foram clonadas conforme descrito acima em ambos os vetores pDSR α 20 contendo as regiões constantes de IgG1 humana e IgG2 humana.

Exemplo 3

Expressão de Anticorpos Anti-B7RP1 em Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO)

[000188] A expressão estável do mAb anti-B7RP1 16H foi conseguida por co-transfecção de plasmídeos cadeia pesada de 16H/pDSR α 19 IgG2 B7RP1-kapa/pDSR α 19 em células de ovário de hamster chinês (CHO) deficientes em diidrofolato redutase (DHFR⁻) livres de soro e adaptadas, usando-se um método de fosfato de cálcio

(a sequência de cadeia pesada de 16H de comprimento total é mostrada na SEQ ID NO: 44; a sequência da cadeia kapa de 16H é mostrada na SEQ ID NO: 45). As células transfectadas foram selecionadas em meio contendo soro dialisado, mas não contendo hipoxantina-timidina, para assegurar o crescimento de células que expressem a enzima DHFR. Os clones transfectados foram triados usando-se ensaios como ELISA para detectar a expressão de mAb anti-B7RP1 16H no meio condicionado. Os clones de expressão mais elevada foram submetidos a concentrações crescentes de metotrexato (MTX) para amplificação de DHFR. Clones amplificados com MTX foram triados usando-se ensaios como ELISA para detectar a expressão mais elevada de mAb anti-B7RP1 16H no meio condicionado. Os clones de expressão mais elevada foram submetidos a subclonagem para se obter uma população homogênea e a criação de bancos de células.

[000189] Outros anticorpos anti-B7RP1 recombinantes da invenção podem ser gerados em células de ovário de hamster chinês deficientes em DHFR usando-se o mesmo protocolo acima descrito para o anticorpo monoclonal anti-B7RP1. As sequências de DNA que codificam a cadeia pesada ou a cadeia leve completa de cada anticorpo anti-B7RP1 são clonadas em vetores de expressão. Células CHO α são co-transfectadas com um vetor de expressão capaz de expressar uma cadeia pesada completa e um vetor de expressão que expresse a cadeia leve completa do anticorpo anti-B7RP1 apropriado. Por exemplo, para gerar um anticorpo anti-B7RP1 5D, as células são co-transfectadas com um vetor capaz de expressar uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 47, e um vetor capaz de expressar a cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 48. A Tabela 2 resume cadeias leves completas exemplificativas e cadeias pesadas completas exemplificativas para

anticorpos anti-B7RP1 com regiões constantes de cadeia pesada de IgG humana. Aqueles versados na técnica reconhecerão que a IgG1 ou IgG2 poderiam se substituir (isto é, quando se relaciona IgG1 na tabela, IgG2 poderia estar presente e vice-versa). Alternativamente, qualquer imunoglobulina (por exemplo, IgM, IgA, IgE ou IgH) poderia ser usada para gerar anticorpos da invenção.

Tabela 2

Anticorpo	Região Variável de Cadeia Pesada + Região Constante de Cadeia Pesada	Cadeia Pesada Completa
16H(IgG2)	SEQ ID NO: 7 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 44
16H(IgG1)	SEQ ID NO: 7 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 70
16Hg(IgG2)	SEQ ID NO: 8 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 46
16Hg(IgG1)	SEQ ID NO: 8 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 71
5D(IgG1)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 47
5D(IgG2)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 72
2H(IgG2)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 49
2H(IgG1)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 73
2Hg(IgG2)	SEQ ID NO: 11 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 51
2Hg(IgG1)	SEQ ID NO: 11 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 74
43H(IgG2)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 52
43H(IgG1)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 75
41H(IgG2)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 54
41H(IgG1)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 76
15H(IgG2)	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 56
15H(IgG1)	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 57
Anticorpo	Região Variável de Cadeia Leve + Região Constante de Cadeia Leve	Cadeia Leve Completa
16H	SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 45
5D	SEQ ID NO: 2 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 48
2H	SEQ ID NO: 3 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 50
43H	SEQ ID NO: 6 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 53
41H	SEQ ID NO: 5 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 55
15H	SEQ ID NO: 4 + SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 58

Exemplo 4

Produção de Anticorpo Anti-B7RP1

[000190] O anticorpo anti-B7RP1 é produzido por expressão em uma linhagem clonal de células CHO. Para cada operação de produção, as células de um único frasco são descongeladas em meio de cultura

celular livre de soro. As células são cultivadas inicialmente em um frasco T, seguido por frascos rotativos e, então, cultivadas em reatores de aço inoxidável de escala crescente até um biorreator de 2.000 L. A produção é realizada em um biorreator de 2.000 L usando-se uma cultura de bateladas alimentada, em que uma alimentação nutriente contendo componentes de meio concentrados é adicionada para manter o crescimento das células e a viabilidade da cultura. A produção dura aproximadamente duas semanas, durante as quais o anticorpo anti-B7RP1 é constitutivamente produzido pelas células e secretado no meio de cultura celular.

[000191] O reator de produção é controlado a um pH, temperatura e nível de oxigênio dissolvido predeterminados: o pH é controlado por adição de gás dióxido de carbono e carbonato de sódio; o oxigênio dissolvido é controlado por fluxos dos gases ar, nitrogênio e oxigênio.

[000192] Ao término da produção, o caldo de células é alimentado a uma centrífuga de pilha de discos, e o sobrenadante da cultura é separado das células. O concentrado é adicionalmente clarificado através de um filtro de profundidade, seguido por um filtro de 0,2 µm. O meio condicionado clarificado é, então, concentrado por ultrafiltração de fluxo tangencial. O meio condicionado é concentrado 15 a 30 vezes. O meio condicionado concentrado resultante é, então, processado mediante purificação ou congelado para purificação em uma data posterior.

Exemplo 5

Linhagem Germinativa de mAb 16H

[000193] O alinhamento de sequências do anticorpo 16H com sequências de linhagem germinativa humana mostrou que a sequência de arcabouço na região variável do anticorpo 16H era mais idênticas às sequências de linhagem germinativa V_H 3-07 e JH4, com apenas três aminoácidos de diferença (figura 1A). A sequência de

arcabouço para a região VK do anticorpo 16H se mostrou idêntica à sequência da linhagem germinativa VK1-L15. É teoricamente possível que hipermutações somáticas sejam reconhecidas como estranhas pela resposta imune de um paciente; caso em que o paciente geraria uma resposta anti-idiotipo que pudesse neutralizar a terapêutica. Para reduzir essa possibilidade, as três alterações de aminoácidos na região de arcabouço VH foram convertidas de volta às sequências de linhagem germinativa V_H 3-07 e JH4 (figura 1A). Como os segmentos de gene de V_H e J_H da linhagem germinativa estão presentes em todos os genomas humanos, a versão de linhagem germinativa de 16H provavelmente não será reconhecida como estranha pela resposta imune de um paciente dosado. Bioensaios de co-estimulação em placa foram conduzidos para determinar se os anticorpos de linhagem germinativa podiam induzir proliferação de células T com uma IC₅₀ similar a IC₅₀ de anticorpos não de linhagem germinativa. Os ensaios de co-estimulação foram conduzidos conforme descrito abaixo, usando-se anti-CD3, e a proteína de fusão hB7RP-1-Fc confirmou que esse anticorpo de linhagem germinativa, chamado de 16H linhagem germinativa ou 16Hg, retinha suas atividades biológicas (figura 1B).

Exemplo 6

Medição da Afinidade de Anticorpos Monoclonais por Biacore® e KinExA

[000194] Três anticorpos (5D e 16H, preparados conforme descrito no Exemplo 1, e 16H linhagem germinativa, preparado conforme descrito no Exemplo 5) foram purificados e submetidos a análise de afinidade de ligação. B7RP1-Fc foi imobilizado a alta densidade em um chip sensor CM5, usando-se química de acoplamento de amina padrão. Uma concentração fixa de mAb foi, então, incubada com concentrações variáveis de B7RP-1 ou B7RP1-Fc durante pelo menos oito horas a temperatura ambiente, para permitir que atingissem o

equilíbrio. As amostras foram, então, injetadas sobre a superfície de B7RP1-Fc, e o sinal de ligação observado representava o anticorpo livre restante em solução no equilíbrio. Com o uso de duas concentrações de anticorpos diferentes (0,2 nM e 1 nM), a K_D da interação entre um mAb particular e o ligante foi calculada a partir de análise de regressão não linear das curvas de competição, usando-se um modelo de ligação homogênea em um sítio de curva dupla (Adamczyk et al., 1999, Bioconjugate Chem. 10: 1032-37; Adamczyk et al., 2000, Methods 20: 319-28). Conforme mostrado na figura 2 e na Tabela 3, os mAbs 16H, 16Hg e 5D se ligaram todos às proteínas solúveis B7RP-1 e B7RP-1-Fc com elevadas afinidades. Além disso, os resultados indicaram que o 16H (não linhagem germinativa) e 16Hg (linhagem germinativa) reagiram de maneira similar, demonstrando que a linhagem germinativa não afetou significativamente a ligação entre o anticorpo e o ligante.

Tabela 3

Sumário dos Valores de K_D		
	B7RP-1	B7RP1-Fc
5D	37 pM	1,6 pM
16H	1,9 nM	27 pM
16H (linhagem germinativa)	2,7 nM	17 pM

[000195] A ligação dos anticorpos 5D, 2H e 2H linhagem germinativa também foi testada usando-se tecnologia KinExA (ensaio de exclusão cinética). Nesse ensaio, hB7RP-1 foi acoplado a glóbulos de agarose. Os glóbulos foram usados para criar uma coluna de glóbulos. Amostras contendo anticorpo a uma concentração fixa, que se deixou que chegassem ao equilíbrio com concentrações variáveis de hB7RP-1, foram, então, passados pela coluna de glóbulos. Anticorpo que não formou complexo com o ligante se ligou aos glóbulos revestidos.

[000196] Um anticorpo secundário anti-Fc humano etiquetado fluorescente foi usado para detectar o anticorpo de teste ligado. O sinal obtido foi proporcional ao anticorpo livre em solução a uma dada

concentração de ligante. Usando-se duas concentrações de anticorpos diferentes, a K_D da interação foi calculada a partir da análise de regressão não linear das curvas de competição, usando-se um modelo de ligação homogênea em um sítio de curva dupla (Adamczyk et al., 1999, Bioconjugate Chem. 10: 1032-37; Adamczyk et al., 2000, Methods 20: 319-28). As figuras 3, 4 e 5 mostram os ajustes de curva dupla para os anticorpos 5D, 2H e 2H (linhagem germinativa). Usando-se essa técnica, observou-se uma diferença de aproximadamente 10 vezes nas K_D s para os anticorpos 5D e 2H.

[000197] Os resultados dos ensaios Biacore® e KinExA demonstraram que o anticorpo 5D tem maior afinidade por hB7RP-1 do que 2H ou 16H. Da mesma forma, a versão de linhagem germinativa do anticorpo 2H não mostra uma diferença significativa com relação ao construto não linhagem germinativa.

Exemplo 7

Características Funcionais de Anticorpos Anti-B7RP1

[000198] As características funcionais de anticorpos contra B7RP-1 da invenção foram avaliadas usando-se ensaios de ligação-competição, ensaios de co-estimulação *in vitro* e ensaios de toxóide tetânico *in vitro*.

Estudos de Ligação-Competição

[000199] Estudos de ligação-competição foram conduzidos com os mAbs 16H para demonstrar que podem competir com a ligação de ICOS a B7RP-1. Células CHO transfectadas com um gene que codifica o B7RP-1 humano de comprimento total foram primeiro incubadas com quantidades decrescentes de mAb 16H não marcado e subsequentemente tingidas com uma proteína de fusão ICOS-Fc marcada de maneira fluorescente. As células foram, então, analisadas usando-se citometria de fluxo. Conforme mostrado na figura 6, ICOS-Fc tingiu as células CHO transfectadas com B7RP-1; 0,4 µg/mL de

mAb 16H não afetaram a ligação com ICOS-Fc. Entretanto, 6 e 25 µg/mL de 16H competiram eficientemente com a ligação a ICOS-Fc, indicando que mAb 16H de fato competia com ICOS pela ligação a B7RP-1.

Ensaio de Co-estimulação

[000200] Placas de cultura celular (Falcon, Cat. Nº 353077, fundo em U) foram revestidas com 1 µg/mL de anticorpos anti-CD3 humano (PharMingen Cat. Nº 555336) e 10 µg/mL de IgG anti-humana (específica para Fc, Sigma, Cat. Nº I3391). Os anticorpos anti-CD3 e imunoglobulina anti-humana em solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram adicionados a cada cavidade (100 µL/cavidade). As placas revestidas foram incubadas a 4°C durante uma noite ou a temperatura ambiente durante 2 horas. As placas foram, então, lavadas com PBS duas vezes. Depois da lavagem, 1 µg/mL de B7-2Fc humano (R&D System, Cat. Nº 141-B2) ou 5 µg/mL de hB7RP1Fc, ambos diluídos em PBS, foram adicionados a cada cavidade (100 µL por cavidade). As placas foram, então, incubadas a temperatura ambiente durante 3 horas e lavadas duas vezes com PBS depois disso. Células T humanas purificadas (1×10^5 por cavidade) em 200 µL de volume de meio (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro de novilho fetal (FCS), penicilina-estreptomicina-L-glutamina (PSG), β-mercaptoetanol (2-ME), aspartato de N-acetila (NAA) e piruvato de Na) e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante 48 horas. Adicionou-se ³H timidina (ICN Cat. nº 2404205) a 1 µCi/cavidade, e as cavidades foram incubadas durante uma noite a 37°C, 5% de CO₂. As células foram, então, colhidas e contadas.

[000201] Placas de cultura celular (Falcon, Cat. Nº 353077, fundo em U) foram revestidas com 1 µg/mL de anti-CD3 humano como acima. Células CHO transfectadas com hB7RP1 (irradiadas a 5000RAD) foram adicionadas a 2×10^4 por cavidade, seguido por células T

humanas purificadas a 1×10^5 por cavidade em 200 μL de volume. As placas foram incubadas a 37°C , 5% de CO_2 , durante 48 horas como acima. Adicionou-se ^3H timidina a 1 $\mu\text{Ci/cavidade}$. As células foram incubadas durante uma noite, colhidas e contadas como acima.

Ensaio de Toxóide Tetânico

[000202] PBMC foram purificadas de sangue humano usando-se um gradiente de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) da seguinte maneira. O sangue foi diluído a 1:2 com PBS, o sangue diluído foi colocado em camada sobre o Ficoll (1/3 de Ficoll a temp. ambiente + 2/3 de sangue diluído), centrifugado a 2.500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente, a camada superior (plasma e plaquetas) foi aspirada, e a camada de células mononucleares foi transferida para um tubo de 50 mL fresco. As PBMC foram lavadas com PBS (3 x o volume da camada de células mononucleares) e centrifugadas durante 10 minutos a 1.300 rpm a temperatura ambiente e lavadas como acima. As PBMC foram ressuspensas em meio (RPMI 1640 + 10% de FBS termicamente inativado + 1X PSG + 1X NEAA + 55 μM de 2-ME), e as células foram contadas.

[000203] As PBMC foram adicionadas a cavidades de uma placa de fundo redondo de 96 cavidades a 100 μL de PBMC/cavidade ($3 \times 10^6/\text{mL}$). Adicionou-se toxóide tetânico (20 $\mu\text{g/mL}$; Universidade de Massachusetts) para uma concentração final de 5 $\mu\text{g/mL}$. As células foram incubadas durante 3 dias a 37°C ; 100 μL de sobrenadante foram coletados e incubados durante mais 6 a 8 horas na presença de 1 $\mu\text{Ci/cavidade}$ de ^3H timidina (MP Biomedicals). As células foram, então, colhidas e contadas.

[000204] A Tabela 4 resume as características funcionais de certos anticorpos da invenção, conforme determinadas usando-se os ensaios acima descritos.

Tabela 4

	Placa	Biacore Fc	Biacore mono	CHO	Toxóide Tetânico
2H	43	89		1445	15
15H	36				141
16H	53	27	1900	276	27
16Hg	32	17	2700	523	
41H	52				115
43H	46				35
5D	55	1,6	37	1456	15
ICOS-Fc	200 – 1000	1000		10,672	
α -CD86					40

*Valores de EC₅₀/KD em pM

Exemplo 8

Mapeamento de Epítipo

[000205] Conduziram-se estudos para identificar a região em B7RP-1 à qual se ligam os anticorpos monoclonais 16H/16Hg e 5D. Para isso, desenvolveu-se um novo ensaio de ligação de Classificador de Células Ativado por Fluorescência (FACS). O domínio extracelular humano (ECD) de B7RP1 (SEQ ID NO: 66), assim como formas truncadas de B7RP-1 contendo a Ig1 (do tipo IgV; SEQ ID NO: 67) ou a Ig2 (do tipo IgC; SEQ ID NO: 68) foram expressados como N-terminais, em fusões em quadro com avidina de galinha.

SEQ ID NO: 66 (ECD):

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQT
 SESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNV
 TPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPS
 QDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLY
 DVVSVLRIARTPSVNIGCCCIENVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKITENP

SEQ ID NO: 67 (do tipo IgV):

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQT
 SESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNV
 TPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPS
 QDELTFT

SEQ ID NO:68 (do tipo IgC):

LG FQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFCT
 SINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQN DTVFLNMRGLYDVVSVLRIA
 RTPSVNIGCC IENVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKITENP

[000206] Vetores de expressão contendo genes que codifiquem essas proteínas de fusão foram individualmente transfectados de maneira transitória em células 293T, e os meios condicionados dessas linhagens celulares foram usados como fonte da proteína de fusão. A etiqueta de avidina foi usada para capturar as proteínas de fusão B7RP1 da solução usando-se um glóbulo revestido com biotina. As proteínas de fusão foram incubadas com mAbs 16H ou 5D marcados de maneira fluorescente ou com uma proteína de fusão ICSO-Fc marcada de maneira fluorescente, e incubadas com glóbulos revestidos com biotina. Os glóbulos foram recuperados e analisados usando-se citometria de fluxo em um Becton-Dickinson Bioscience FACScan (BD, Franklin Lakes, NJ). Conforme mostrado na figura 9A, a coloração fluorescente dos glóbulos foi detectada com os reagentes 16H, 5D e ICOS, quando o ECD completo de B7RP-1 foi fixado, indicando que todos esses três reagentes podiam se ligar ao ECD de B7RP-1. Da mesma forma, todos os três reagentes se ligaram à proteína de fusão com avidina contendo apenas o domínio Ig1, indicando que tanto o mAb ICSO, quanto o anti-B7RP-1 de bloqueio podiam se ligar a essa região. Em contraste, nem o mAb ICOS nem o anti-B7RP-1 podiam se ligar à proteína de fusão contendo apenas o domínio Ig2 proximal à membrana. Assim, as regiões de ligação de ICOS, 16H e 5D a B7RP-1 estavam localizadas no domínio Ig1.

[000207] Os anticorpos gerados conforme descrito acima no Exemplo 1 e testados quanto à ligação usando o ensaio de ligação a fusão com avidina podiam ser divididos em duas classes de epítomos, H e D, conforme mostrado na Tabela 5. Dos 100 anticorpos inicialmente selecionados com base em sua capacidade de se ligarem

a B7RP1, 15 foram incapazes de se ligar no ensaio de ligação a fusão com avidina, mais provavelmente por causa da degradação.

Tabela 5

Classificação de mAbs por epítopo	
Classe	Nº
Epítopo H	75
Epítopo D	10
Novo epítopo, bloqueador de ICOS	0
Novo epítopo, não bloqueador de ICOS	0
Ligação não detectável	15

Exemplo 9

Identificação de SNP e Análise Funcional

[000208] Uma variante de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) principal foi identificada em B7RP-1, que está presente na população com uma frequência de alelo de 28,4% (figura 7). A variante foi identificada dentro da sequência codificadora de proteína madura. Uma busca no banco de dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI) revelou uma segunda variante de SNP em potencial; a segunda variante foi identificada em uma análise individual de 1,5 (três cromossomos). A primeira variante de SNP (V1281) estava localizada no primeiro domínio do tipo IgV, ao passo que a variante de SNP do NCBI (L221F) estava localizada no segundo domínio do tipo IgC.

[000209] Conforme acima descrito, tanto o anticorpo monoclonal 16H, quanto o 5D se ligam ao primeiro domínio do tipo IgV, portanto é improvável que a última variante L221F afete a ligação ou função do mAb 16H ou 5D. Todavia, para determinar se qualquer uma dessas variantes de SNP afeta a ligação e/ou função de 16H ou 5D, conduziram-se dois experimentos diferentes. No primeiro conjunto de experimentos, proteínas de fusão com avidina foram construídas com as duas variantes de SNP e testadas quanto à ligação a anticorpos 16H ou 5D no ensaio de citometria de fluxo acima descrito. Esses

mAbs representativos das classes de epítomos H e D se ligaram às variantes de SNP com eficácia similar a de B7RP-1 do tipo selvagem (figura 9B). Esses dados sugerem que anticorpos tanto das classes de epítomo H, quanto D se ligam a variantes SNP de B7RP-1.

[000210] Na segunda abordagem, proteínas de fusão com Fc foram construídas usando-se a sequência de variante SNP de B7RP-1 e comparadas quanto a capacidade dessas proteínas de estimularem células T no ensaio de co-estimulação em placa (figura 9C). Tanto os anticorpos 16H, quanto 5D inibiram a co-estimulação mediada pelas proteínas de fusão com Fc de variante de SNP, com EC_{50} s similares à proteína de fusão do tipo selvagem. Tomados juntos, esses dados indicam que as duas variantes SNP de B7RP-1 em potencial foram reconhecidas pelos anticorpos da invenção. Assim, os anticorpos da invenção podem se ligar a alvos em pacientes contendo essas variantes de SNP.

Exemplo 10

Modelos de Eficácia Animal *In vivo*

[000211] A capacidade de anticorpos contra B7RP-1 de inibirem a resposta imune foi analisada usando-se um anticorpo monoclonal anti-B7RP-1 murino de rato murinizado (1B7v2), e desafiando-se camundongos BALB/c com hemocianina de lapa (KLH).

Geração do anticorpo monoclonal anti-B7RP-1 murino de rato murinizado 1B7v2

[000212] Uma linhagem de célula de ovário de hamster chinês que superexpressava B7RP-1 murino de comprimento total foi injetada em ratos como uma imunização primária e, subsequentemente, com uma proteína de fusão B7RP1-Fc murídea para reforçar a resposta imune. Os baços foram colhidos 3 ou 4 dias após o reforço intravenoso, e as células B esplênicas foram fusionadas com a linhagem de mieloma de rato Y3-Ag1.2.3 (ATCC CRL-1631). As células foram, então,

selecionadas em meio suplementado com hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) durante 2 semanas e subsequentemente subclonadas em célula única por diluição limitativa. Esses procedimentos são descritos em "Practical Immunology, 2nd ed." Leslie Hudson e Frank C. Hay; Blackwell Scientific Publications 1980.

[000213] Os genes que codificam a imunoglobulina 1B7 foram clonados da linhagem celular 1B7 usando-se procedimentos padronizados (Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). A troca de isotipo dos mAbs anti-huB7RP1 humanos foi realizada por clonagem dos fragmentos de região variável contendo extremidades coesivas de sítios de restrição XbaI e BsmBI no vetor pDSRa com a região constante IgG1 ou huIgG2 humana que também tinha extremidades XbaI e BsmBI. Para o anti-muB7RP1 de rato 1B7, a quimera foi formada por um processo de PCR de superposição em três etapas. A região variável de rato foi amplificada por PCR com um primer 3' que continha parte, ~25 – 35 nucleotídeos, da região constante murídea. A região constante murídea foi amplificada com um primer 5' que continha parte, ~25 – 35 nucleotídeos, da região variável de rato. Os dois fragmentos foram, então, usados como molde, e os primers de região variável de rato 5' (contendo XbaI) e a região constante 3' murídea (contendo Sall) foram usados para gerar uma cadeia leve ou cadeia pesada completa. Os produtos de PCR de cadeia leve ou cadeia pesada foram, então, digeridos com XbaI e Sall e clonados em pDSRa19. Um total de 25 µg de DNA linearizado (12,5 µg de pDC323B LC + 12,5 µg de pDC324 HC) foi transfectado em células CS-9 usando-se eletroporação e seleção em meio suplementado com DHFR.

[000214] Para testar a eficácia do mAb 1B7v2, conduziram-se ensaios de co-estimulação em placa com esse mAb. Os resultados

foram comparados com outros mAbs anti-B7RP-1 murino (figura 10A). Conforme acima discutido, 1B7 é o mAb produzido por hibridoma original; foram testadas duas preparações diferentes (marcadas como 1,33 e 7,4). 5E1 e 11G10 foram outros anti-mB7RP-1 monoclonais gerados nas fusões acima descritas. Finalmente, HK5.3 era um anti-mB7RP-1 comercialmente disponível (Ebiosciences nº 16-5985-85).

[000215] O mAb 1B7v2 bloqueou a ativação de células T nesse ensaio de maneira igual a ou melhor do que os outros mAbs e, portanto, foi selecionado como terapêutica substituta para estudos adicionais.

Desafio com Antígeno em Camundongos

[000216] A hemocianina de lapa (KLH) foi comprada na Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois). A solução de dosagem nº 1 (KLH a 5 mg/kg em 1 mg/camundongo de alume) foi preparada com partes iguais de 2x alume (500 mg de alume mais 50 mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato)) e 2x KLH (2,0 mL de dH₂O (livre de RNase) misturados com 20 mg de KLH liofilizado, levados a 20 mL com 1x PBS). A solução de dosagem nº 2 (KLH a 1 mg/kg em 1 mg/camundongo de alume) foi preparada com 1 parte de 2x KLH misturada com 4 partes de 1x solução salina tamponada com fosfato.

[000217] Camundongos BALB/c fêmeas foram preparados com 1 mg/kg de KLH/alume e reimmunizados no dia 21 com 5 mg/kg de KLH apenas, introduzidos por injeção intraperitoneal. Os camundongos foram tratados por injeção intraperitoneal com 1B7v.2, o anticorpo de controle de isotipo (anti-AGP3 PB) ou veículo (PBS) apenas, começando-se no dia 1 (um dia antes da imunização com KLH/alume), em um volume final de 200 µL a cada 5 dias.

[000218] Os camundongos foram sangrados a cada 7 dias retroorbitalmente (aproximadamente 200 µL) para se obterem aproximadamente 50 – 100 µL de soro para análise de IgM (figura

10B), IgG2a (figura 10C) e IgG1 (figura 10D) sérica específica para o antígeno. Tanto os camundongos de controle de isotipo, quanto os tratados com veículo mostraram respostas imunes primárias e secundárias significativas. A resposta de IgM não foi afetada pelo tratamento, ao passo que o bloqueio de B7RP-1-ICOS com 1B7v2 diminuiu tanto as respostas primárias, quanto secundárias de IgG2a e IgG1 de maneira estatisticamente significativa.

[000219] IL-5 é uma citocina liberada por células T em resposta à estimulação com antígeno, que induz a diferenciação e função de células B. Como se acredita que a interação B7RP-1/ICOS seja crítica para a função de células B dependente de células T, a medição dos níveis séricos de IL-5 foi usada para determinar se a interdição do eixo B7RP-1/ICOS estava, de fato, afetando a função de células T. Como esperado, o bloqueio de B7RP-1 também inibiu os níveis séricos de IL-5 induzidos por antígeno. Os soros foram colhidos dos camundongos do experimento de desafio com antígeno acima delineado 24 horas após o desafio com antígeno no dia 21, e os níveis séricos de IL-5 foram determinados por ELISA. Conforme mostrado na figura 11, níveis elevados de IL-5 foram detectados nos camundongos de teste tão cedo quanto 9 horas após o desafio; os níveis começaram a declinar em 48 horas e retornaram à linha basal em 72 horas. O tratamento dos camundongos com mAb 1B7v2 levou a uma repressão estatisticamente significativa dos níveis de IL-5 no período de 24 horas.

Exemplo 11

Ligação a B7RP-1 de Macaco Cynomolgus

[000220] Para determinar se os mAbs anti-hB7RP-1 também se ligavam a B7RP-1 de macaco Cynomolgus, conduziram-se experimentos de coloração com citometria de fluxo com o mAb 16H e células B purificadas de macacos Cynomolgus e seres humanos.

Conforme mostrado na figura 12A, a adição de 16H marcado de maneira fluorescente a células B de Cynomolgus levou ao tingimento, indicando que 16H estava, de fato, se ligando a B7RP-1 de Cynomolgus (painel direito). Como esperado, 16H também tingiu células B humanas (painel esquerdo). Além disso, 16H, 16Hg e 5D foram testados em ensaios de co-estimulação em placa usando-se células T de Cynomolgus, B7RP-1-Fc de Cynomolgus e mAb anti-CD3. Conforme mostrado na figura 12B, todos os três mAbs inibiram a ativação de células T de Cynomolgus dependente de B7RP-1, indicando que esses mAbs bloqueiam funcionalmente a interação ICSSO-B7RP-1 de Cynomolgus.

Exemplo 12

Respostas a Antígeno Dependentes de Células T no Macaco Cynomolgus Após Administração dos Anticorpos Anti-B7RP-1

[000221] Conduziu-se um estudo em macaco Cynomolgus com dois anticorpos monoclonais anti-B7RP-1, 16H e 5D, para avaliar a capacidade desses anticorpos de inibirem uma resposta a antígeno por células B dependente de células T, conforme determinado pelos níveis séricos de anticorpo específico para o antígeno. Resumidamente, as respostas de anticorpos anti-hemocianina de lapa (KLH) e antitoxóide tetênico foram examinadas após o desafio com antígeno na presença de anticorpos contra B7RP-1 no macaco Cynomolgus.

[000222] O Artigo de Teste 1 era 16H, e o Artigo de Teste 2 era 5D. O Artigo de Controle era o veículo para o anticorpo contra B7RP-1 (0,01% de acetato de sódio, pH 5,0, 5% de sorbitol, 0,004% de Tween 20). A hemocianina de lapa (KLH) foi comprada na Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois).

[000223] A KLH foi preparada por reconstituição com água estéril para fornecer uma solução de estoque a 10 mg/mL. A solução de

estoque foi diluída com água estéril para fornecer uma solução de dosagem a 1 mg/mL. O toxóide tetânico usado para esses experimentos foi o Toxóide Tetânico Super-Tet® w/Havlogen®, comprado na Intervet® Inc. (Millsboro, Delaware). O nível de dose para esses experimentos foi de 75 UI (0,5 mL de 150 UI/mL).

[000224] A Tabela 6 mostra a distribuição de grupos de tratamento dos 28 macacos *Cynomolgus*.

Tabela 6

Grupo nº	Números de machos/fêmeas	Artigo de Teste	Via	Nível de Dose (mg/kg)	Volume de dose (mL/kg)	Conc. da solução de dose (mg/mL)
1	2/2	Controle	IV	0	1	0
2	2/2	B7RP-1 5D	IV	0,1	1	0,1
3	2/2	B7RP-1 5D	IV	1,0	1	1,0
4	2/2	B7RP-1 5D	IV	8,0	1	10,0
5	2/2	B7RP-1 16H	IV	0,1	1	0,1
6	2/2	B7RP-1 16H	IV	1,0	1	1,0
7	2/2	B7RP-1 16H	IV	8,0	1	10,0

[000225] As doses de artigo de teste foram administradas mediante injeção intravenosa a todos os animais nos Dias 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 e 50. Os animais escalados para necropsia nos Grupos 1 – 4 (1/sexo/grupo) receberam uma dose adicional no Dia 57. A avaliação da resposta imune foi conduzida em todos os animais mediante imunização com os antígenos KLH e toxóide tetânico, seguida por amostragem de sangue quanto a imunoglobulinas específicas para o antígeno (IgM e IgG).

[000226] Valores de título estavam presentes após a administração primária tanto do antígeno KLH, quanto do de tétano. Para KLH, os valores de título primários variaram de 0 a 900 tanto para IgM, quanto para IgG. Como o desafio primário com KLH foi administrado antes da administração do artigo de teste, não se avaliou nenhum efeito dos anticorpos contra B7RP-1. Para o toxóide tetânico, os valores de título primários variaram de 0 a 50 para IgM, e de 0 a 4.050 para IgG. Não

houve nenhuma diferença na resposta primária ao toxóide tetânico entre os grupos de anticorpo contra B7RP-1 e o grupo de controle.

[000227] Como esperado, os valores de título para IgG estavam aumentados após a administração secundária tanto do antígeno KLH, quanto do de tétano, quando comparados com os valores de título primários. Para KLH, os valores de título secundários variaram de 0 a 300 para IgM, e de 0 a 8.100 para IgG. Entretanto, não houve nenhuma evidência de inibição da resposta secundária a KLH atribuída à administração dos anticorpos contra B7RP-1.

[000228] Para o toxóide tetânico, os valores de título secundários estavam abaixo de 50 para IgM e variavam de 1.350 a 36.450 para IgG. Os resultados para valores médios de animais individuais e grupos são apresentados na figura 13A (anticorpo 16H) e figura 13B (anticorpo 5D), para os Dias 53 e 57 após o desafio secundário com toxóide tetânico no Dia 42.

[000229] No Dia 53, o número de animais que atingiram resposta de pico era de $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{4}$ aos níveis de dose de 0,1, 1 e 8 mg/kg de 16H, respectivamente, e de $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{4}$ aos níveis de dose de 0,1, 1 e 8 mg/kg de 5D, respectivamente, em comparação com $\frac{2}{4}$ dos animais de controle. Assim, em geral, o número de animais que atingiram um elevado título no Dia 53 era reduzido nos animais tratados com anticorpo contra B7RP-1. No Dia 57, os valores de título estavam mantidos nos animais de controle, ao passo que os valores de título para vários dos animais tratados com anticorpo contra B7RP-1 declinaram dos valores do Dia 53. O número de animais com elevados títulos no Dia 57 era de $\frac{0}{4}$, $\frac{0}{4}$ e $\frac{1}{4}$ aos níveis de dose de 0,1, 1 e 8 mg/kg de 16H, respectivamente, e de $\frac{0}{4}$, $\frac{0}{4}$ e $\frac{0}{4}$ aos níveis de dose de 0,1, 1 e 8 mg/kg de 5D, respectivamente, em comparação com $\frac{2}{4}$ dos animais de controle.

[000230] Esses resultados demonstraram que os dois anticorpos

contra B7RP-1 16H e 5D inibiram a resposta a antígenos de células B dependente de células T em macacos *Cynomolgus*, conforme determinado pelos níveis séricos de anticorpos específicos para toxóide tetânico. Além disso, a presença de anticorpos contra B7RP-1 era importante para o bloqueio da interação B7RP-1-ICOS durante a resposta primária, para se detectar um efeito após o desafio secundário.

[000231] Esses resultados e os resultados do Exemplo 10 demonstraram que tanto a terapêutica substituta, quanto os candidatos terapêuticos bloquearam respostas imunes dependentes de células T e B em sistemas de modelo murino e de macaco, o que indica que o bloqueio desse eixo co-estimulador pode ser eficaz no tratamento de doenças mediadas por células B, como lúpus eritematoso sistêmico (SLE), asma e artrite reumatóide (RA).

[000232] Deve-se entender que a descrição precedente enfatiza certas modalidades específicas da invenção, e que todas as modificações ou alternativas equivalentes a elas estão dentro do espírito e âmbito da invenção, conforme descrita nas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado que se liga especificamente a B7RP1, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada compreendendo CDR1 apresentando uma sequência de aminoácido como estabelecida em SEQ ID NO: 27, um CDR2 apresentando uma sequência de aminoácido como estabelecida em SEQ ID NO: 28, e um CDR3 apresentando uma sequência de aminoácido como estabelecida em SEQ ID NO: 29, ou fragmento de ligação ao antígeno ou de uma imunoglobulina imunologicamente funcional do mesmo, e uma cadeia leve compreendendo CDR1 apresentando uma sequência de aminoácido como estabelecida em SEQ ID NO: 15, um CDR2 apresentando uma sequência de aminoácido como estabelecida em SEQ ID NO: 16, e um CDR3 apresentando uma sequência de aminoácido como estabelecida em SEQ ID NO: 17, ou fragmento de ligação ao antígeno ou de uma imunoglobulina imunologicamente funcional do mesmo, e em que o anticorpo inibe a atividade de B7RP1.

2. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido como estabelecida em SEQ ID NO: 7 ou 8, ou fragmento de ligação ao antígeno ou de uma imunoglobulina imunologicamente funcional do mesmo.

3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido como estabelecida em SEQ ID NO: 1, ou fragmento de ligação ao antígeno ou de uma imunoglobulina imunologicamente funcional do mesmo.

4. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15, 16, 17, 27, 28 e 29, em que o polipeptídeo se liga especificamente à B7RP1 e inibe a atividade

de B7RP1.

5. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 1 que se liga especificamente à B7RP1, caracterizado pelo fato de que se liga a SEQ ID NO: 67, mas não a SEQ ID NO: 68 do domínio extracelular de B7RP1 e inibe a atividade de B7RP1.

6. Anticorpo isolado, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente à B7RP1 e compete com um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1, e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 ou 8 para ligação ao B7RP1, em que o anticorpo inibe a atividade de B7RP1.

7. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácido como estabelecida em qualquer uma das SEQ ID NOs: 45 ou 46, ou um fragmento de ligação ao antígeno ou de uma imunoglobulina imunologicamente funcional do mesmo.

8. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada e a cadeia leve compreendem um anticorpo de cadeia simples.

9. Anticorpo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo Fv de cadeia simples.

10. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo Fab.

11. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo Fab'.

12. Anticorpo de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo (Fab')₂.

13. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo completamente humano.

14. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um veículo farmaceuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 6 ou 7 ou um fragmento de ligação ao antígeno ou de uma imunoglobulina imunologicamente funcional do mesmo.

15. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um veículo farmaceuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente eficaz do polipeptídeo como definido na reivindicação 4.

16. Anticorpo ou fragmento do mesmo de acordo qualquer uma das reivindicações 1, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que é para uso como um medicamento.

17. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que é para uso com um medicamento.

18. Anticorpo de acordo qualquer uma das reivindicações 1, 5 ou 6, ou fragmento de ligação ao antígeno ou de uma imunoglobulina imunologicamente funcional do mesmo, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de uma doença autoimune ou resposta inflamatória em um paciente.

19. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de uma doença autoimune ou resposta inflamatória em um paciente.

20. Método para a detecção de B7RP1 em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) contatar a amostra com o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 5 ou 6, ou o polipeptídeo como definido na reivindicação 4 sob condições que permitam a ligação do anticorpo ou polipeptídeo a B7RP1; e

b) medir o nível de anticorpo ou polipeptídeo ligado na amostra.

21. Célula hospedeira bacteriana ou de levedura, caracterizada pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucléico que codifica o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 5 ou 6 ou o polipeptídeo como definido na reivindicação 4.

22. Linhagem celular isolada bacteriana ou de levedura, caracterizada pelo fato de que produz um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 5 ou 6, ou o polipeptídeo como definido na reivindicação 4.

23. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico que codifica o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 5 ou 6 ou o polipeptídeo como definido na reivindicação 4.

24. Método de produção de um anticorpo ou polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a célula hospedeira como definida na reivindicação 21 ou a linhagem celular como definida na reivindicação 22 e coletar o anticorpo ou polipeptídeo do meio de cultura ou da célula hospedeira.

25. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8.

26. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve

compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 e uma região constante de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e em que a cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8 e uma região constante de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41.

27. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46.

FIG 1

- A) 16H-VH-G.L. (1) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMSWVRQAPGKLEWVAY
 16H.VH (1) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYMSWVRQAPGKLEWVAY
- 16H-VH-G.L. (51) IKQDGNKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
 16H.VH (51) IKQDGNKYYVDSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
- 16H-VH-G.L. (101) ILWFGDLPTFWGQTLVTVSS
 16H.VH (101) ILWFGDLPTFWGQGILVTVSS

B)

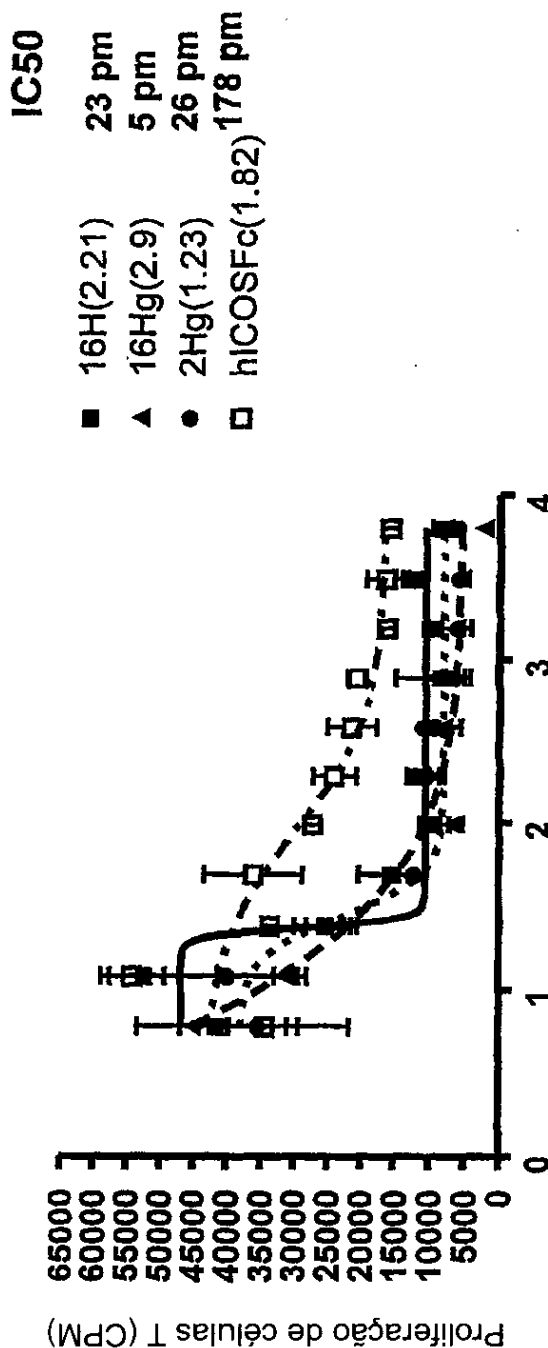
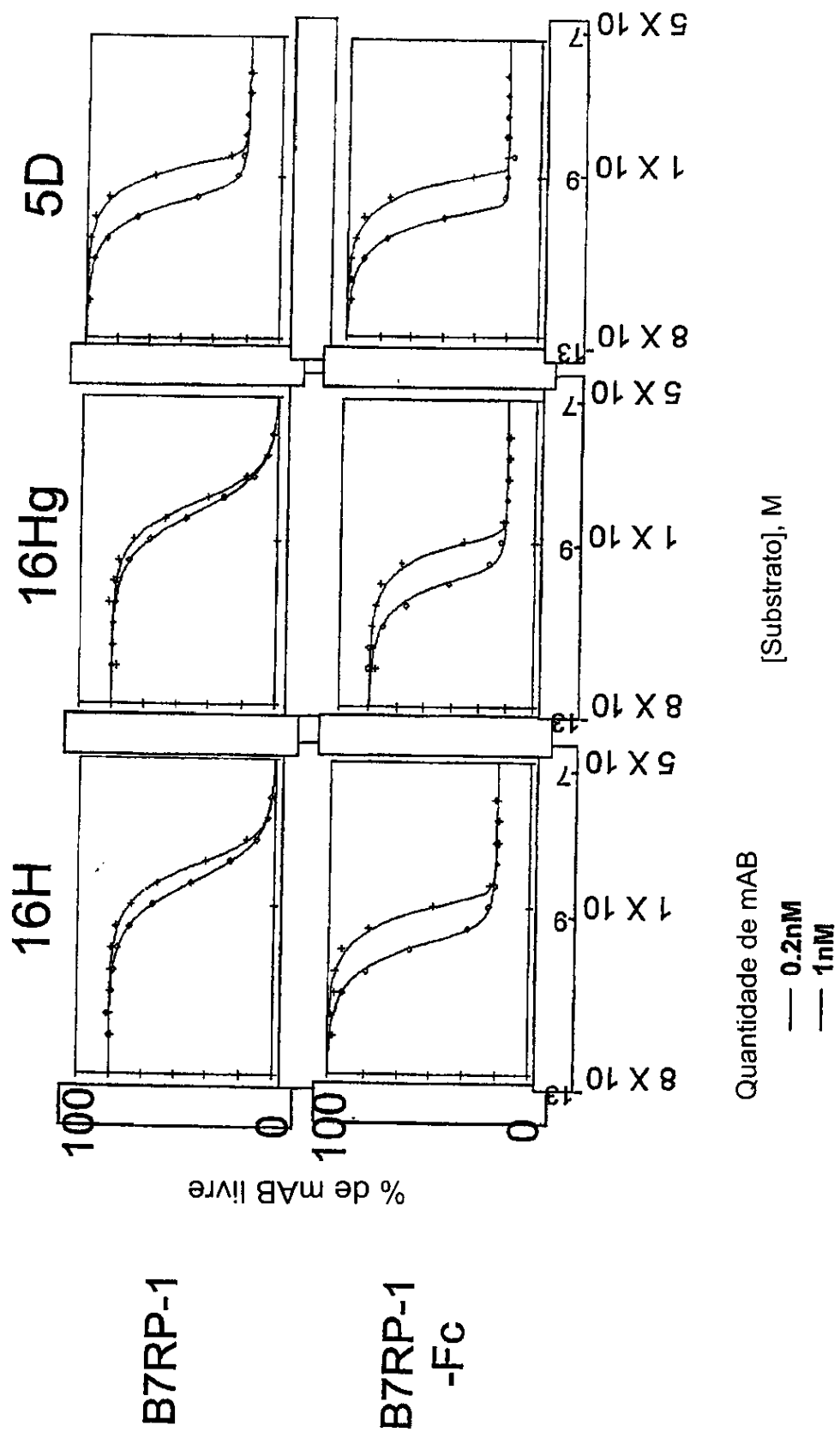


FIG 2



100
60

FIG 3

Anti-huB7RP1 5D contra HuB7RP1

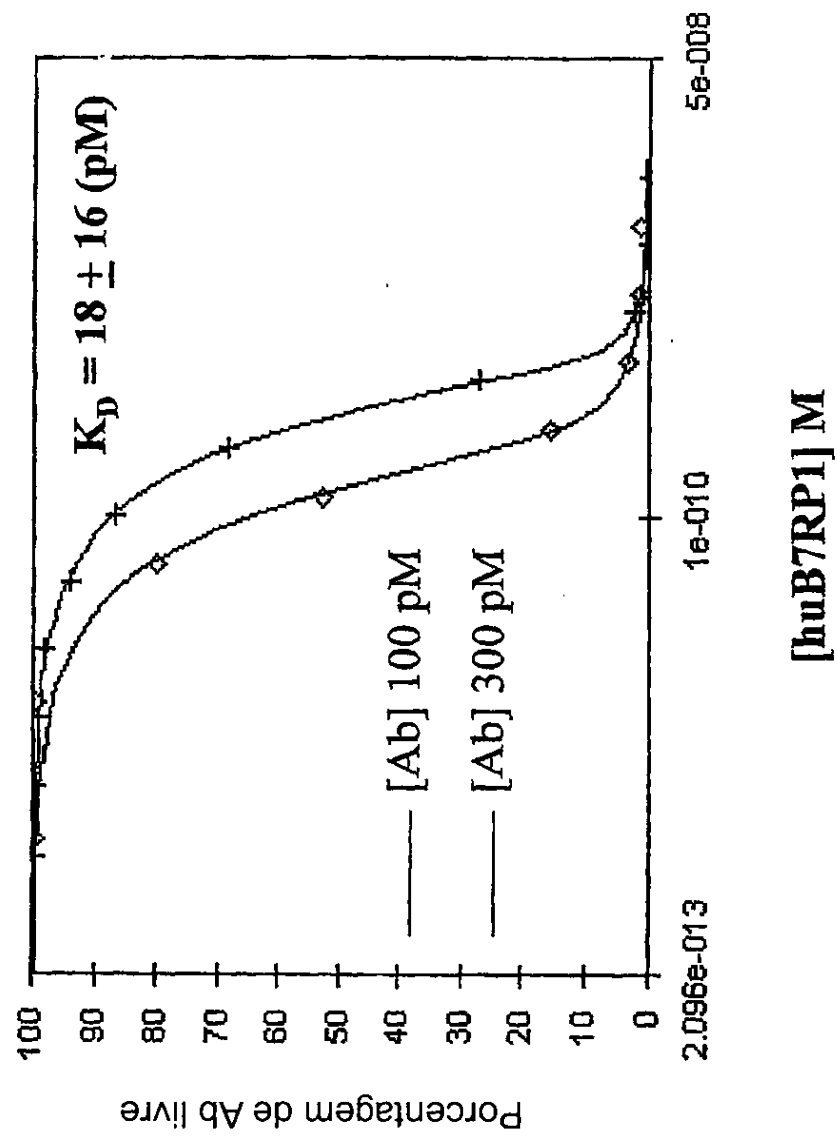


FIG 4
Anti-huB7RP1 2H contra HuB7RP1

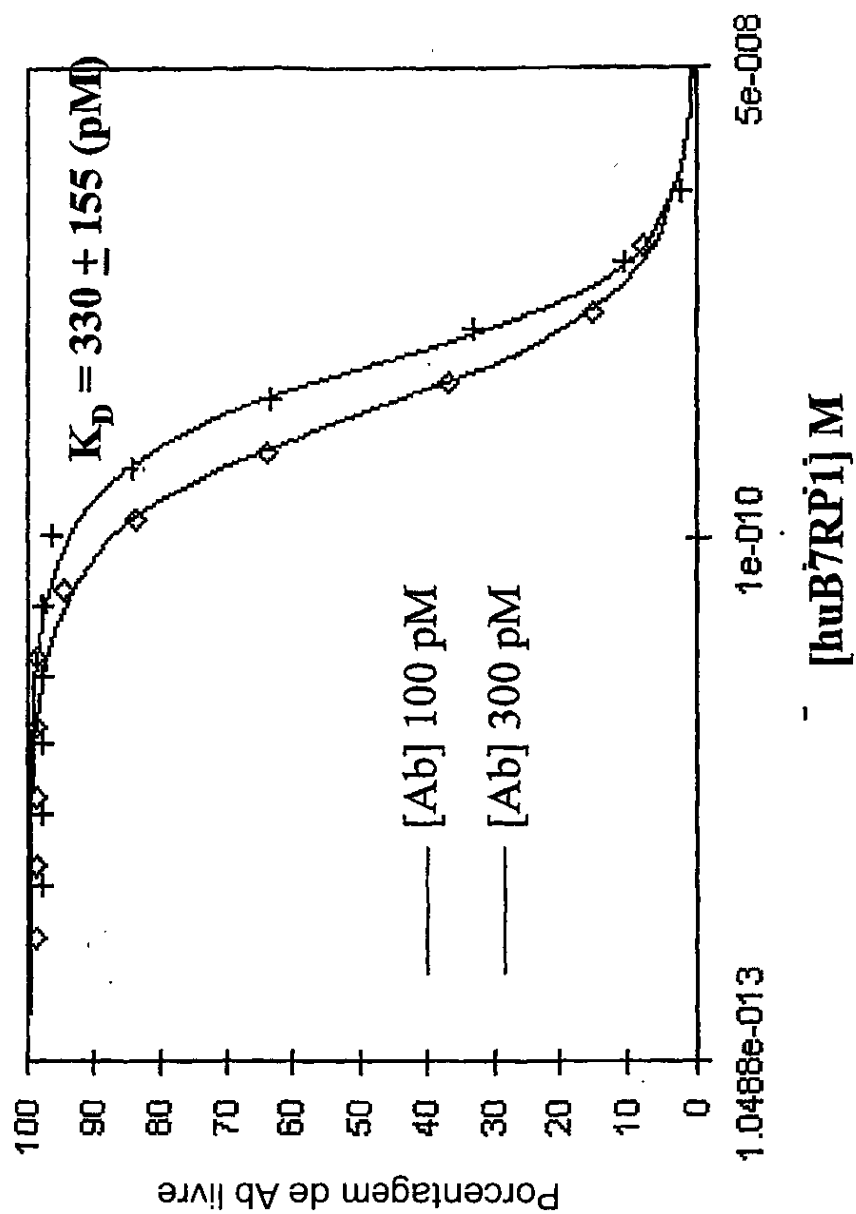
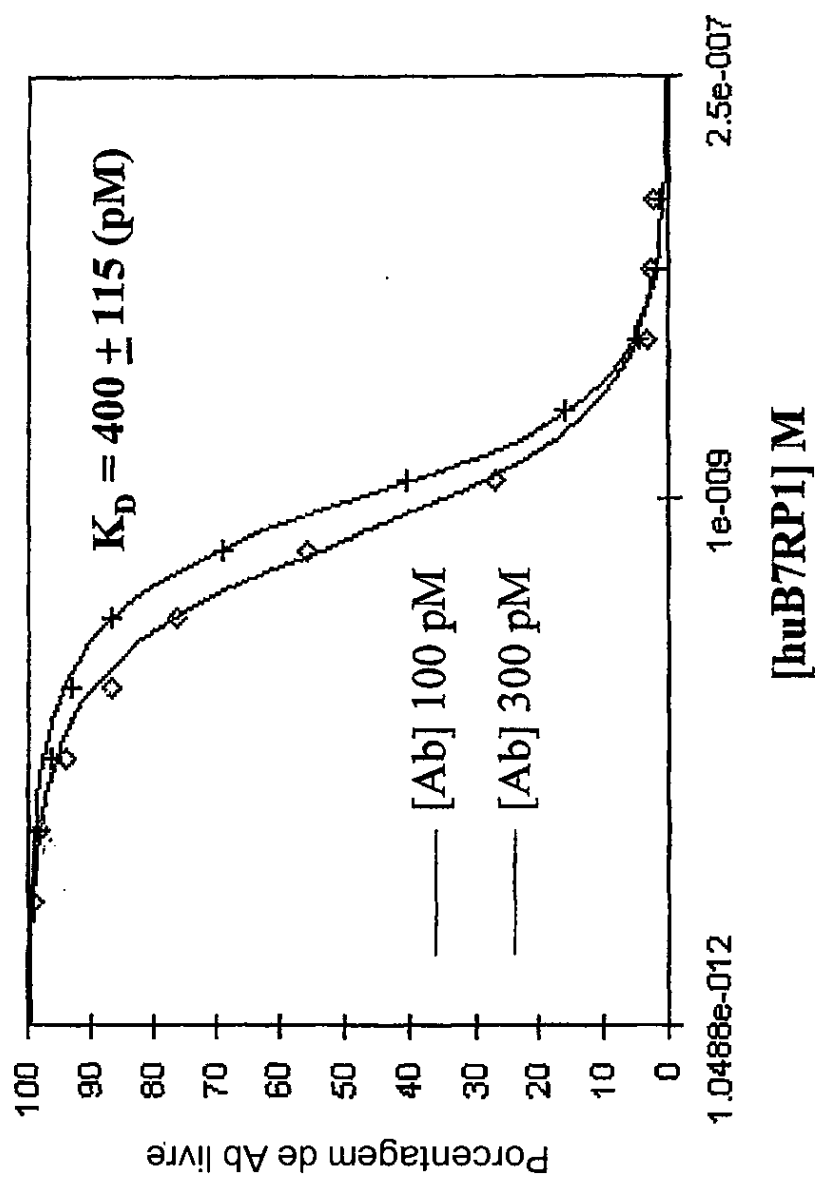


FIG 5

Anti-huB7RP1 2H (linhagem germinativa) contra HuB7RP1



6/17

FIG 6

16H

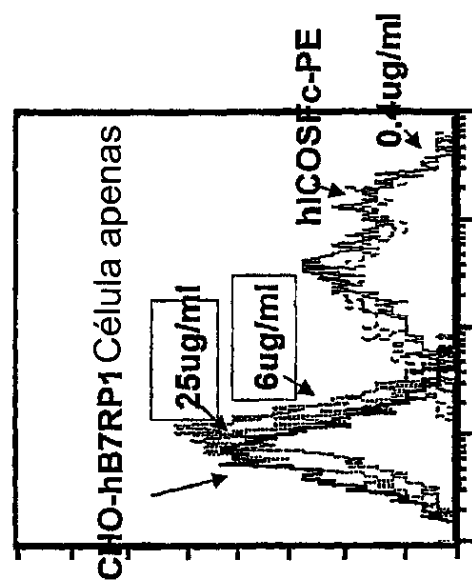


FIG 7

Nº de amostras seqüenciadas	Localização de cDNA	Troca de base	Nº de homozigotos	Nº de heterozigotos	Frequência de alelos alternados	Troca de AA	Localização na seqüência alternados
70	22	G→C	4	31	27.9%	L→V	8 (sig pep)
70	31	G→T	6	48	42.9%	L→M	11 (sig pep)
88	382	G→A	5	40	28.4%	V→I	128 (do tipo IgV)
1.5	661	T→C	?	?	?	L→F	221 (do tipo IgC)

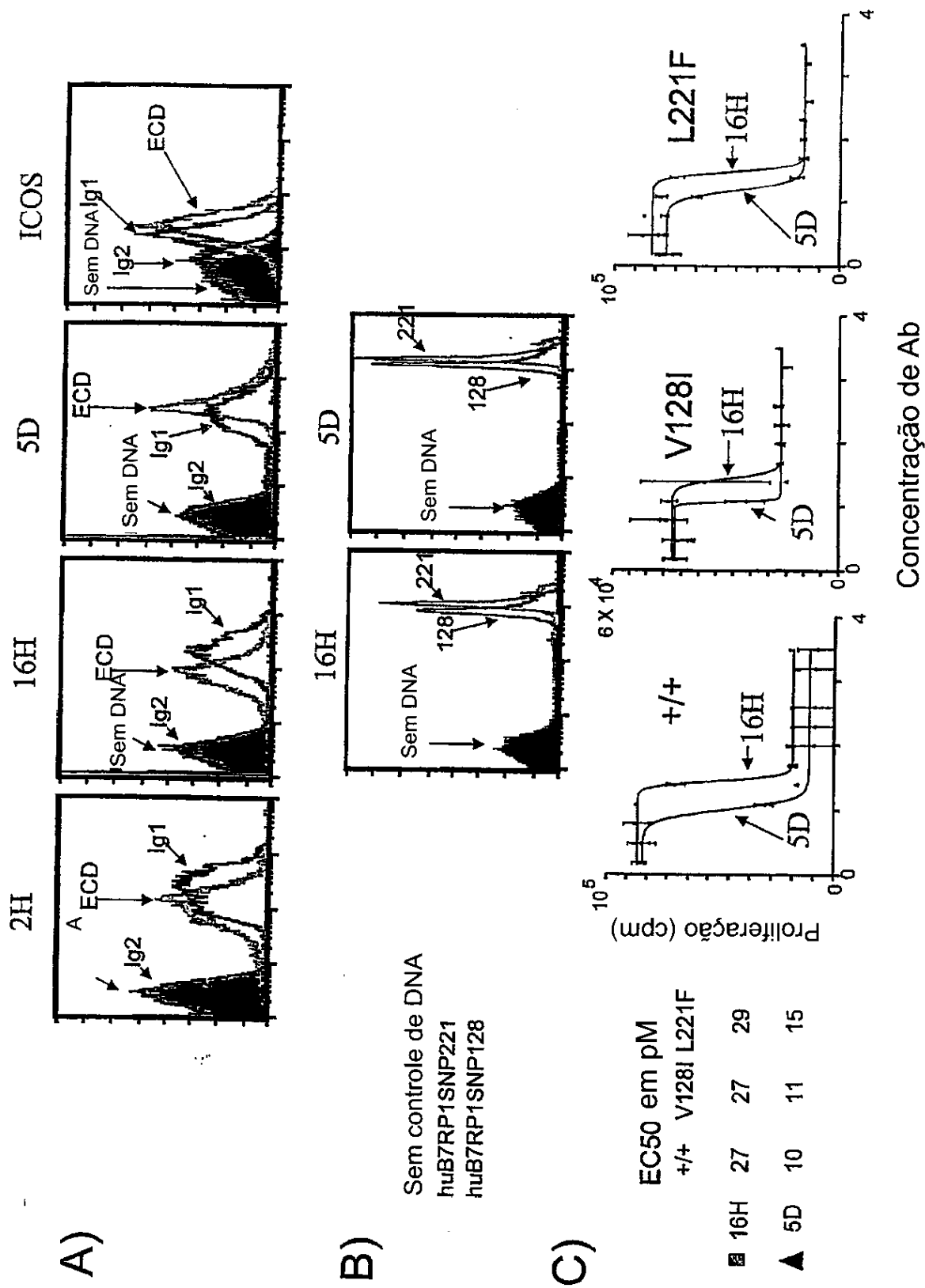
* Número de indivíduos. O número de cromossomos é o dobro dessa quantidade.

FIG 8

mAb	IC50
2H	6.6
4H	9.3
6H	11.2
8H	8.8
10H	11.1
15H	8.2
16H	6.3
18H	12.7
21H	8.7
25H	12.6
31H	10.0
32H	11.6
ICOS	9.5

mAb	IC50
33H	8.3
34H	14.4
38H	8.6
39H	12.6
41H	5.9
43H	8.0
44H	9.2
45H	10.5
2K	17.0
3K	10.0
4K	15.1
5K	18.9
ICOS	9.5

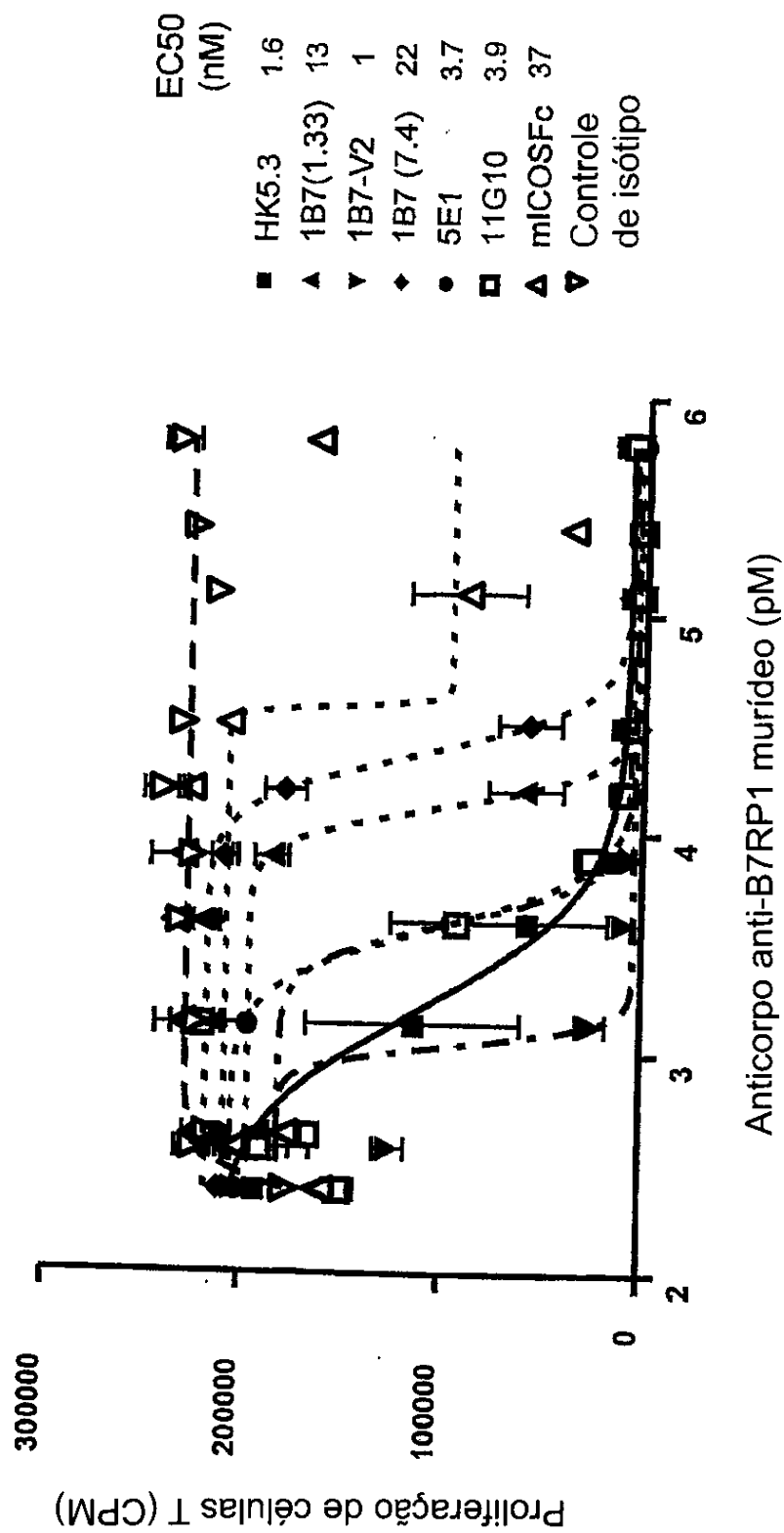
FIG 9



3-73
10-6

10/17

FIG 10A



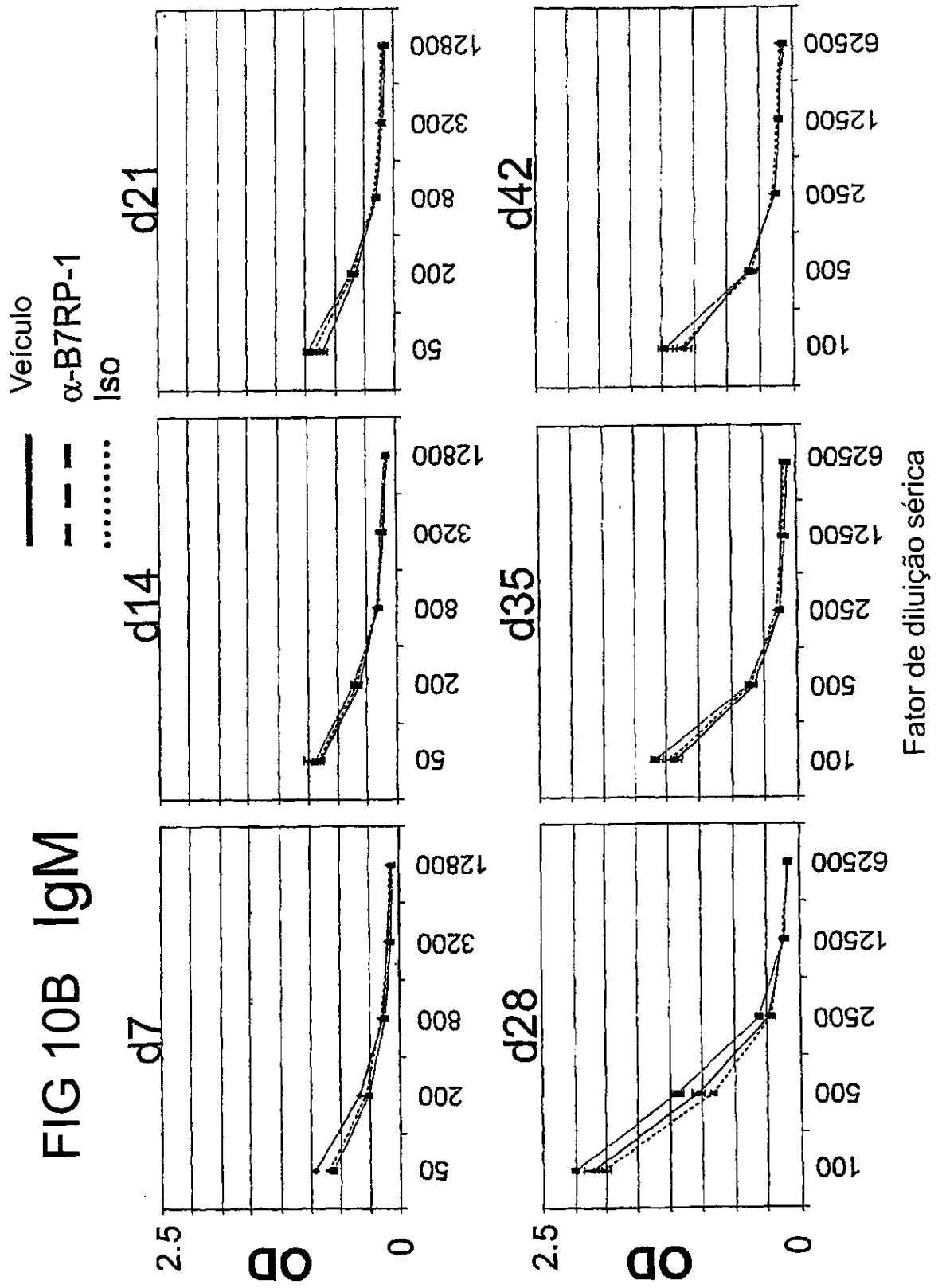
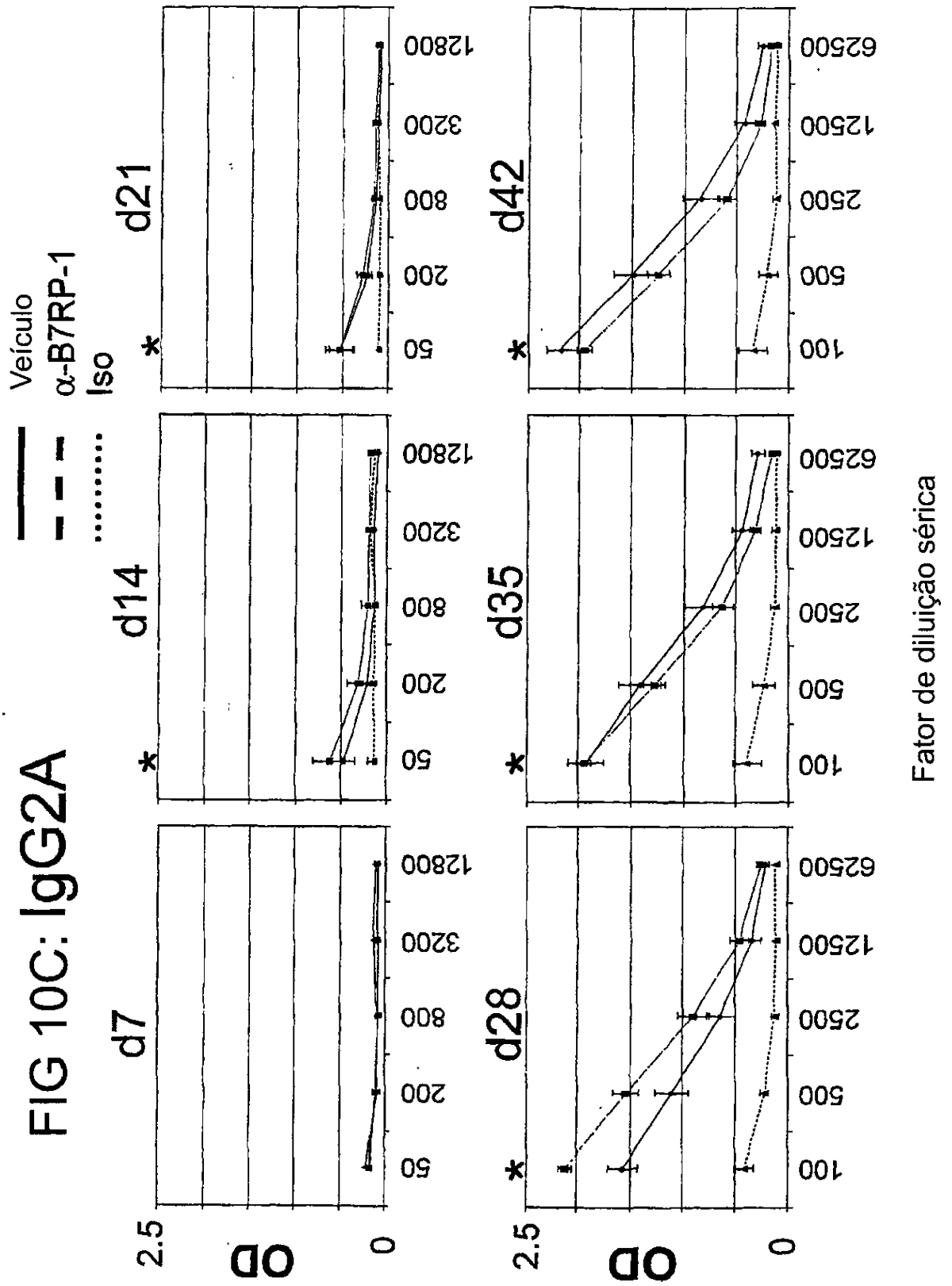
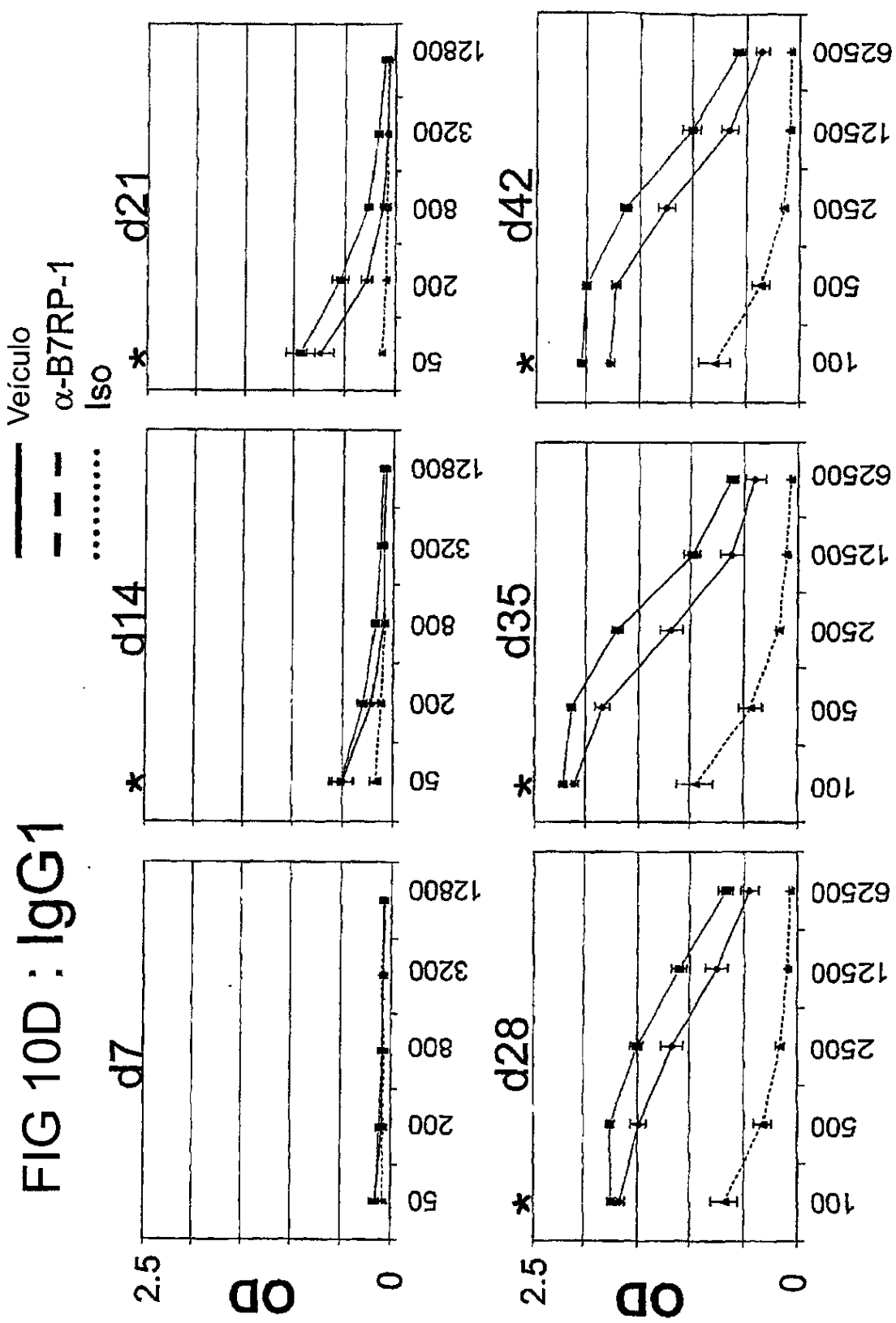


FIG 10C: IgG2A



170
6-8

13/17



Fator de diluição sérica

FIG 11

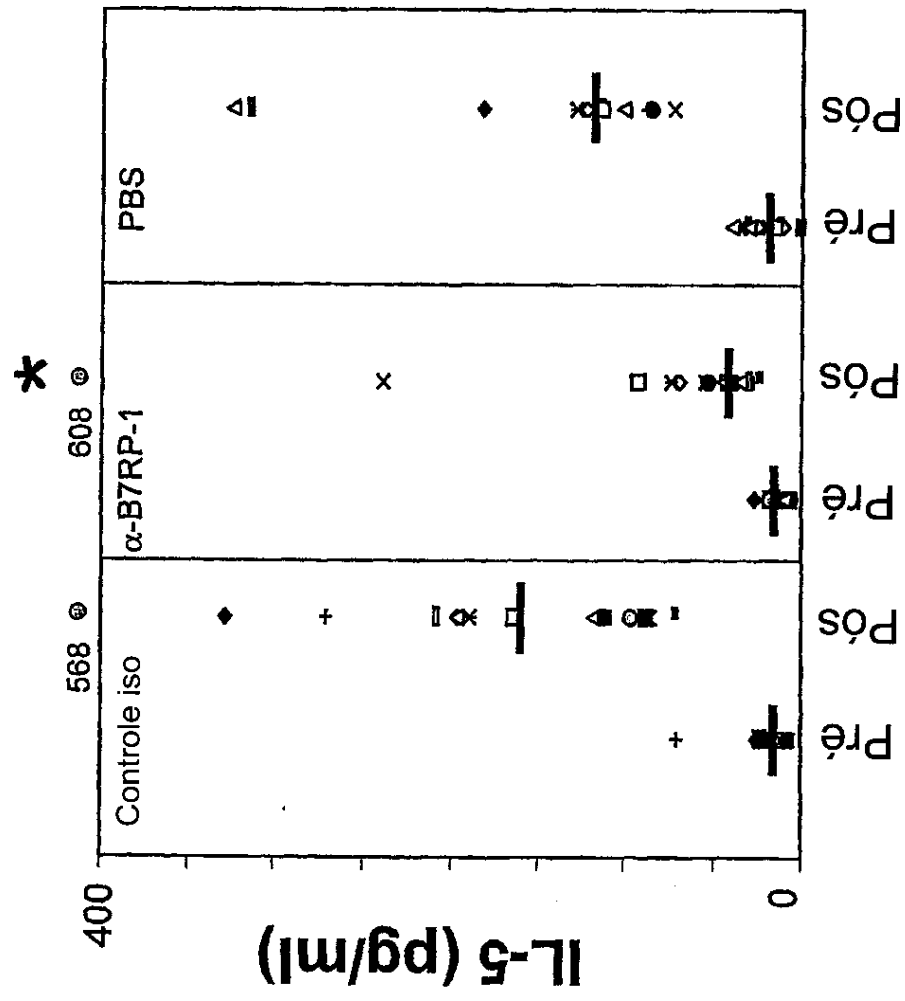
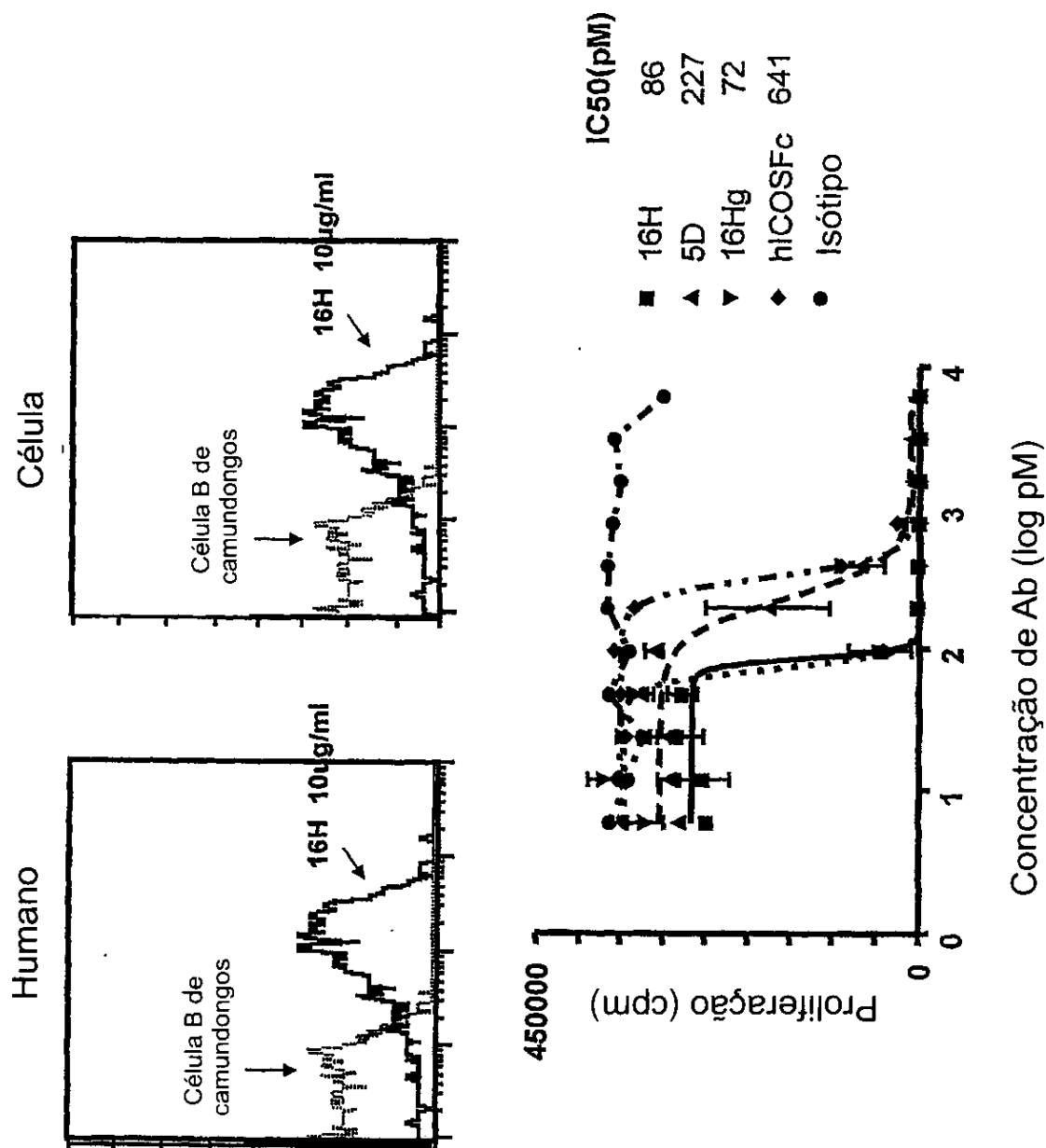


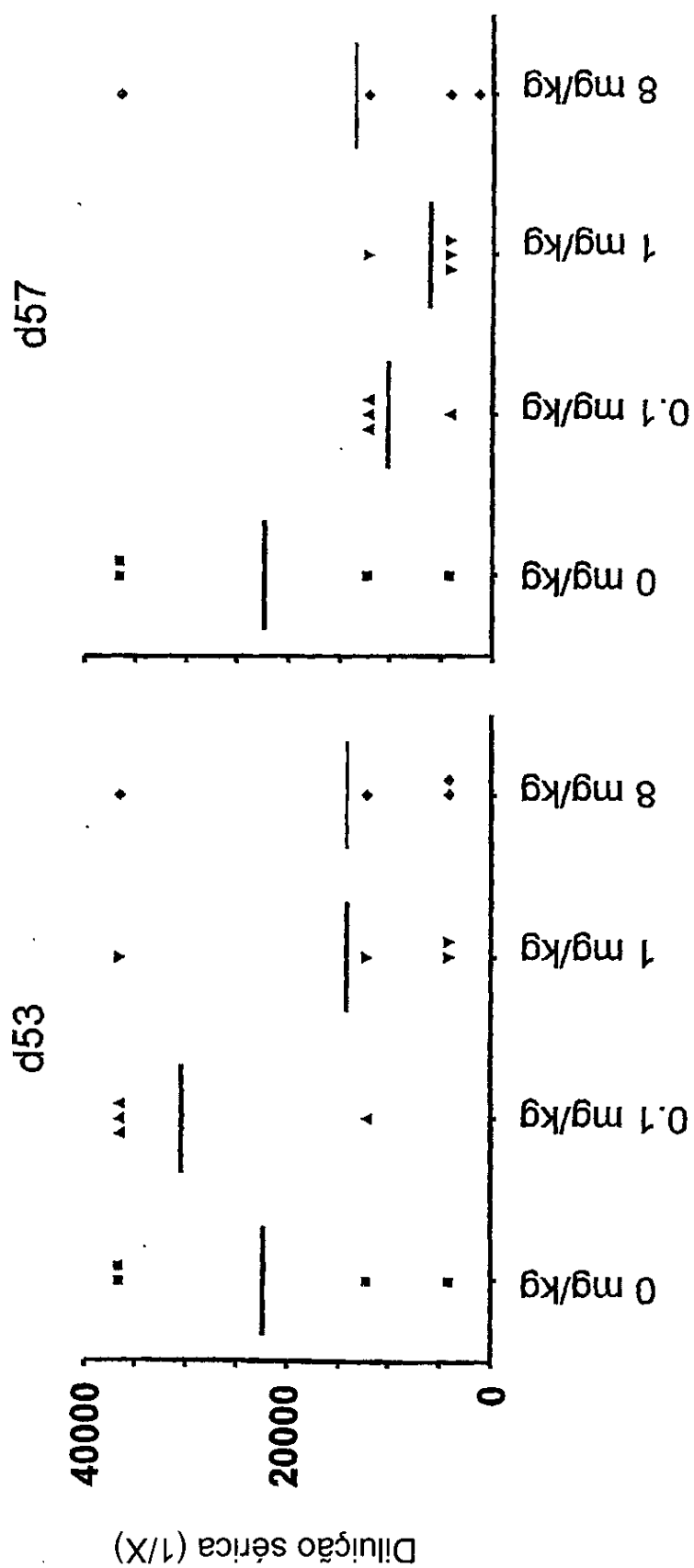
FIG 12



173
0-02

16/17

FIG 13A: 16H



17/17

FIG 13B: 5D

