



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

(11) PI 0415230-1 B1



(22) Data do Depósito: 08/10/2004

(45) Data de Concessão: 10/01/2023

(54) Título: ANTICORPO BIESPECÍFICO DE SUBSTITUIÇÃO DE PROTEÍNAS FUNCIONAIS, COMPOSIÇÃO E SEU USO

(51) Int.Cl.: C12N 15/09; C07K 16/46; A61K 39/395; A61P 7/04.

(30) Prioridade Unionista: 10/10/2003 JP PCT/JP2003/013062; 14/10/2003 JP PCT/JP2003/013123.

(73) Titular(es): CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA.

(72) Inventor(es): KUNIHIRO HATTORI; TARO MIYAZAKI; TETSUHIRO SOEDA; TETSUO KOJIMA.

(86) Pedido PCT: PCT JP2004014911 de 08/10/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/035756 de 21/04/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/04/2006

(57) Resumo: "ANTICORPO BIESPECÍFICO DE SUBSTITUIÇÃO DE PROTEÍNAS FUNCIONAIS". A presente invenção foi bem sucedida na construção de anticorpos biespecíficos, os quais se ligam a ambos o fator IX de coagulação sanguínea/fator IX de coagulação sanguínea ativado e fator X de coagulação sanguínea, e funcionalmente substituto para fator VIII de coagulação sanguínea/fator VIII de coagulação sanguínea ativado que aumenta a reação enzimática.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"ANTICORPO BIESPECÍFICO DE SUBSTITUIÇÃO DE PROTEÍNAS
FUNCIONAIS, COMPOSIÇÃO E SEU USO".**

Campo da Técnica

[0001] A presente invenção refere-se a anticorpos biespecíficos que substituem funcionalmente os cofatores que aumentam a reação enzimática e a composições farmacêuticas compreendendo o anticorpo como um ingrediente ativo.

Antecedentes da Técnica

[0002] Anticorpos têm recebido muita atenção como um remédio por causa de sua alta estabilidade no sangue e baixa antigenicidade. Um desses são anticorpos biespecíficos que podem simultaneamente reconhecer dois tipos de antígeno. Anticorpos biespecíficos foram propostos por algum tempo; no entanto, apenas anticorpos que simplesmente conectam dois tipos de antígeno, tal como aqueles para redirecionamento de células NK, macrófagos e células T (vide Documento de Não-patente 7), foram descritos. Por exemplo, MDX-210, que está atualmente sob estudo clínico, é um anticorpo biespecífico que apenas redireciona monócitos expressando Fcγ-RI e semelhantes para células de câncer expressando HER-2/neu. Desse modo, não há nenhum exemplo até agora que utilize um anticorpo biespecífico como um meio alternativo para funcionalmente substituir o cofator que aumenta a reação enzimática.

[0003] Exemplos de cofatores são fator de tecido (TF), fator de coagulação sanguínea V (F, V), fator de coagulação sanguínea ativado V (F. Va), fator de coagulação sanguínea VIII (F. VIII), fator de coagulação sanguínea ativado VIII (F. VIIIa), trombomodulina (TM), proteína S (PS), proteína Z (PZ), heparina, complemento C4b, fator H de regulação complementar, proteína de cofator de membrana (MCP) e receptor 1 de complemento (CR1).

[0004] Desses, F. VIII/F.VIIa é um cofator requerido para expressão de atividade suficiente de fator de coagulação sanguínea ativado IX (F. IXa). Scheiflinger F. e outros verificaram que um certo anticorpo anti-F.IX/F.IXa age para promover a ativação de fator X de coagulação sanguínea (F.X) por F.IXa em um ensaio cromogênico (Documento de Patente 1). No entanto, em um ensaio que examina a habilidade quanto à recuperação de coagulação em plasma deficiente em F.VIII, a habilidade de recuperação de coagulação foi observada apenas quando F.IXa foi adicionado exogenamente, mas não se esse anticorpo fosse usado sozinho.

[0005] F.VIIIa é sabido interagir não apenas com F.IXa, mas também com F.X (vide Documentos 5 e 6 de Não-Patente). Com relação a isso, o anticorpo de Scheiflinger F. e outros não pode ser dito substituir suficientemente a função de F. VIII/F.VIIIa, e sua atividade parece ser também insuficiente.

[0006] Através de pesquisa dedicada, a presente invenção foi bem sucedida na produção de anticorpos biespecíficos que funcionalmente substituem os cofatores que aumentam a atividade enzimática, e então terminaram a presente invenção.

[0007] [Documento de Patente 1] WO 01/19992

[0008] [Documento de Patente 2] Patente U.S. No: 4.474.893

[0009] [Documento de Patente 3] EP 404.097

[00010] [Documento de Patente 4] WO 93/11161

[00011] [Documento de Patente 5] Pedido de Patente Japonês No: 2002-112369

[00012] [Documento de Patente 6] Pedido de Patente Japonês No: 2003-012648

[00013] [Documento de Patente 7] Pedido de Patente Japonês Publicação Kokai No. (JP-A) H5-304992 (não-examinado, Pedido de Patente Japonês publicado)

- [00014] [Documento de Patente 8] JP-AH2-145187
- [00015] [Documento de Patente 9] JP-A H5-213775
- [00016] [Documento de Patente 10] JP-AH10-165184
- [00017] [Documento de Patente 11] JP-A H11-71288
- [00018] [Documento de Patente 12] JP-A 2002-518041
- [00019] [Documento de Patente 13] JP-A H11-506310
- [00020] [Documento de Patente 14] JP-A H5-199894
- [00021] [Documento de Patente 15] JP-A H10-511085
- [00022] [Documento de Patente 16] JP-A H5-184383
- [00023] [Documento de Não-patente 1] Nilsson I.M. e outros, "J. Intern. Med." 1992. Vo1. 235, p.25-32 [Documento de Não-patente 2] Löfqvist T. e outros, "J. Intern. Med" 1997. Vol.241, p.395-400 (o "o" de Lofqvist é escrito com um trema).
- [00024] [Documento de Não-patente3] 24th Meeting of The Japanese Society on Thrombosis and Hematosis, Special Committee on Examining Hemophilia Standardization, Mini-symposium" 2001, <http://www.jsth.org>
- [00025] [Documento de Não-patente 4] Medical Bulletin No. 193 1994
- [00026] [Documento de Não-patente 5] Mertens K. e outros, "Thromb. Haemost." 1999, Vol. 82, p.209-217 [Documento de Não-patente 6] Lapan K.A. e outros., "Thromb. Haemost." 1998, Vol. 80, p.418-422 [Documento de Não-patente 7] Segal D.M. e outros, "Journal of Immunological Methods", 2001, Vol. 248, p.1-6
- [00027] [Documento de Não-patente 8] Bos R. e Nieuwenhuitzen W, "Hybridoma", 1992, Vol. 11, No.1, p. 41-51
- [00028] [Documento de Não-Patente 9] Brennan M. e outros, "Science", 1985, Vol. 229, No. 1708, p.81-3 [Documento de Não-patente10] Karpovsky B. et al., "J. Exp. Med.", 1984. Vol. 160, No.6, p.1686-701

- [00029] [Documento de Não-patente 11] Suresh, M.R. e outros, "Methods Enzymol.", 1986, Vo1. 121, p. 210-28
- [00030] [Documento de Não-patente 12] Massimo, Y.S. e outros, "J. Immunol. Methods", 1997, Vol. 201, p.57-66
- [00031] [Documento de Não-patente 13] Brennan, M. e outros, "Science", 1985, Vol. 229, p. 81
- [00032] [Documento de Não-patente 14] Shalaby, M.R. e outros, "J. Exp. Med.", 1992, Vol.175, p.217-25 [Documento de Não-patente 15] Holliner, P. e outros., "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 1993, Vo1. 90, p. 6444-8
- [00033] [Documento de Não-patente 16] Ridgway, J.B. e outros., "Protein Eng.", 1996, Vo1. 9, p. 617-21
- [00034] [Documento de Não-Patente 17] Hammerling, U. e outros, "J. Exp. Med.", 1968, Vo1.128, p.1461-73 [Documento de Não-Patente 18] Kurokawa T. e outros, "Bio/Technology" , 1989, Vol. 7, p. 1163 [Documento de Não-patente 19] Link, B.K. e outros, "Blood", 1993, Vol. 81, p.3343
- [00035] [Documento de Não-patente 20] Nitta T. e outros, "Lancet", 1990, Vol. 335, p.368-71
- [00036] [Documento de Não-patente 21] deLeij, L. e outros "Foundation Nationale de Transfusion Sanguine, Les Ulis France" 1990, p.249-53
- [00037] [Documento de Não-patente 22] Le Doussal J.M. e outros, "J. Nucl. Med.", 1993, Vol. 34, p. 1662-71 [Documento de Não-patente 23] Stickney, D.R. e outros, "Cancer Res." 1991, Vol. 51, p. 6650-5 [Documento de Não-patente 24] Weiner, L.M. e outros, "Cancer Res.", 1993, Vo1.53, p. 94-100 [Documento de Não-patente 25] Kroesen, B.J. e outros, "Br. J. Cancer", 1994, Vol. 70, p. 652-61 [Documento de Não-patente 26] Weiner, G.J e outros, "J. Immunol.", 1994, Vol. 152. p. 2385 [Documento de Não-patente 27] Suresh M.R. e outros, "Proc.

Natl. Acad. Sci. USA", 1986, Vol. 83, p. 7989-93

[00038] [Documento de Não-patente 28] Milstein, C. e Cuello, A.C. "Nature", 1983, Vol. 305, p.537 [Documento de Não-patente 29] Xiang, J. e outros, "Mol. Immunol.", 1990, Vol. 27, p.809

[00039] [Documento de Não-patente 30] Bebbington, C.R. e outros; "Bio/Technology", 1992. Vol. 10, p. 169 [Documento de Não-patente 31] Huse, W.D. e outros, "Science", 1989, Vol. 246. p.1275

[00040] [Documento de Não-patente 32] McCafferty, J. e outros, "Nature", 1990, Vol. 348, p.552

[00041] [Documento de Não-Patente 33] Kang, A.S. e outros, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1991, Vol. 88, p. 4363.

Descrição da Invenção

[00042] Um objetivo da presente invenção é prover anticorpos biespecíficos que funcionalmente substituem cofatores que aumentam a reação enzimática.

[00043] Através de pesquisa dedicada, os presentes inventores foram bem-sucedidos no encontro de anticorpos biespecíficos que especificamente se ligam a ambos F.IX/F.IXa e F.X e substituem a função do cofator F.VIIIa (isto é, uma função para promover ativação de F.X. por F.IXa). Isto é, os presentes inventores foram bem-sucedidos na produção de anticorpos específicos que reconhecem ambos uma enzima e seu substrato e funcionalmente substituem cofatores da enzima.

[00044] A presente invenção refere-se a anticorpos biespecíficos que funcionalmente substituem os cofatores que aumentam a reação enzimática, e, mais especificamente a:

[1] Um anticorpo reconhecendo ambos uma enzima e um seu substrato, onde o dito anticorpo é um anticorpo biespecífico que substitui funcionalmente um cofator que aumenta a reação enzimática.

[2] O anticorpo de acordo com [1], onde a dita enzima é

uma enzima proteolítica.

[3] Um anticorpo de acordo com [2], onde os ditos enzima proteolítica, substrato e cofator são fatores associados à coagulação sanguínea/fibrinólise.

[4] O anticorpo de acordo com [3], onde a enzima de um fator associado à coagulação sanguínea/fibrinólise é fator IX de coagulação sanguínea e/ou fator IX de coagulação sanguínea ativado; o substrato é o fator X de coagulação sanguínea; e o cofator é fator VIII de coagulação sanguínea e/ou fator VIII de coagulação sanguínea ativado.

[5] O anticorpo de acordo com qualquer um de [1] a [4], onde o dito anticorpo compreende uma região de determinação de complementariedade compreendendo a sequência de aminoácido de anticorpo CDR3 de antifator IX/IXa de coagulação sanguínea de (a1) ou (a2) que segue ou uma região de determinação de complementariedade funcionalmente equivalente a ela, e uma região de determinação de complementariedade compreendendo a sequência de aminoácido do anticorpo CDR3 de antifator X de coagulação sanguínea descrito em qualquer um de que seguem (b1) a (b9) ou uma região de determinação de complementariedade funcionalmente equivalente e ela:

[00045] (a1) sequência de aminoácido 3 da CDR da cadeia H descrita na SEQ ID N°:16;

(a2) sequência de aminoácido 3 da CDR da cadeia H descrita na SEQ ID N°: 20;

(b1) sequência de aminoácido 3 da CDR da cadeia H descrita na SEQ ID N°: 24;

(b2) sequência de aminoácido 3 da CDR3 da cadeia H descrita na SEQ ID N°: 28;

(b3) sequência de aminoácido 3 da CDR3 da cadeia H

descrita na SEQ ID N°: 32;

(b4) sequência de aminoácido 3 da CDR3 da cadeia H descrita na SEQ ID N°: 36;

(b5) sequência de aminoácido 3 da CDR3 da cadeia H descrita na SEQ ID N°: 40;

(b6) sequência de aminoácido 3 da CDR3 da cadeia H descrita na SEQ ID N°: 44;

(b7) sequência de aminoácido 3 da CDR3 da cadeia H descrita na SEQ ID N°: 48;

(b8) sequência de aminoácido 3 da CDR3 da cadeia H descrita na SEQ ID N°: 52;

(b9) sequência de aminoácido 3 da CDR3 da cadeia H descrita na SEQ ID N°: 56.

[6] O anticorpo de acordo com qualquer um de [1] a [4], onde o dito anticorpo compreende uma região de determinação de complementariedade compreendendo a sequência de aminoácido de CDR de anticorpo de antifator IX/IXa de coagulação sanguínea de (a1) ou (a2) que segue ou uma região de determinação de complementariedade funcionalmente equivalente a ela, e uma região de determinação de complementariedade compreendendo a sequência de aminoácido da CDR do anticorpo do antifator X de coagulação sanguínea descrita em qualquer um de (b1) a (b9) que segue ou uma região de determinação de complementariedade funcionalmente equivalente a ela:

[00046] (a1) sequências de aminoácido 1, 2 e 3 da CDR da cadeia H descritas nas SEQ ID N°s: 14, 15 e 16, respectivamente;

(a2) sequências de aminoácido 1, 2 e 3 da CDR da cadeia H descritas nas SEQ ID N°s: 18, 19 e 20, respectivamente;

(b1) sequências de aminoácido 1, 2 e 3 da CDR da cadeia H descritas nas SEQ ID N°s: 22, 23 e 24, respectivamente;

(b2) sequências de aminoácido 1, 2 e 3 da CDR da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 26, 27 e 28, respectivamente;

(b3) sequências de aminoácido 1, 2 e 3 da CDR da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 30, 31 e 32, respectivamente;

(b4) sequências de aminoácido 1, 2 e 3 da CDR da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 34, 35 e 36, respectivamente;

(b5) sequências de aminoácido 1, 2 e 3 da CDR da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 38, 39 e 40, respectivamente;

(b6) sequências de aminoácido 1, 2 e 3 da CDR da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 42, 43 e 44, respectivamente;

(b7) sequências de aminoácido 1, 2 e 3 da CDR da cadeia H descritas nas SEQ ID NOs: 46, 47 e 48, respectivamente;

(b8) sequências de aminoácido 1, 2 e 3 da CDR da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 50, 51 e 52, respectivamente;

(b9) sequências de aminoácido 1, 2 e 3 da CDR da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 54, 55 e 56, respectivamente;

[7] Uma composição compreendendo o anticorpo de acordo com qualquer uma de [1] a [6] e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[8] Composição de acordo com [7], onde a dita composição é uma composição farmacêutica usada para prevenção e/ou tratamento de hemorragia, distúrbio acompanhado de hemorragia ou distúrbio causado por hemorragia.

[9] A composição de acordo com [8], onde a hemorragia, distúrbio acompanhado por hemorragia ou distúrbio causado por hemorragia é um distúrbio que surge e/ou progride como um resultado de uma diminuição ou deficiência do fator VIII de coagulação sanguínea e/ou fator VIII de coagulação sanguínea ativado.

[10] A composição de acordo com [9], onde o distúrbio que surge e/ou progride como um resultado de uma atividade menor ou

deficiente do fator VIII de coagulação sanguínea e/ou fator VIII de coagulação sanguínea ativado é hemofilia A.

[11] A composição de acordo com [9], onde o distúrbio que surge e/ou progride como um resultado de uma atividade da diminuição ou deficiência do fator VIII de coagulação sanguínea e/ou fator VIII de coagulação sanguínea ativado é um distúrbio onde um inibidor contra o fator VIII de coagulação sanguínea e/ou fator VIII de coagulação sanguínea ativado é gerado.

[12] A composição de acordo com [9], onde o distúrbio que surge e/ou progride como um resultado de uma atividade menor ou deficiente do fator VIII de coagulação sanguínea e/ou fator VIII de coagulação sanguínea ativado é hemofilia adquirida.

[13] A composição de acordo com [9], onde o distúrbio que surge e/ou progride como um resultado de uma atividade menor ou deficiente do fator VIII de coagulação sanguínea e/ou fator VIII de coagulação sanguínea ativado é doença de von Willebrand.

[14] Método para prevenção e/ou tratamento de hemorragia, o distúrbio acompanhado de hemorragia ou distúrbio causado por hemorragia, onde o dito método compreende a etapa de administração do anticorpo de acordo com qualquer um de [1] a [6], ou a composição de acordo com qualquer um de [7] a [13].

[15] Uso do anticorpo de acordo com qualquer uma [1] a [6] para preparação da composição de acordo com qualquer um de [7] a [13].

[16] Kit usado no método de prevenção e/ou tratamento de distúrbios de acordo com [14], onde o dito kit compreende pelo menos o anticorpo de acordo com qualquer um de [1] a [6] ou a composição de acordo com [7].

[17] Método de prevenção e/ou tratamento de hemorragia, distúrbio acompanhado de hemorragia ou distúrbio causado por

hemorragia, onde o dito método compreende a etapa de administração do anticorpo de acordo com qualquer um de [4] a [6] ou a composição de acordo com qualquer um de [7] a [13] em combinação com fator de coagulação sanguínea VIII.

[18] Kit usado no método de prevenção e/ou tratamento de hemorragia, distúrbio acompanhado de hemorragia ou distúrbio causado por hemorragia de acordo com [17], onde o dito kit compreende pelo menos o anticorpo de acordo com qualquer um de [4] a [6], ou a composição de acordo com [7] e fator VIII de coagulação sanguínea.

Breve Descrição dos Desenhos

[00047] A Figura 1 mostra a região de inserção de pcDNA4-g4H.

[00048] A Figura 2 mostra as regiões de inserção de pcDNA4-g4L e pIND-g4L.

[00049] A Figura 3 mostra a região de inserção de pIND-g4H.

[00050] A Figura 4 mostra resultados de medição da atividade mimética de F.VIIIa de um anticorpo biespecífico anti-F.IXa/anti-F.X, gerado a partir de anticorpo XB12 anti-F.IXa e anticorpo SB04, SB21, SB42, SB38, SB30, SB07, SB05, SB06 ou SB34 anti-F.X. A concentração das soluções de anticorpo era 10 µg/mL (concentração final 1 µg/mL). O resultado são nove tipos de anticorpos biespecíficos que mostraram um aumento da atividade mimética de F.VIIIa: XB12/SB04, XB12/SB21, XB12/SB42, XB12/SB38, XB12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 e XB12/SB34, na ordem de resistência de atividade.

[00051] A Figura 5 mostra resultados de medição da atividade mimética de F.VIII-a de um anticorpo biespecífico anti-F.IXa/anti-F.X gerado a partir de anticorpo XT04 anti-F.IXa e anticorpo SB04, SB21, SB42, SB38, SB30, SB07, SB05, SB06 ou SB34 anti-F.X. A concentração das soluções de anticorpo era 10 µg/mL (concentração

final 1 µg/mL). Como um resultado, XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, ST04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05, XT04/SB06 e XT04/SB34 mostraram um aumento na atividade mimética de F.VIIIa.

[00052] A Figura 6 mostra resultados de medição da atividade mimética de F.VIIIa de várias concentrações de XB12/SB04, que mostraram a mais alta atividade na Figura 4. Como resultado, XB12/SB04 mostraram um aumento dependente da concentração da atividade mimética de F.VIIIa.

[00053] A Figura 7 ostra resultados de medição do tempo de coagulação do plasma (APTT) na presença de XB12/SB04, XB12/SB21, XB12/SB42, XB12/SB38, XB12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 e XB12/SB34. A concentração das soluções de anticorpo misturadas com plasma deficiente em F.VIII era 1,7 µg/mL para XB12/SB06 e 10 µg/mL para o resto. Como resultado, XB12/SB04, XB12/SB21, XB12/SB42, XB12/SB38, XB12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 e XB12/SB34 mostraram um efeito de redução do tempo de coagulação comparado com na ausência dos anticorpos.

[00054] A Figura 8 mostra resultados de medição do tempo de coagulação do plasma (APTT) na presença de XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, XT04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05, XT04/SB06 e XT04/SB34. A concentração das soluções de anticorpo misturadas com plasma deficiente em F.VIII era 5 µg/mL para XT04/SB06 e 10 µg/mL para o resto. Como resultado, XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, XT04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05, XT04/SB06 mostraram um efeito de diminuição do tempo de coagulação comparado com na ausência dos anticorpos. XT04/SB34 não mostraram nenhum efeito de diminuição do tempo de coagulação.

[00055] A Figura 9 mostra resultados de medição do tempo de coagulação com várias concentrações de XB12/SB04, que mostrou o efeito de diminuição do tempo de coagulação mais alto (APTT) nas Figuras 7 e 8. Como resultado, XB12/SB04 mostraram um efeito dependente da concentração de diminuição do tempo de coagulação. A concentração do anticorpo na Figura mostra valores da solução de anticorpo misturada com plasma deficiente em F.VIII

[00056] A Figura 10 mostra resultados do Western blotting GST-AP de SB04 ou SB06, onde 1), 2) e 3) são resultados de reação de GST-AP transcrito com SB04, SB06 e uma amostra não contendo nenhum anticorpo, respectivamente. Os resultados mostram a detecção apenas da reação de ligação de SB04 com GST-AP.

[00057] A Figura 11 mostra um vetor pELBGlacl. ColE1ori: a região de origem de replicação da série de plasmídeo ColE1; flori: região de origem de replicação de fago f1; lacI: região de codificação de proteína repressora de lactose; Plac: promotor de lactose; pelBss: sequência de sinal de proteína PelB de *E. coli*; scFv: região de codificação de molécula de anticorpo de filamento simples; gene III (gene3): região de codificação de proteína de Gene III de fago f1; Ampr: gene resistente à ampicilina; e Sfi I: local de clivagem Sfi da enzima de restrição.

[00058] A Figura 12 mostra resultados de medição da atividade mimética de F.VIII-a usando sobrenadantes de cultura dos anticorpos biespecíficos expressos, que são combinações de um anticorpo anti-F.IXa (A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50, A69 ou XB12) e um anticorpo anti-F.X (B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB04, SB15 ou SB27). "+" representa casos onde a atividade mimética de F.VIIIa é 0,1 ou mais.

[00059] A Figura 13 mostra resultados de um ensaio de coagulação de plasma realizado usando preparações purificadas de anticorpos

biespecíficos expressos, que são combinados com de um anticorpo anti-F-IXa (A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50, A69 ou XB12) e um anticorpo anti-F.X (B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB04, SB15 ou SB27). O tempo de coagulação foi diminuído em 10 a 20 segundos ("+"), 20 a 40 segundos ("++"), 40 a 50 segundos ("+++") ou 50 segundos ("++++") ou mais com a adição do anticorpo comparado com quando os anticorpos não foram adicionados.

[00060] A Figura 14 mostra resultados de medição do tempo de coagulação em várias concentrações de A44/B26, que tinham um efeito de diminuição do tempo de coagulação alto (APTT) na Figura 13. O tempo de coagulação era 113 segundos quando o anticorpo não foi adicionado. Como resultado, A44/B26 mostrou um efeito dependente da concentração de diminuição do tempo de coagulação. A concentração do anticorpo na figura mostra valores da solução de anticorpo misturada com plasma deficiente em F.VIII.

[00061] A Figura 15 mostra resultados de medição do tempo de coagulação em várias concentrações de A69/B26, que tinham um efeito de diminuição do tempo de coagulação alto (APTT) na Figura 13. O tempo de coagulação era 109,6 segundos quando o anticorpo não era adicionado. Como resultado, A69/B26 mostraram um efeito dependente da concentração de diminuição do tempo de coagulação. A concentração de anticorpo na figura mostra valores da solução de anticorpo misturada com plasma deficiente em F.VIII.

[00062] A Figura 16 mostra resultados de medição do tempo de coagulação (APTT) na coexistência de A44/B26 ou XB12/SB04 com F.VIII. Como resultado, quando comparada com F.VIII sozinho, uma solução misturada de A44/B26 ou XB12/SB04 com F.VIII mostrou um efeito de diminuição do tempo de coagulação.

[00063] A Figura 17 mostra resultados de medição do tempo de coagulação (APTT) em plasma inibidor sob a presença de A44/B26 ou XB12/SB04. Como resultado, A44/B26 ou XB12/SB04 mostrou um efeito de diminuição do tempo de coagulação comparado com na ausência de anticorpos.

[00064] A Figura 18 mostra resultados de medição do tempo de coagulação em várias concentrações de XB12/SB04 e XB12 humanizado/SB04 humanizado. O tempo de coagulação era 111,3 segundos quando nenhum anticorpo foi adicionado. Como resultado da medição, XB12 humanizado/SB04 humanizado mostraram um efeito de diminuição do tempo de coagulação similar àquele de XB12/SB04. A concentração do anticorpo na figura mostra valores da solução de anticorpo misturada com plasma deficiente em F.VIII.

Melhor Modo de Realizar a Invenção

[00065] Um anticorpo biespecífico de acordo com a presente invenção é uma molécula compreendendo dois tipos de anticorpos ou fragmentos de anticorpo tendo especificidades para antígenos diferentes. O anticorpo biespecífico é, não particularmente limitado, mas de preferência monoclonal.

[00066] Os anticorpos biespecíficos da presente invenção são de preferência anticorpos recombinantes, gerados usando técnicas de recombinação de gene (vide, por exemplo, Borrebaeck, C.A.K. e Larrick, J.W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Publicado no Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Um anticorpo recombinante pode ser obtido através de clonagem de um DNA codificando um anticorpo de células produtoras de anticorpo, tal como hibridomas ou linfócitos sensibilizados, incorporando o DNA em um vetor apropriado e introduzindo o vetor em um hospedeiro para produção de anticorpo.

[00067] Ainda, anticorpos da presente invenção podem ser

fragmentos de anticorpo ou anticorpos modificados. Fragmentos de anticorpo incluem moléculas de diacorpo (Db), anticorpo linear, anticorpo de filamento único (daqui em diante também referido como scFcv), etc. Aqui, fragmento de "Fv" representa o menor fragmento de anticorpo compreendendo um local de reconhecimento de antígeno e local de ligação completo. Um fragmento de "Fv" é um dímero (dímero VH-VL) onde uma região variável (VH) de cadeia pesada (H) e uma região variável (VL) de cadeia leve (L) estão fortemente conectadas por uma ligação não-covalente. Três regiões de determinação de complementariedade (CDRs) de cada região variável interagem para formar um local de ligação de antígeno sobre a superfície de um dímero VH-VL. Suas CDRs conferem um local de ligação de antígeno em um anticorpo. No entanto, mesmo uma região variável (ou metade de um Fv que contém apenas três CDRs específicas de antígeno) é capaz de reconhecer um antígeno e se ligar a ele, embora sua afinidade seja menor do que aquela do local de ligação integral.

[00068] Ainda, fragmento Fab (também referido como (F(ab)) contém ainda uma região constante de cadeia L e uma região constante de cadeia H (CH1). Um fragmento Fab' difere de um fragmento Fab pelo fato de que o primeiro contém vários resíduos adicionais derivados de carboxila terminal de uma região CH1 de cadeia H, que compreende uma ou mais cisteínas da região de impedimento de um anticorpo. Fab'-SH refere-se a Fab' tendo um grupo tiol livre em um ou mais resíduos de cisteína da região constante. Fragmentos F(ab') são gerados através de clivagem da ligação dissulfeto nas cisteínas da porção de impedimento de uma digestão de pepsina de F(ab')₂. Outros fragmentos de anticorpo ligados quimicamente são também conhecidos daqueles versados na técnica.

[00069] Diacorpo refere-se um fragmento de anticorpo divalente

construído através de fusão de gene (Holliger, P. e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993); EL 404.097; WO93/11161, etc). Diacorpo é um dímero compreendendo duas cadeias de peptídeo; em cada cadeia de polipeptídeo uma região variável da cadeia L (V_L) está conectada a uma região variável da cadeia H (V_H) na mesma cadeia através de um ligante que é muito curto para permitir emparelhamento entre as duas regiões (por exemplo, cerca de 5 resíduos). V_L e V_H codificaram na mesma forma de cadeia de polipeptídeo um dímero porque elas não podem formar um fragmento de região variável de filamento único devido ao ligante curto entre elas. Desse modo, um diacorpo termina com dois locais de ligação de antígeno.

[00070] Um anticorpo de filamento único ou fragmento de scFv contém as regiões V_H e V_L de um anticorpo, e essas regiões podem existir em uma cadeia de polipeptídeo única. Em geral, um polipeptídeo de Fv contém ainda um ligante polipeptídeo entre as regiões V_H e V_L , de modo que ScFv é capaz de formar uma estrutura que é necessária para ligação de antígeno (vide Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113 (Rosenburg and Moore ed (Spring Verlag, New York) pp. 269-315, 1994 quanto a observações gerais sobre scFv). Os ligantes da presente invenção não são particularmente limitados, contanto que eles não inibam a expressão das regiões variáveis de anticorpo conectadas a ambas extremidades de um ligante.

[00071] Um anticorpo biespecífico do tipo IgG pode ser secretado por um hidrodoma híbrido (quadroma) formado através de fusão de dois tipos de hibridoma que produzem anticorpos IgG (Milstein, C. e outros, *Nature* 1983, 305:537-540). Ele pode ser também secretado através de introdução em genes de célula das cadeias L e cadeias H que constituem os dois IgGs de interesse (um total de quatro tipos de genes) para coexpressão.

[00072] No entanto, teoricamente, há tantas quantas dez combinações de cadeias H e cadeias L nos IgGs produzidos através desses métodos. É difícil purificar um IgG compreendendo a combinação desejada de cadeias H e L de dez tipos diferentes de IgGs. Ainda, em teoria, a quantidade da combinação de interesse é drasticamente diminuída, e então cultura de célula em grande escala é requerida, levando a um aumento adicional no custo de fabricação.

[00073] Neste caso, ao substituir apropriadamente aminoácido(s) na região CH3 de uma cadeia H, é possível secretar de preferência IgGs que têm uma combinação heteróloga de cadeias H (Ridgway, J.B. e outros. *Protein Engineering*, 1996, 9:617-621, Merchant, A.M. e outros, *Nature Biotechnology*, 1998, 16:677-681).

[00074] Como para as cadeias L, uma região variável de cadeia L é menos diversa comparado com uma região variável de cadeia H; desse modo, a aquisição de uma cadeia L comum que provê atividades de ligação com duas cadeias H pode ser esperada. Expressão eficiente de um IgG biespecífico se torna possível através de introdução dos genes desta cadeia L comum e ambas cadeias H em uma célula para expressão de IgG (*Nature Biotechnology*, 1998, 16, 677-681). No entanto, a possibilidade de dois tipos aleatoriamente selecionados de anticorpos contendo a mesma cadeia L é baixa; desse modo, é difícil pôr a idéia acima mencionada em prática. Com relação a isso, foi proposto um método para seleção de uma cadeia L comum adaptando cadeias H diferentes arbitrárias para mostrar alta habilidade de ligação (WO 2004/065611). Uma cadeia H tendo a variante CH3 descrita acima (*Nature Biotechnology*. 1998, 16, 677-681) é raramente secretada na ausência da outra cadeia H. Ao fazer uso desta característica para primeiro induzir expressão da cadeia L e cadeia H do lado direito e parar a expressão, e então induzir a expressão da cadeia L e cadeia H da esquerda, a proporção de IgGs

expressos na combinação de interesse pode ser aumentada (PCT/JP2004/008585).

[00075] Um anticorpo biespecífico pode ser também preparado através de ligação quimicamente cruzada de Fab's. Um $F(ab')_2$ biespecífico pode ser produzido, por exemplo, através de maleimidação de um Fab' preparado a partir de um anticorpo com o-PDM (orto-fenilenodi-maleimida) e reação do produto com um Fab' preparado a partir de um outro anticorpo, de modo a ligar com cruzamento Fab's derivados de anticorpos diferentes (Keler, T. e outros, *Cancer Research*, 1997, 57:4008-4014). Ainda, um método para conectar quimicamente fragmentos de anticorpo, tal como um Fab'-derivado de ácido tionitrobenzóico (TNF) e Fab'-tiol (SH) é também conhecido (Brennan, M. e outros, *Science*, 1985, 229:81-83).

[00076] Ao invés de ligação com cruzamento, um zíper de leucina derivado de Fos e Jun ou similar pode ser usado. Embora Fos e Jun também formem um homodímero, sua formação de heterodímero preferencial é utilizada. Um Fab' adicionado com um zíper de leucina Fos e um segundo Fab' adicionado com um zíper de leucina Jun são expressos para preparação. Ao misturar e reagir Fab'-Fos e Fab'-Jun monoméricos, que foram reduzidos sob condições suaves, um $F(ab')_2$ biespecífico pode ser formado (Kostelny S.A. e outros, *J. of Immunology*, 1992, 148:1547-53). Este método não é limitado a Fab' pode ser também aplicado a scFv, Fv, etc.

[00077] Um anticorpo biespecífico pode ser também preparado em uma forma de diacorpo. Um diacorpo específico é um heterodímero compreendendo dois fragmentos scFv cruzados. Isto é, um diacorpo específico pode ser preparado através de construção de um heterodímero usando $V_H(A)-V_L(B)$ e $V_H(B)-V_L(A)$, que foram formados através de conexão de V_H e V_L derivadas de dois tipos de anticorpos: A e B, com um ligante relativamente curto de cerca de 5 resíduos de

aminoácido (Holliger, P. e outros, *Proc. of the National Academy of Sciences of the USA*, 1993, 90:6444-6448).

[00078] Neste caso, a construção de um diacorpo biespecífico de interesse pode ser promovida através de realização de substituições de aminoácido apropriadas ("knobs-into-holes": Zhu, Z. e outros, *Protein Science*, 1997, 6:781-788) de modo a ligar dois tipos de scFv's com um ligante flexível e relativamente longo de cerca de 15 resíduos de aminoácido (um diacorpo de cadeia simples: Kipriyanov, S.M. e outros, *J. of Molecular Biology*, 1999, 293:41-56).

[00079] sc(Fv)₂ que pode ser preparado ligando dois tipos de scFv's com um ligante flexível e relativamente longo de cerca de 15 resíduos de aminoácido pode também se tornar um anticorpo biespecífico (Mallender, W.D. e outros, *J. Biological Chemistry*, 1994, 269:199-206).

[00080] Um anticorpo modificado pode ser, por exemplo, um anticorpo que se liga a várias moléculas tal como polietileno glicol (PEG). Nos anticorpos modificados da presente invenção, substâncias a serem ligadas não são limitadas. Tais anticorpos modificados podem ser obtidos quimicamente modificando os anticorpos obtidos. Esses métodos já foram estabelecidos neste campo.

[00081] Os anticorpos da presente invenção incluem anticorpo humano, anticorpo de camundongo, anticorpo de rato e similar, sem qualquer limitação em suas origens, e podem ser anticorpos geneticamente modificados, tal como anticorpo quimera e anticorpo humanizado.

[00082] Métodos para obtenção de anticorpo humanos são conhecidos, e um anticorpo humano de interesse pode ser obtido, por exemplo, através de imunização de um animal transgênico tendo todos os repertórios de genes de anticorpo humano com o antígeno de interesse (vide WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735).

[00083] Anticorpos geneticamente modificados podem ser produzidos através de métodos conhecidos. Especificamente, por exemplo, um anticorpo de quimera compreende regiões variáveis das cadeias H e L de um anticorpo de animais imunizados, e regiões constantes das cadeias H e L de um anticorpo humano. Um anticorpo de quimera pode ser obtido através de ligação de um DNA codificando a região variável de um anticorpo derivado de animais imunizados com um DNA codificando a região constante de um anticorpo humano, inserindo o DNA resultante em um vetor de expressão e introduzindo o vetor recombinante em um hospedeiro para produção.

[00084] Um anticorpo humanizado é um anticorpo modificado também referido como anticorpo humano remoldado. Um anticorpo humanizado é construído através de enxerto da região de determinação de complementariedade (CDR) de um anticorpo derivado de animais imunizados na CDR de um anticorpo humano. Tecnologias de engenharia genética gerais são também conhecidas.

[00085] Especificamente, uma sequência de DNA designada para ligar a CDR de um anticorpo de camundongo à região de estrutura principal (FR) de um anticorpo humano é sintetizada através de PCR, usando vários oligonucleotídeos que foram preparados para conter porções se sobrepondo em suas regiões terminais. Após ligação do DNA obtido a um DNA codificando a região constante de um anticorpo humano, o DNA resultante é incorporado em um vetor de expressão e introduzido em um hospedeiro para produzir um anticorpo humanizado (vide EP 239400 e WO 96/02576). Como uma FR de anticorpo humano a ser ligada via CDR, uma que é capaz de formar um local de ligação de antígeno com uma boa região de determinação de complementariedade é selecionada. Aminoácidos da região de estrutura principal em uma região variável de anticorpo podem ser substituídos conforme necessário, de modo que a região de

determinação de complementariedade do anticorpo humano remoldado forma um local de ligação de antígeno apropriado (Sato, K. e outros, *Cancer Research*, 1993, 53:851-856). A região de estrutura principal pode ser substituída com regiões de estrutura principal derivadas de vários anticorpos humanos (vide WO 99/51743).

[00086] A presente invenção provê anticorpo biespecíficos que funcionalmente substituem cofatores que reconhecem ambos uma enzima e seu substrato.

[00087] Os cofatores da presente invenção não são particularmente limitados, contanto que eles sejam capazes de agir em uma enzima para aumentar a reação enzimática. Um cofator da presente invenção é, por exemplo, um cofator de uma enzima proteolítica. Exemplos específicos de um cofator de uma enzima proteolítica são cofatores para coagulação sanguínea e fatores associados à fibrinólise (sistema F.VIII/F.VIIIa, F.V/F.Va, PZ, TM, TM/OS), cofatores para reações de complemento (fator C4b, MCP, CR1, H) e similar.

[00088] As combinações que seguem podem ser listadas como exemplos específicos de enzima e substrato de enzima, bem como cofatores de enzima:

(a) Cofator para coagulação sanguínea e fator associado à fibrinólise
(Exemplo 1)

Enzima: F.IXa

Substrato: F.X

Cofator: F.VIII/F.VIIIa

[00089] O cofator F.VIIIa se liga a ambos F.IXa e F.X e aumenta a ativação de F.X por F.IXa. Dentre os anticorpos biespecíficos que reconhecem ambos a enzima acima descrita F.IXa e substrato F.X, alguns têm um efeito de aumento sobre a ativação de F.X. Alguns desses anticorpos são imaginados ter um efeito de substituição da função de cofator F.VIII/F.VIIIa.

(b) Cofator para coagulação sanguínea e fator associado à fibrinólise (Exemplo 2)

Enzima: ZPI

Substrato: F.X/F.Xa

Cofator: PZ

[00090] O cofator PZ se liga a ZPI da família serpina e fator X de coagulação sanguínea (F.Xa) para aumentar a atividade de inibição de F.Xa de ZPI. Especificamente, alguns anticorpos biespecíficos que reconhecem ambos ZPI e F.X/F.Xa são imaginados ter um efeito de substituição da função PZ.

(c) Cofator para coagulação sanguínea e fator associado à fibrinólise (Exemplo 3)

Enzima: trombina

Substrato: TAFI

Cofator: TM

[00091] O cofator TM aumenta a ativação de TAFI pela trombina. Especificamente, alguns anticorpos biespecíficos que reconhecem ambos trombina e TAFI são imaginados ter um efeito de substituição para a função TM.

(d) Cofatores para coagulação sanguínea e fator associado à fibrinólise (Exemplo 4)

Enzima: trombina

Substrato: PC

Cofatores: TM/PS

[00092] O sistema TM/PS aumenta a ativação de PC pela trombina. Especificamente, alguns anticorpos biespecíficos que reconhecem ambos trombina e PC são imaginados substituir funcionalmente o sistema TM/PS.

(e) Cofator para coagulação sanguínea e fator associado à fibrinólise (Exemplo 5)

Enzima: F.Xa

Substrato: Pró-trombina

Cofator: F.V/F.Va

[00093] O cofator F.Va se liga a ambos F.Xa e pró-trombina para aumentar a ativação de pró-trombina pelo F.Xa. Dentre os anticorpos biespecíficos que reconhecem ambos a enzima acima descrita F.Xa e seu substrato pró-trombina, alguns têm efeitos de aumento sobre a ativação de pró-trombina. Alguns desses anticorpos são imaginados ter uma função que substitui a função de cofator F.V/F.Va.

(f) Cofator para reação de complemento (Exemplo 1)

Enzima: C1s

Substrato: C2

Cofator: C4b

[00094] C4b tem efeito de promoção de C1s' sobre a decomposição de C2. Especificamente, alguns anticorpos biespecíficos que reconhecem ambos C1s e C2 são imaginados substituir funcionalmente C4b.

(g) Cofatores para reação de complemento (Exemplo 2)

Enzima: Fator de Regulagem de Complemento I

Substrato: C3b

Cofatores: Fator de Regulagem de Complemento H,

Proteína de Cofator de Membrana (MCP), e

Receptor de Complemento 1 (CR1)

[00095] Os Fatores de Regulagem de Complemento H, MCP e CR1 têm o efeito de promoção de Fator de Regulagem de Complemento 1 sobre a degradação de C3b. Especificamente, dentre os anticorpos biespecíficos que reconhecem ambos Fator de Regulagem de Complemento 1 e C3b, alguns são imaginados substituir funcionalmente os Fatores de Regulagem de Complemento H, MCP e CR1.

[00096] Dentre os cofatores acima descritos, F.VIII/F.VIIIa é particularmente preferido. Embora F.VIII/F.VIIIa sofra proteólise limitada pelas enzimas proteolíticas, tal como trombina, contanto que ele tenha atividade de F.VIII/F.VIIIa, sua forma não importa. Ainda, variantes de F.VIII/F.VIIIa e F.VIII/F.VIIa que foram artificialmente modificadas por técnicas de recombinação de gene são também incluídas em F.VIII/F.VIIIa, contanto que elas retenham atividade de cofator F.VIII/F.VIIIa.

[00097] Métodos para obtenção de anticorpos biespecíficos que funcionalmente substituem cofatores da presente invenção não são particularmente limitados, e podem ser obtidos através de quaisquer métodos. Por exemplo, quando da obtenção de um anticorpo biespecífico que funcionalmente substitui a enzima A e substrato B, a enzima A e o substrato B são cada um imunizados para um animal para se obter anticorpo de antienzima A e anticorpo anti-substrato B. Subsequentemente, um anticorpo biespecífico compreendendo as cadeias H e L do anticorpo antienzima A e as cadeias H e L do anticorpo anti-substrato B é produzido. Aqui, é desejável se obter vários tipos de cada um do anticorpo antienzima A e o anticorpo anti-substrato B, de modo que esses anticorpos possam ser de preferência usados para produzir o máximo de combinações de anticorpos biespecíficos possível. Após os anticorpos biespecíficos serem produzidos, os anticorpos com uma atividade que substitui função de cofator são selecionados.

[00098] Os anticorpos contra uma enzima ou um substrato podem ser obtidos através de métodos conhecidos daqueles versados na técnica. Por exemplo, anticorpos podem ser preparados através de imunização de animais com antígenos. Antígenos para imunização de animais são, por exemplo, antígenos completos tendo imunogenicidade e antígenos incompletos (incluindo hapteno) sem imunogenicidade. Na presente

invenção, uma enzima cujo fator pode ser funcionalmente substituído por um anticorpo da presente invenção que age como o cofator, ou um substrato da enzima, é usada como o antígeno acima descrito (imunógeno). Como animais a serem imunizados, por exemplo, camundongo, rato, hamster, porquinho-da-índia, coelho, galinha, macaco *rhesus* e similar podem ser usados. A imunização desses animais com antígenos pode ser realizada através de métodos conhecidos daqueles versados na técnica. Na presente invenção, as regiões variáveis da cadeia L e a cadeia H do anticorpo são de preferência coletadas de animais imunizados ou suas células. Este procedimento pode ser realizado por uma pessoa de habilidade na técnica usando métodos geralmente conhecidos. Animais imunizados com antígeno expressam anticorpos contra o antígeno, especialmente em células do baço. Desse modo, por exemplo, mRNA pode ser preparado a partir de células do baço de um animal imunizado, e regiões variáveis da cadeia L e da cadeia H podem ser recuperadas através de RT-PCR usando iniciadores para as regiões variáveis do animal.

[00099] Especificamente, os animais são imunizados com uma enzima ou um substrato. A enzima e substrato usados como imunógenos podem ser proteínas integrais ou seus peptídeos parciais. Ainda, dependendo das circunstâncias, um antígeno candidato ligado a uma outra molécula para formar um antígeno solúvel, ou seus fragmentos, pode ser usado como um imunógeno para imunização de animais.

[000100] Células do baço são isoladas dos baços de camundongos imunizados e fundidas com células mieloma de camundongo para produzir hibridomas. Após seleção dos hibridomas que se ligam aos respectivos antígenos, regiões variáveis da cadeia L e cadeia H são recuperadas através de RT-PCR, usando, por exemplo, iniciadores correspondendo às regiões variáveis. Iniciadores para CDR,

iniciadores para regiões de estrutura principal que são menos diversificadas do que CDR, ou iniciadores para sequências de sinal ou região constante de cadeia CD1 ou L (CL) podem ser também usados.

[000101] Alternativamente, mRNA é extraído das células do baço de animais imunizados e cDNAs das regiões variáveis da cadeia L e da cadeia H são recuperadas através de RT-PCR, usando iniciadores para vizinhança das regiões variáveis. Ainda, os linfócitos podem ser também imunizados *in vitro*, e usados para construir bibliotecas apresentando scFv ou Fab. As regiões variáveis podem ser obtidas através de concentração e clonagem de um clone de anticorpo de ligação de antígeno através de "panning". Neste caso, avaliação pode ser também realizada usando bibliotecas similares construídas a partir de mRNAs derivados de monócitos do sangue periférico, baço, amígdalas e similar de animais humanos e não-imunizados como materiais.

[000102] As regiões variáveis são então usadas para preparar vetores de expressão de anticorpo. Através de introdução de um vetor de expressão de anticorpo anti-enzima e um vetor de expressão de anticorpo anti-substrato na mesma célula e expressando os anticorpos, um anticorpo biespecífico pode ser obtido.

[000103] Anticorpos que têm uma atividade de substituição de função de cofator podem ser selecionados, por exemplo, através de métodos descritos abaixo.

(1) Em um sistema de reação compreendendo a enzima e o substrato, a seleção é realizada usando elevação da atividade da enzima (habilidade de degradação de substrato) como um índice, onde a elevação da atividade da enzima é um resultado de adição de anticorpo.

(2) Em um sistema para medição ou simulação de funções biológicas cuja enzima, substrato e cofator estão envolvidos em (por exemplo,

um sistema para medição de coagulação do plasma), a seleção é realizada usando atividade de recuperação funcional como um índice, onde a atividade de recuperação funcional é um resultado de adição de anticorpo na ausência do cofator.

[000104] O anticorpo desse modo obtido pode ser purificado para homogeneidade. Separação e purificação do anticorpo podem ser realizadas através de métodos de separação e purificação usados para proteínas gerais. Por exemplo, anticorpos podem ser separados e purificados apropriadamente selecionando e combinando colunas cromatográficas, tal como cromatografia de afinidade, filtro, ultrafiltração, salinização, diálise, eletroforese de gel de poliacrilamida SDS, eletroforese isoeletrica e assim por diante (*Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed. Harlow e David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), mas os métodos não são limitados a eles. Uma coluna usada em cromatografia de afinidade é, por exemplo, coluna de proteína A, coluna de proteína G e similar.

[000105] Por exemplo, quando F.VIII/F.VIIIa é o cofator substituto, isto é, quando a combinação de enzima e substrato são fatores associados à coagulação e fibrinólise F.IXa e F.X, o anticorpo específico da presente invenção tem de preferência uma estrutura compreendendo a região variável de um anticorpo anti-F.IXa e a região variável de um anticorpo anti-F.X.

[000106] Anticorpos biespecíficos da presente invenção que substituem funcionalmente F.VIII/F.VIIIa foram gerados através do método que segue. Os camundongos foram subcutaneamente imunizados com F.IXa ou F.X comercial. Células do baço foram isoladas de baços de camundongos imunizados com um título de anticorpo elevado, e fundidas com células mieloma de camundongo para formar hibridomas. Os hibridomas que se ligam a antígeno F.IXa ou F.X foram selecionados e as regiões variáveis de cadeia L e cadeia

H foram recuperadas através de RT-PCR usando iniciadores para as regiões variáveis. A região variável da cadeia L foi incorporada a vetor de expressão de cadeia L contendo CL, e a região variável de cadeia H foi inserida em um vetor de expressão de cadeia H contendo uma região constante de cadeia H. Ainda, mRNA foi extraído dos baços de camundongos imunizados e cada cDNA das regiões variáveis da cadeia L e cadeia H foi recuperada através de RT-PCR usando iniciadores para a respectiva região variável. Usando essas regiões variáveis, uma biblioteca de fago apresentando scFv foi construída. Clones de anticorpo de ligação de antígeno foram concentrados e clonados através de "panning" e os vetores de expressão de anticorpo foram formados usando a sua região variável. Os vetores de expressão do anticorpo anti-F-IXa (cadeia H, cadeia L) e vetores de expressão de anticorpo anti-F.X (cadeia H, cadeia L) foram introduzidos nas mesmas células para expressão de anticorpo e anticorpos biespecíficos foram obtidos.

[000107] Anticorpos biespecíficos desse modo obtidos foram avaliados quanto a seus efeitos para substituir funcionalmente F.VIII/F.VIIIa (cofatores para ativação de F.X por F-IXa) em um sistema de ensaio compreendendo F.XIa (enzima de ativação de F-IX), F-IX, F.X, um substrato sintético (S-2222) para F-Xa, e fosfolípido. A princípio, como um anticorpo biespecífico tendo atividade para funcionalmente substituir F.VIII/F.VIIIa, anticorpos biespecíficos mostrando atividade mimética de F.VIIIa de 0,1 ou mais neste sistema de ensaio foram selecionados com base nos resultados do ensaio. A atividade mimética de F.VIIIa referida aqui é um valor obtido durante 30 ou 60 minutos através de subtração do valor de mudança de absorvância de um solvente ou sobrenadante de cultura que não expressa o anticorpo do valor de mudança de absorvância de uma solução de anticorpo ou sobrenadante de cultura que expressa o anticorpo.

[000108] Anticorpos biespecíficos selecionados acima ou anticorpos biespecíficos intimamente relacionados com eles foram medidos quanto à sua habilidade em restaurar a coagulação em um sistema de ensaio de tempo de coagulação que usa plasma deficiente em F.VIII humano. Como resultado, anticorpos biespecíficos que são capazes de diminuir o tempo de coagulação conforme comparado com quando não são adicionados foram obtidos. O tempo de coagulação aqui referido é, conforme mostrado no Exemplo 7, o tempo de tromboplastina parcial ativado medido usando plasma deficiente em F.VIII. Dentre esses anticorpos biespecíficos, anticorpos biespecíficos preferidos têm a habilidade em diminuir o tempo de coagulação em 10 segundos ou mais, com mais preferência em 20 segundos ou mais, com mais preferência ainda em 40 segundos ou mais, e com mais preferência em 50 segundos ou mais.

[000109] As CDR3s da cadeia H dos anticorpos da presente invenção não são particularmente limitadas, mas têm especificamente uma região de determinação de complementariedade compreendendo uma sequência de aminoácido descrita em qualquer uma das sequências de CDR3 de cadeia H (SEQ ID NOS: 16, 20, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92 r 96) de XB12, XT04, A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50 e A69 descritas nos exemplos descritos abaixo ou aquelas funcionalmente equivalentes a ela, e a região de determinação de complementariedade compreendendo uma sequência de aminoácido descrita em qualquer uma das sequências de CDR3 da cadeia H (SEQ ID N°: 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200 e 204) em SB04, SB05, SB06, SB07, SB21, SB30, SB34, SB38, SB42, B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB15 e SB27, respectivamente, ou aqueles seus equivalentes funcionais.

[000110] Ainda, um exemplo específico dos anticorpos acima descritos é de preferência combinado a partir de um anticorpo tendo uma região de determinação de complementaridade compreendendo qualquer uma das sequências de aminoácido de CDR da cadeia H de XB12, XT04, A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50 e A69 (SEQ ID NOS: 14-16, 18-20, 58-60, 62-64, 66-68, 70-72, 74-76, 78-80, 82-84, 8688, 90-92 e 94-96) ou uma região de determinação de complementaridade funcionalmente equivalente a ela, e um anticorpo tendo uma região de determinação de complementaridade compreendendo qualquer uma das sequências de aminoácido de CDR da cadeia H (SEQ ID NOS: 22-24, 26-28, 30-32, 34-36, 38-40, 42-44, 46-48, 50-52, 54-56, 98-100, 102-104, 106-108, 110-112, 114-116, 118-120, 122-124, 126-128, 130-132, 134-136, 138-140, 142-144, 146-148, 150-152, 154-156, 158-160, 162-164, 166-168, 170-172, 174-176, 178-180, 182-184, 186-188, 190-192, 194-196, 198-200 e 202-204) em SB04, SB05, SB06, SB07, SB21, SB30, SB34, SB38, SB42, B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB15 e SB27) ou uma região de determinação de complementaridade funcionalmente equivalente a ela.

[000111] Sequências de aminoácido das regiões variáveis da cadeia H de XB12, XT04, A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50, A69, SB04, SB05, SB06, SB07, SB21, SB30, SB34, SB38, SB42, B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB15 e SB27 descritas na presente invenção são mostradas como SEQ ID NOS: 13, 17, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145, 149, 153, 157, 161, 165, 169, 173, 177, 181, 185, 189, 193, 197 e 201.

[000112] As sequências de aminoácido das regiões variáveis da

cadeia L de A44, B26, XB12e SB04 descritas na presente invenção são mostradas como SEQ ID NOs: 205, 209, 213 e 217. As sequências de CDR da cadeia L de A44, B26, XB12 e SB04 são mostradas como SEQ ID NOs: 206-208, 210-212, 214-216 e 218-220. As sequências de nucleotídeo de CDR da cadeia H de XB12, SB04, A44 e B26 são mostradas como SEQ ID NOs: 221 (222), 223 (224), 225 (226), 233 (234), 235 (236), 237 (238), 245 (246), 247 (248), 249 (250), 257 (258), 259 (260) e 261 (262) (sequências em parênteses são sequências de aminoácido codificadas pelos respectivos ácidos nucléicos) e suas sequências de nucleotídeo de CDR de cadeia L são mostradas como SEQ ID NOs: 227 (228), 229 (230), 231 (232), 239 (240), 241 (242), 243 (244), 251 (252), 253 (254), 255 (256), 263 (264), 265 (266) e 267 (268).

[000113] As SEQ ID N^{Os}: 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 228, 234, 240, 246, 252, 258 e 264 representam CDR1.

[000114] As SEQ ID N^{Os}: 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 115, 119, 123, 127, 131, 135, 139, 143, 147, 151, 155, 159, 163, 167, 171, 175, 179, 183, 187, 191, 195, 199, 203, 207, 211, 215, 219, 224, 230, 236, 242, 248, 254, 260 e 266 representam CDR2.

[000115] As SEQ ID N^{Os}: 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 226, 232, 238, 244, 250, 256, 262 e 268 representam CDR3.

[000116] Os anticorpos da presente invenção são, não particularmente limitados, mas de preferência os anticorpos biespecíficos combinados a partir de um anticorpo antifator IXa e um anticorpo antifator X, que têm os mesmos epítomos que os anticorpos acima mencionados ou epítomos intimamente relacionados a eles. Os

anticorpos tendo um mesmo epítopo intimamente relacionado a eles referem-se a, por exemplo, aqueles que competem com um com o outro em ligação de antígeno em ELISA competitivo, etc. Sem ser limitado a ele, neste método ELISA competitivo, fator IX/IXa ou fator X é imobilizado em uma placa Micro Well de 96 cavidades, um anticorpo apropriadamente marcado e um anticorpo a ser avaliado são simultaneamente adicionados, e anticorpo ligado é detectado usando o marcador. Este marcador não é particularmente limitado e inclui marcador de fosfatase alcalina, marcador de peroxidase, enzima de ligação de estreptavidina marcada com biotina (fosfatase alcalina, peroxidase e outras), FIT e similar. Há uma sobreposição de epítopo se pelo menos 50% de competição for observado quando o anticorpo está presente em uma concentração de excesso de até 100.00 vezes de um anticorpo a ser avaliado.

[000117] Quando da preparação de um anticorpo de comprimento completo usando as regiões variáveis descritas na presente invenção, as regiões constantes do anticorpo não são particularmente limitadas, e aquelas conhecidas de um versado na técnica, por exemplo, aquelas descritas em "Sequences of proteins of immunological interest, (1991), U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service National Institutes of Health" e "An efficient route to human bispecific IgG", (1998). "*Nature Biotechnology*, Vol. 16, 677-681", e similar podem ser usados.

[000118] Em uma modalidade dos anticorpos da presente invenção, os anticorpos têm um efeito em funcionalmente substituir cofatores, e são então esperados se tornarem drogas eficazes para doenças causadas por diminuição na atividade (função) desses cofatores. Em casos onde o cofator funcionalmente substituído por um anticorpo da presente invenção é um fator de coagulação sanguínea e fator associado à fibrinólise, as doenças acima descritas são, por exemplo,

hemorragia, doenças acompanhadas de hemorragia, doenças causadas por hemorragia e similar. Em particular, redução e deficiência funcionais em F.VIII/F.VIIIa, F.IX/F.IXa e F.XI/F.XIa eram sabidas causar hemorragia anormal referida como hemofilia.

[000119] Das hemofilias, hemorragia anormal devido à hipofunção congênita de F.VIII/F.VIIIa ou deficiência em F.VIII/F.VIIIa é referida como hemofilia A. Quando um paciente com hemofilia A sangra, terapia de substituição com uma formulação de F.VIII é realizada. Ainda, administração preventiva de uma formulação de F.VIII pode ser realizada (vide Documentos de Não-Patente 1 e 2) no dia de exercício vigoroso em viagem de campo, quando hemorragia intra-articular frequente acontece, ou quando o paciente é classificado como hemofilia severa. Uma vez que essa administração preventiva de formulação de F.VIII reduz acentuadamente os episódios de hemorragia de pacientes com hemofilia A, ela se tornou recentemente popular. A redução de episódios de hemorragia não apenas reduz os riscos de hemorragia letal e não-letal e a agonia acompanhante, mas também previne artropatia hemofílica causada por hemorragia intra-articular frequente. Como resultado, ela contribui bastante para aperfeiçoamento de QOL de pacientes com hemofilia A.

[000120] A meia-vida de uma formulação de F.VIII na corrente sanguínea é tão curta quanto 12 a 16 horas. Desse modo, para prevenção contínua, é necessário administrar uma formulação de F.VIII cerca de três vezes por semana. Isto é equivalente para manter aproximadamente 1% de atividade de F.VIII ou mais (vide Documentos de Não-patente 3 e 4). Também, em terapias de substituição para caso de hemorragia, é necessário administrar periodicamente formulações de F.VIII de reforço por um certo período de tempo, exceto quando a hemorragia é suave, a fim de prevenir nova hemorragia e estabelecer hemostase completa.

[000121] Ainda, as formulações F.VIII são intravenosamente administradas. Há dificuldades técnicas na realização de administração intravenosa, e se torna ainda mais difícil particularmente quando da realização da administração em pacientes jovens cujas veias são finas.

[000122] Na administração preventiva acima descrita de formulação de F.VIII e sua administração de emergência em casos de acontecimento de hemorragia, o tratamento em casa e auto-injeção são usados na maioria dos casos. A necessidade de administração frequente e as dificuldades técnicas envolvidas não apenas inflige dor aos pacientes, mas também se torna uma razão que impede tratamento em casa e auto-injeção de se tornarem populares.

[000123] Desse modo, tem havido fortes demandas para, conforme comparado com formulações de fator VIII de coagulação sanguínea correntes, drogas que tenham intervalos de administração mais longos e drogas que possam ser facilmente administradas.

[000124] Ainda, anticorpos anti-F.VIII que são referidos como inibidores podem ser gerados em pacientes com hemofilia A, particularmente em pacientes com hemofilia A severa. Se um inibidor for gerado, efeitos de formulação de F.VIII se tornam impedidos pelo inibidor. Como resultado, o controle de hemostase se torna muito difícil para pacientes.

[000125] Quando tal paciente inibidor de hemofilia A sangra, terapia de neutralização usando uma dose de massa de formulação de F.VIII, ou terapia de "bypass" usando um concentrado de complexo ou formulação de F.VIIIa, é geralmente realizada. No entanto, na terapia de neutralização, administração de dose de massa de formulação F.VIII pode aumentar de modo adverso o título inibidor (anticorpo anti-F.VIII). Adicionalmente, na terapia de "bypass", as meia-vidas relativamente curtas (cerca de 2 a 8 horas) de concentrados de complexo e da formulação de F.VIIIa estão se tornando problemáticas. Ainda, uma vez

que seus mecanismos de ação são independentes da função de F.VIII/F.VIIIa, isto é, uma função para catalisar a ativação de F.X por F.IXa, mecanismo hemostático pode não funcionar bem e se tornar não-responsivo. Desse modo, em muitos casos de pacientes inibidores de hemofilia A, efeitos hemostáticos suficientes não são obtidos, quando comparado com pacientes não-inibidores de hemofilia A.

[000126] Desse modo, tem havido forte demandas quanto a drogas que sejam não-afetadas pela presença de inibidores e que possam substituir funcionalmente F.VIII/F.VIIIa.

[000127] Em adição à hemofilia e hemofilia adquirida causadas por anticorpo anti-F.VIII, doença de von. Willebrand que é causada por anormalidade funcional ou deficiência de vWF foi conhecida como um distúrbio hemorrágico anormal associado com F.VIII/F.VIIIa. vWF é necessário não apenas para a adesão normal de plaquetas a tecidos subendoteliais em locais de dano de parede sanguínea, mas também para a formação de complexos com F.VIII para manter um nível de F.VIII no plasma normal. Em pacientes com doença de Willebrand, essas funções declinam e anormalidade funcional de hemostase acontece.

[000128] Nas considerações acima descritas, métodos que utilizam anticorpos podem ser considerados para criação de drogas que (i) têm intervalos de administração longos, (ii) são facilmente administradas e (iii) não são afetadas pela presença de inibidores e (iv) podem substituir funcionalmente F.VIII/F.VIIIa de uma maneira dependente de F.VIII/F.VIIIa. Em geral, as meia-vidas de anticorpos em corrente sanguínea são relativamente longas – de vários dias a várias semanas. Ainda, os anticorpos são sabidos migrar para a corrente sanguínea após administração subcutânea. Isto é, drogas de anticorpo em geral satisfazem às necessidades acima descritas de (i) e (ii).

[000129] A presente invenção provê composições farmacêuticas

compreendendo um anticorpo da presente invenção como um ingrediente ativo. Por exemplo, quando um anticorpo da presente invenção é um dos anticorpos que reconhecem ambos F.IX/F.IX e F.X, e podem funcionalmente substituir F.VIIIa, o anticorpo é esperado se tornar um agente farmacêutico (composição farmacêutica) ou droga para prevenção ou tratamento de hemorragia, distúrbios acompanhados por hemorragia ou distúrbios causados por hemorragia. Ainda, quando um anticorpo da presente invenção é um dos anticorpos que reconhecem ambos F.X/F.Xa e pró-trombina e podem funcionalmente substituir F.Va, o anticorpo é esperado se tornar um agente farmacêutico (composição farmacêutica) ou droga para prevenção ou tratamento de hemorragia, distúrbios acompanhados de hemorragia ou distúrbios causados por hemorragia.

[000130] Ao mesmo tempo, é esperado que um anticorpo que se liga a ZPI e F.X e funcionalmente substitui PZ se torne um agente farmacêutico (composição farmacêutica) ou droga com ação antitrombótica, um anticorpo que se liga à trombina e TAFI e funcionalmente substitui TM se torne um agente farmacêutico (composição farmacêutica) ou droga com um efeito de promoção de hemostase e um anticorpo que se liga à trombina e PC e funcionalmente substitui sistema PS/TM se torne um agente farmacêutico (composição farmacêutica) ou droga com um efeito de modulação de coagulação.

[000131] Ainda, uma vez que deficiência de complemento C4 causa lúpus eritematoso sistêmico (SLE), um anticorpo que funcionalmente substitui C4b é esperado se tornar um agente farmacêutico (composição farmacêutica) ou droga com um efeito que suprime a ocorrência de SLE. Uma vez que deficiência de fator H causa infecção supurativa e glomerulonefrite autoimune, um anticorpo que funcionalmente substitui fator H é esperado se tornar um agente farmacêutico (composição farmacêutica) ou droga com um efeito de supressão do início dessas doenças.

[000132] Para formulação de agentes farmacêuticos, composições farmacêuticas compreendendo um anticorpo da presente invenção útil para tratamento ou prevenção como um ingrediente ativo podem ser misturadas com um veículo farmacêuticamente aceitável apropriado, meio e similar que sejam inertes a ela, se necessário. Por exemplo, água estéril ou solução salina fisiológica, estabilizador, excipiente, antioxidante (ácido ascórbico, etc), tampão (ácido fosfórico, ácido cítrico, outros ácidos orgânicos, etc), anti-séptico, tensoativo (PEG, Tween, etc), agente de quelação (EDTA, etc), agente de ligação e similar podem ser citados. As composições farmacêuticas podem também conter outros polipeptídeos de peso molecular baixo, proteínas tal como albumina de soro, gelatina e imunoglobulina, aminoácidos, tal como glicina, glutamina, asparagina, arginina e lisina, açúcares, tal como polissacarídeo e monossacarídeo e carboidratos, e álcoois de açúcar, tal como manitol e sorbitol. Quando da preparação de soluções aquosas para injeção, por exemplo, agentes de solubilização incluem solução salina fisiológica, soluções isotônicas contendo glicose e outros agentes adjuntos, tal como D-sorbitol, D-manose, D-manitol e cloreto de sódio, e podem ser usados em combinação com agentes de solubilização apropriados, tal como álcool (etanol, etc), poliálcool (propileno glicol, PEG, etc) e tensoativo não-iônico (polisorbato 80, HCO-50, etc).

[000133] Ainda, se necessário, os anticorpos da presente invenção podem ser encapsulados em microcápsulas (microcápsulas feitas de hidroximetil celulose, gelatina, poli(metilmetacrilato), etc), ou incluídos em um sistema de aplicação de droga coloidal (lipossoma, microesfera de albumina, microemulsão, nanopartícula e nanocápsula, etc) (vide *Remington's Pharmaceutical Science*, 16ª Edição", Oslo Ed. (1980), etc). Métodos para formulação de drogas de liberação prolongada são também conhecidos, e podem ser aplicados a anticorpos da presente

invenção (Langer e outros, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:267-277 (1981); Langer, *Chemtech.* 12:98-105 (1982); Patente U.S. N°. 3.773.919; Pedido de Patente Europeu No. (EP): 58.481; Sidman e outros, *Biopolymers* 22:547-556 (1983); EP 133.988).

[000134] Anticorpos ou composições farmacêuticas da presente invenção podem ser usados em combinação com fator VIII de coagulação sanguínea. Anticorpos ou composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administrados com fator VIII de coagulação sanguínea simultaneamente ou com algum intervalo entre eles. A administração pode ser realizada em um kit que combine um anticorpo ou uma composição farmacêutica da presente invenção com fator de VIII de coagulação sanguínea. Quando um anticorpo ou composição farmacêutica da presente invenção é usado em combinação com fator VIII de coagulação sanguínea, se desejado, é também possível usar dosagens menores do que quando ele ou ela é usado sozinho.

[000135] Embora a dosagem das composições farmacêuticas da presente invenção seja apropriadamente determinada considerando o tipo de formulação, método de administração, idade e peso do corpo de pacientes, sintomas do paciente, tipo e progresso da doença, etc, e por último pelos médicos, geralmente doses de 0,1 a 2000 mg/dia podem ser divididas em uma a várias administrações para adultos. A dosagem é de preferência 1 a 1000 mg/dia, com mais preferência 5 a 500 mg/dia, e com mais preferência 100 a 300 mg/dia. Embora a dosagem varie de acordo com o peso do corpo e a idade dos pacientes, métodos de administração e similar, uma pessoa de habilidade comum na técnica pode selecionar adequadamente uma dosagem apropriada. De preferência, o período de dosagem é também apropriadamente determinado de acordo com, por exemplo, o processo de cicatrização dos pacientes.

[000136] Ainda, é também possível realizar terapia de gene através de inserção de um gene codificando um anticorpo da presente invenção em vetores de terapia de gene. Como um método de administração separado de administração direta de plasmídeos nus, os genes podem ser administrados embalando-os em lipossomas e similar, ou inserção em vários vetores vivos tal como vetor de retrovírus, vetores de adenovírus, vetores de vírus vaccínia, vetores de pox vírus, vetores de vírus adenoassociado e vetores de HVJ (vide Adolph "Virus Genome Method" CRC Press, Flórida (1996)), ou através de revestimento em contos de veículo tal como partícula de ouro coloidal (WO 93/17706, etc). No entanto, o gene pode ser administrado através de quaisquer métodos, contanto que o anticorpo possa ser expresso *in vivo* para exercer sua ação. De preferência, uma dose suficiente é administrada através de uma via parenteral apropriada, tal como intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intracutânea, tecido intra-adiposo, injeção e infusão intramamária e intramuscular, inalação, método de bombardeamento de partícula induzível por gás (com pistola de elétron e similar) ou via mucosal usando gota nasal. Genes codificando um anticorpo da presente invenção podem ser administrados através de introdução do gene em células sanguíneas, células derivadas de medula óssea e similar, usando transfecção de lipossoma *ex vivo*, método de bombardeamento de partícula (Patente U.S. N°. 4.945.050) ou infecção por vírus, e reintrodução dessas células nos animais. Em terapia de gene, qualquer gene codificando um anticorpo da presente invenção, por exemplo, genes compreendendo sequências de nucleotídeo de CDRs dos XB12, SB04, A44 e B26 acima descritos podem ser usados.

[000137] A presente invenção também provê métodos para prevenção e/ou tratamento de hemorragia, distúrbios acompanhados por hemorragia ou distúrbios causados por hemorragia, compreendendo as etapas de administração de um anticorpo ou composição da

presente invenção. Anticorpos ou composições podem ser administrados, por exemplo, através dos métodos acima mencionados.

[000138] A presente invenção refere-se também ao uso dos anticorpos da presente invenção para fabricação de composições (farmacêuticas) da presente invenção.

[000139] Ainda, a presente invenção provê kits compreendendo pelo menos um anticorpo ou composição da presente invenção para serem usados nos métodos acima descritos. Seringa de vidro, agulha de injeção, meio farmacêuticamente aceitável, algodão, álcool, bandagem, manual de instrução que descreve o uso ou similar podem ser também opcionalmente embalados nos kits.

[000140] Todos os documentos das técnicas anteriores citados no presente pedido foram aqui incorporados a título de referência.

[000141] Abaixo, a presente invenção será especificamente descrita com referência aos Exemplos, mas não deve ser considerada como sendo limitada a eles.

[Exemplo 1] Preparação de anticorpo de não-neutralização contra fator IXa (F.IXa)

1-1. Imunização e preparação de hibridomas

[000142] Oito camundongos BALB/c (machos, 6 semanas de vida quando a imunização foi iniciada (Charles River, Japão)) e cinco camundongos MRL/lpr (machos, 6 semanas de vida quando a imunização foi iniciada (Charles River, Japão)) foram imunizados com fator IXa β humano (Enzyme Research Laboratories, Inc.) conforme descrito abaixo. Como uma imunização inicial fator IXa β (40 μ g/cabeçote) emulsificado com FCA (adjuvante completo de Freund H37 Ra (Difco Laboratories)) foi subcutaneamente administrado. Duas semanas depois, fator r IXa β (40 μ g/cabeçote) emulsificado com FIA (adjuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories)) foi subcutaneamente administrado. Em seguida, três a sete imunizações de reforço

foram realizadas em intervalos de uma semana. Após o título de um anticorpo de plasma contra fator IXa β ter sido confirmado ser elevado através de ELISA (Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima) descrito em 1-2, fator IXa β (40 μ g/cabeçote) diluído em PBS(-) (solução salina tamponada com fosfato livre de íon de cálcio e íon de magnésio) foi intravenosamente administrado como uma imunização final. Três dias após a imunização final, os baços foram excisados dos camundongos. Enquanto uma porção sua era usada no Exemplo 10-2, as células de baço restantes foram fundidas com células mieloma de camundongo P3X63Ag8U.1 (referida como P3U1, ATCC CRL-1597) através de um método padrão usando PEG1500 (Roche Diagnostics). Células fundidas suspensas em meio RPM1640 (Invitrogen) contendo FBS 10% (Invitrogen) (daqui em diante referido como FBS10%/RPMI1640) foram semeadas em uma placa de cultura de 96 cavidades e 1, 2, 3 e 5 dias após a fusão, o meio foi substituído com um meio de seleção de HAT (FBS10%/RPMI1640/HAT2% 50x concentrado (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.)/BM-Condimed H1 5% (Roche Diagnostics) para seletivamente cultivar hibridomas. Usando os sobrenadante coletados no 8º ou 9º dia após a fusão, a atividade de ligação do fator IXa foi medida através de ELISA descrito em 1-2 para selecionar hibridomas tendo atividade de ligação de fator IXa. Subsequentemente, a atividade de neutralização da atividade enzimática do fator IXa foi medida através dos métodos descritos em 1-3 para selecionar hibridomas que não têm atividade de neutralização de fator IXa. Hibridomas foram clonados duas vezes através de reação de diluições limitantes onde uma célula é semeada em cada cavidade de uma placa de cultura de 96 cavidades. Células de colônia simples confirmadas através de observação microscópica foram submetidas a ELISA e ensaio de atividade de neutralização conforme descrito em 1-2 e 1-3 foi realizado para seleção de clone. Asciste contendo o

anticorpo clonado foi preparado através do método descrito em 1-4, e o anticorpo foi purificado a partir do asciste. O anticorpo purificado era incapaz de estender o APTT (tempo de tromboplastina parcial ativado) e isso foi confirmado pelo método descrito em 1-5.

1-2. ELISA de Fator IXa

[000143] Fator IXa β foi diluído para 1 μ g/mL com tampão de revestimento (100 mM de bicarbonato de sódio, pH 9,6, azida de sódio 0,02%) e distribuído em placa Nunc-Immuno (placas Nunc-Immuno® 96 MicroWell® MaxiSorp® (Nalge Nunc International) a 100 μ L/cavidade. Então, a placa foi incubada a 4° C da noite para o dia. Após lavagem da placa com PBS(-) contendo Tween® 20 três vezes, ela fzoí incubada com um tampão de diluente (50 mM de Tris-HCl, pH 8,1, albumina de soro bovino 1%, 1 mM de MgCl₂, NaCl 0,15M, Tween® 0,05%, azida de sódio 0,02%) em temperatura ambiente por 2 horas. Após remoção do tampão, um sobrenadante de cultura de anti-soro de camundongo ou hibridoma diluído em diluente foi adicionado a 100 μ L/cavidade e incubado em temperatura ambiente por 1 hora. Após lavagem da placa três vezes, IgG anticamundongo de cabra marcado com fosfatase alcalina (H+L) (Zymed Laboratories) que tinha sido diluído para 1/2000 com o tampão diluente foi adicionado a 100 μ L/cavidade e incubado em temperatura ambiente por 1 hora. Após lavagem da placa seis vezes, um substrato colorimétrico Blue-Phos® Phosphate Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories) foi adicionado a 100 μ L/cavidade e incubado em temperatura ambiente por 20 minutos. Após adição da Solução de Parada Blue-Phos® (Kirkegaard & Perry Laboratories) (100 μ L/cavidade), absorbância a 595 nm foi medida com uma Leitora de Microplaca Modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories).

1-3. Medição de atividade de neutralização de fator IXa

[000144] Fosfolípídeo (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em água destilada para injeção e ultra-sonificado para preparar uma solução de

fosfolípido (400 µg/mL). Esta solução salina tamponada contendo albumina de soro bovino 0,1% (daqui em diante referida como TBSB) (40 µL), 30 ng/mL de fator IXaβ (Enzyme Research Laboratories) (10 µL), 400 µg/mL de solução de fosfolípido (5 µL), TBSB contendo 100 mM de CaCl₂ e 20 mM de MgCl₂ (5 µL) e sobrenadante de cultura de hibridoma (10 µL) foram misturados em uma placa de 96 cavidades e incubados em temperatura ambiente por 1 hora. A esta solução misturada, 50 µg/mL de fator X (Enzyme Research Laboratories) (20 µL) e 3 U/mL de fator VIIIa (American Diagnostics) (10 µL) foram adicionados e reagidos em temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi parada através da adição de 0,5M de EDTA (10 µL). Após adição de uma solução S-2222 (50 µL; Chromogenix) e incubação em temperatura ambiente por 30 minutos, a absorbância foi medida em comprimento de medição de 405 nm e comprimento de onda de referência de 655 nm em uma Leitora de Microplaca Modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories, Inc).

1-4. Preparação de ascite e purificação de anticorpo

[000145] Ascite dos hibridomas estabelecidos foi produzido de acordo com procedimentos padrão. Isto é, o hibridoma foi cultivado *in vitro* (2×10^6) e transplantado na cavidade peritoneal de um camundongo BALB/c (macho, 5 a 7 semanas de vida no momento que o experimento foi iniciado, Japan Charles River) ou camundongos nus BALB/c (fêmeas, 5 a 6 semanas de vida no momento que o experimento foi iniciado, Japan Charles River e Japan CLEA), que foi intraperitonealmente administrado duas vezes com pristane (2,6,10,14-tetrametilpentadecano, WAKO Pure Chemical Industries) com antecedência. Uma a quatro semanas após o transplante, ascite foi coletado do camundongo com um abdômen inflado.

[000146] O anticorpo foi purificado a partir do ascite usando uma coluna Protein G Sepharose® 4 Fast Flow (Amersham Bioscience). O

asciste foi diluído 2 vezes com um tampão de ligação (acetato de sódio 20 mM, pH 5,0) e aplicado à coluna, que tinha sido lavada com 10 volumes de coluna do tampão de ligação. O anticorpo foi eluído com 5 volumes de coluna de um tampão de eluição (glicina-HCl 0,1M, pH 2,5) e neutralizado com um tampão de neutralização (Tris-HCl 1M, pH 9,0). A solução resultante foi concentrada usando um Centriprep® 10 (Millipore) e o solvente foi substituído com TBS (Tris 50 mM-solução salina tamponada). A concentração de anticorpo foi calculada a partir da absorbância a 280 nm com $A(1\%, 1\text{ cm}) = 13,5$. A absorbância foi medida com DU-650 (Beckman Coulter).

1-5. Medição de APTT (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada)

[000147] APTT foi medido com um KC10A conectado a CR-A (Amelung). Uma mistura da solução de anticorpo diluída em TBSB (50 μL), plasma humano padrão (Dade Behring) (50 μL) e reagente de APTT (Dade Behring) (50 μL) foi aquecida a 37° C por 3 minutos. A esta mistura, 20 mM de CaCl_2 (Dade Behring) (50 μL) foram adicionados para iniciar a reação de coagulação e o tempo de coagulação foi medido.

[Exemplo 2] Preparação de anticorpo de neutralização de não-fator X (F.X)

2-1. Imunização e preparação de hibridoma

[000148] Oito camundongos BALB/c (machos, 6 semanas de vida quando a imunização foi iniciada, Japan Charles River) e cinco camundongos MRL/lpr (machos, 6 semanas de vida quando a imunização foi iniciada, Japan Charles River) foram imunizados com fator X humano (Enzyme Research Laboratories) conforme descrito abaixo. Como uma imunização inicial, o fator X (40 μg /cabeçote) emulsificado com FCA foi subcutaneamente administrado. Duas semanas mais tarde, fator X (20 ou 40 μg /cabeçote) emulsificado com FIA foi subcutaneamente administrado. Subsequentemente, três a seis

imunizações de reforço foram dadas em intervalos de uma semana. Após o título de um anticorpo de plasma contra fator X ser confirmado ser elevado através de ELISA conforme descrito em 2-2, fator X (20 ou 40 µg/cabeçote) diluído em PBS (-) foi administrado intravenosamente como uma imunização final. Três dias após a imunização final, baços de camundongos foram excisados. Embora uma porção deles tenha sido usada no Exemplo 10-2, as células de baço restantes foram fundidas com células P3U1 mieloma de camundongo, de acordo com um método padrão usando PEG1500. Células fundidas suspensas em meio FBS10%/ RPMI1640 foram semeadas em uma placa de cultura de 96 cavidades e os hibridomas foram seletivamente cultivados substituindo o meio com um meio de seleção HAT 1, 2, 3 e 5 dias após a fusão. A atividade ligação com relação ao fator X foi medida através de ELISA descrita em 2-2 usando o sobrenadante de cultura coletado no 8º dia após a fusão. Os hibridomas tendo atividade de ligação de fator X foram selecionados, e suas atividades para neutralizar atividade enzimática de fator Xa foram medidas através do método descrito em 2-3. Os hibridomas que não têm uma atividade de neutralização com relação ao fator Xa foram clonados através de realização de diluição de limitação duas vezes. Asciste contendo o anticorpo clonado foi preparado através do método descrito em 1-4, e o anticorpo foi purificado a partir do asciste. O anticorpo purificado era incapaz de prolongar o APTT e isso foi confirmado pelo método descrito em 1-5.

2-2. ELISA de Fator X

[000149] Fator X foi diluído para 1 µg/mL com um tampão de revestimento e disperso em placa Nunc-Immuno a 100 µL/cavidade. Então a placa foi incubada a 4º C da noite para o dia. Após lavagem da placa com PBS (-) contendo Tween® 20 três vezes, ela foi bloqueada com um tampão diluente em temperatura ambiente por 2

horas. Após remoção do tampão, um sobrenadante de cultura de anti-soro de camundongo ou hibridoma diluído em tampão foi adicionado à placa e incubado em temperatura ambiente por 1 hora. Após lavagem da placa três vezes, IgG anticamundongo de cabra marcado com fosfatase alcalina (H+L) que tinha sido diluído para 1/2000 com o tampão diluente foi adicionado e incubado em temperatura ambiente por 1 hora. Após lavagem da placa seis vezes, um substrato colorimétrico Phosphate Substrate Blue-Phos® (Kirkegaard & Perry Laboratories) foi adicionado a 100 µL/cavidade e incubado em temperatura ambiente por 20 minutos. Após adição de Solução de Parada Blue-Phos® (Kirkegaard & Perry Laboratories) (100 µL/cavidade), absorbância a 595 nm foi medida com uma Leitora de Microplaca Modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories).

2-3. Medição de atividade de neutralização de fator Xa

[000150] Sobrenadante de cultura de hidrodoma diluído para 1/5 com TBSB (10 µL) foi misturado com 40 µL de TBSP (TBSB contendo CaCl_2 2,78 mM e 22,2 µM de fosfolípídeos (fosfatidil colina:fosfatidil serina = 75:25, Sigma-Aldrich) contendo 250 pg/mL de fator Xa (Enzyme Research Laboratories) e incubado em temperatura ambiente por 1 hora. A esta solução misturada, TBSP (50 µL) contendo pró-trombina (Enzyme Research Laboratories) (20 µg/mL) e 100 ng/mL de fator V de coagulação ativado (Fator Va (Haematologic Technologies)) foram adicionados e reagidos em temperatura ambiente por 10 minutos. A reação foi parada através da adição de 0,5M de EDTA (10 µL). A esta solução de reação, solução de S-2238 1 mM (Chromogenix) (50 µL) foi adicionada, e, após incubação em temperatura ambiente por 30 minutos, absorbância a 405 nm foi medida com uma Leitora de Microplaca Modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories).

[Exemplo 3] Construção de vetor de expressão de anticorpo

biespecífico de quimera3-1. Preparação de fragmentos de DNA de codificação de região variável de anticorpo a partir de hibridoma

[000151] A partir dos hibridomas que produzem anticorpo anti-F.IXa ou anticorpo anti-F.X, RNA total foi extraído usando o Qiagen® RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) de acordo com o método descrito no manual de instruções. O RNA total foi dissolvido em água estéril (40 µL). cDNA de filamento simples foi sintetizado através de RT-PCR usando o sistema de síntese de cDNA SuperScript (Invitrogen) com o RNA purificado (1 a 2 µg) como molde, de acordo com o método descrito no manual de instruções.

3-2. Amplificação de PCR de região variável de cadeia H de anticorpo e análise de sequência

[000152] Como iniciadores para amplificação de cDNA de região variável de cadeia H de anticorpo de camundongo (VH), uma mistura de iniciador HB e mistura de iniciador HF descritas no relatório por Krebber e outros (*J. Immunol. Methods*, 1997; 201:35-55) foram preparadas. Usando 0,5 µL de cada um dos 100 µM de iniciador HB e 100 µM de mistura de iniciador HF, uma solução de reação (25 µL) (solução de cDNA preparada em 3-1 (2,5 µL), tampão KOD plus (TOYOBO), dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, polimerase KOD plus (TOYOBO)) foi preparada. Usando um sistema de PCR GeneAmp ciclizador térmico 9700 (Parkin Elmer), PCR foi realizada de acordo com a eficiência de amplificação dos fragmentos de cDNA, ou sob condições A (3 min de aquecimento a 98° C seguido por 32 ciclos de reação (98° C, 20 Seg, 58° C, 20 Seg e 72° C, 30 Seg em um ciclo)) ou condições B (3 min de aquecimento a 94° C seguido por 5 ciclos de reação (94° C, 20 Seg, 46° C, 20 Seg e 68° C, 30 Seg em um ciclo) e 30 ciclos de reação (94° C, 20 Seg, 58° C, 20 Seg e 72° C, 30 Seg em um ciclo)). Após PCR, a solução de reação foi submetida eletroforese

de gel de agarose 1%. Fragmentos amplificados do tamanho desejado (cerca de 400 pb) foram purificados usando um QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) de acordo com os métodos descritos no manual de instrução anexo e eluídos com água estéril (30 µL). Sequências de nucleotídeo dos fragmentos de DNA foram determinadas usando um BigDye Terminator Cyclo Sequencing Kit (Applied Biosystems) em um sequenciador de DNA ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), de acordo com o método descrito no manual de instruções anexo. Grupos de sequência determinados através deste método foram comparativamente analisados usando um software analítico, GENETYX-SV/RC Versão 6.1 (Genetyx) e DNAs com sequências diferentes foram selecionados.

3-3. Preparação de fragmentos de DNA de região variável de anticorpo para clonagem

[000153] O procedimento que segue foi realizado para adicionar locais de clivagem Sfi I de enzima de restrição para clonagem a ambos terminais dos fragmentos de amplificação de região variável de anticorpo.

[000154] Para amplificar os fragmentos de VH adicionados com um local de clivagem Sfi (Sfi I-VH), um iniciador (VH de iniciador - extremidade 5) onde a sequência de ligante HB (Gly₄Ser)₂ do iniciador que foi substituída com uma sequência contendo o sítio de clivagem de Sfi I (SEQ ID N°:5) foi preparado. Usando 0,5 µL de cada um dos 10 µL de VH de iniciador específico de sequência-extremidade 5' e 10 µM de iniciador *scfor* (adiantado) (*J. Immunol. Methods* 1997; 201:35-55), uma solução de reação (20 µL) (solução purificada de fragmento de amplificação de cDNA de VH preparada em 3-2 (1 µL), tampão KOD plus (TOYOBO), 0,2 dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,5 unidade de polimerase de DNA KOD plus (TOYOBO)) foi preparada. Usando um sistema de PCR GeneAmp ciclizador térmico 9700 (Parkin Elmer),

PCR foi realizada de acordo com a eficiência de amplificação dos fragmentos de cDNA, ou sob condições A (3 min de aquecimento a 98° C seguido por 32 ciclos de reação (98° C, 20 Seg, 58° C, 20 Seg e 72° C, 30 Seg em um ciclo)) ou condições B (3 min de aquecimento a 94° C seguido por 5 ciclos de reação (94° C, 20 Seg, 46° C, 20 Seg e 68° C, 30 Seg em um ciclo) e 30 ciclos de reação (94° C, 20 Seg, 58° C, 20 Seg e 72° C, 30 Seg em um ciclo)). Após PCR, a solução de reação foi submetida à eletroforese de gel de agarose 1%. Fragmentos amplificados do tamanho desejado (cerca de 400 pb) foram purificados usando um QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) de acordo com os métodos descritos no manual de instrução anexo e eluídos com água estéril (30 µL).

[000155] Para amplificar os fragmentos de cDNA da região variável da cadeia L de anticorpo de camundongo (VL), 0,5 µL de cada um dos 100 µM de mistura de iniciador LB e 100 µM de mistura de iniciador LF descritas no relatório de Krebber e outros (*J. Immunol. Methods*, 1997; 201:35-55) foi primeiro usado, e a solução de reação (25 µL) (solução de cDNA preparada em 3-1 (2,5 µL), tampão KOD plus (TOYOBO), dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,75 unidade de polimerase de DNA KOD plus (TOYOBO)) foi preparada. Usando um sistema de PCR GeneAmp ciclizador térmico 9700 (Parkin Elmer), PCR foi realizada de acordo com a eficiência de amplificação dos fragmentos de cDNA ou sob condições de 3 minutos de aquecimento a 94° C seguido por 5 ciclos de reação (94°C, 20 Seg, 46°C, 20 Seg e 68° C, 30 Seg em um ciclo)) 30 ciclos de reação (94° C, 20 Seg, 58° C, 20 Seg e 72° C, 30 Seg em um ciclo). Após PCR, a solução de reação foi submetida à eletroforese de gel de agarose 1%. Fragmentos amplificados do tamanho desejado (cerca de 400 pb) foram purificados usando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) através do método descrito no manual de instrução anexo e eluídos com água estéril (30 µL). Os

fragmentos estão em um estado onde a sequência de ligante (Gly4Ser)₃ derivada de iniciador LF é adicionada ao seus terminais C. A fim de adicionar um local de clivagem Sfi I aos terminais C dos fragmentos, um iniciador (iniciador VL-extremidade 3') onde a sequência de ligante (Gly4Ser) de iniciador LF foi substituída com uma sequência tendo local de clivagem Sfi I (SEQ ID N°:6) foi preparado. Para amplificar os fragmentos de VL adicionados com um local de clivagem Sfi I (Sfi I-VL), 0,5 µL de cada um dos 10 µM da mistura de iniciador de VL-extremidade 3' e 10 µM de iniciador *scback* (reverso) foi usado, e uma mistura de reação (20 µL) (solução purificada de fragmento de amplificação de cDNA de VL (1 µL), tampão KOD plus (TOYOBO), dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,5 unidade de polimerase de DNA KOD plus (TOYOBO)) foi preparada. PCR foi realizada usando um sistema de PCR GeneAmp ciclizador térmico 9700 (Parkin Elmer), PCR sob condições de 3 minutos de aquecimento a 94° C seguido por 5 ciclos de reação (94° C, 20 Seg, 46° C, 20 Seg e 68° C, 30 Seg em um ciclo)) e 30 ciclos de reação (94° C, 20 Seg, 58° C, 20 Seg e 72° C, 30 Seg em um ciclo). Após PCR, a solução de reação foi submetida à eletroforese de gel de agarose 1%. Fragmentos amplificados do tamanho desejado (cerca de 400 pb) foram purificados usando um QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) de acordo com os métodos descritos no manual de instrução anexo e eluídos com água estéril (30 µL).

[000156] Os fragmentos de Sfi I-VH e Sfi I-VL purificados foram digeridos com Sfi I (Takara Bio) a 50° C da noite para o dia em uma solução de reação preparada de acordo com o método descrito no manual de instruções anexo. Subsequentemente, a solução de reação foi purificada usando um QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) através do método descrito no manual de instruções anexo e eluído com tampão EB (30 µL) incluído no kit.

3-4. Plasmídeo de expressão de anticorpo IgG biespecífico

[000157] Quando da produção do anticorpo IgG biespecífico de interesse, a técnica de "knobs-into-holes" de IgG1 (Ridgway e outros, *Protein Eng.*, 1996; 9:617-621) foi referida quando da preparação de IgG4 com uma porção CH3 substituída com aminoácido para formar heteromoléculas para cada cadeia H. O tipo a (IgG4 γ a) é substituído com Y349C e T366W e o tipo b (IgG4 γ b) é substituído com E356C, T366S, L368A e Y407V. Ainda, uma substituição (-ppcpScp->-ppcpPcp) foi também introduzida nas regiões impedidas de ambos tipos. Quase todas as cadeias H se tornam heteromoléculas através desta técnica; no entanto, isso não se aplica necessariamente a cadeias L, e a formação de moléculas de anticorpo desnecessárias pode afetar medições de atividade subsequentes. Desse modo, para expressar separadamente os braços de cada molécula de anticorpo (chamada molécula de HL), que têm especificidades diferentes, e formam eficientemente o tipo de anticorpo IgG biespecífico de interesse dentro das células, aqueles que são induzíveis por grupos diferentes foram usados como os vetores de expressão para cada molécula de HL.

[000158] Como um vetor de expressão para um braço da molécula de anticorpo (chamada molécula de HL do braço direito para conveniência), pcDNA4-g4H ou pcDNA4-g4L (Figura 1 ou Figura 2) foi preparado, onde a respectiva região de cadeia H ou cadeia L, isto é, uma região variável de anticorpo de camundongo apropriada (VH ou VL) e uma região constante de IgG4 γ a humano (SEQ ID N°:7) ou região constante κ (SEQ ID N°:8), foi incorporada ao vetor do tipo induzível por tetraciclina pcDNA4 (Invitrogen) a jusante da sequência de sinal (IL3ss) para células animais (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984; 81:1075). Primeiro Eco RV e Not I (Takara Bio) foram usados para digerir pcDNA4 nos locais de clivagem de enzima de restrição

que estão presentes em local de multiclonagem. A unidade de expressão de cadeia H ou cadeia L do braço direito (cerca de 1,6 kb ou cerca de 1,0 kb, respectivamente) de um anticorpo biespecífico de quimera tendo regiões variáveis de anticorpo apropriadas foi digerida com Xho I (Takara Bio). Então, ela foi purificada com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) através do método descrito no manual de instrução anexo e reagida com polimerase de DNA KOD (TOYOBO) a 72° C por 10 minutos em uma composição de solução de reação descrita no manual de instrução anexo para cegar as extremidades. Os fragmentos com extremidade cega foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) através do método descrito no manual de instruções em anexo e digeridos com Not I (Takara Bio). Os fragmentos de extremidade Not I/cega (cerca de 1,6 kb ou 1,0 kb, respectivamente) e o pcDNA4 digerido com Eco RV/Not I foram submetidos a uma reação de ligação usando Ligation High (TOYOBO), de acordo com o método descrito no manual de instruções em anexo. Uma cepa de *E. coli* DH5 α (DH5 α superior competente (TOYOBO)) foi transformada com a solução de reação acima descrita. A partir dos clones resistentes à ampicilina desse modo obtidos, os respectivos DNAs de plasmídeo foram isolados usando o QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

[000159] Como um vetor de expressão para o braço de outras molécula de anticorpo (chamada molécula de HL do braço esquerdo para conveniência), pIND-g4H ou pIND-g4L (Figura 2 ou Figura 3) foi preparado de acordo com o método acima descrito, onde a região da respectiva cadeia H ou cadeia L, isto é, uma região variável de anticorpo de camundongo apropriada (VH ou VL) e uma região constante de IgG4 γ b humano (SEQ ID N°:9) ou região constante κ (SEQ ID N°:8), foi incorporada no vetor pIND do tipo induzível por análogo de ecdisona (Invitrogen) a jusante da sequência de sinal

(IL3ss) para células animais (EMBO. J., 1987; 6:2939) e os respectivos DNAs de plasmídeo foram isolados.

3-5. Construção de vetor de expressão de anticorpo biespecífico

[000160] O plasmídeo de expressão do tipo induzível por tetraciclina preparado em 3-4 (pCDNA4-g4H ou pcDNA4-g4L) foi digerido com Sfi I e foi submetido à eletroforese de gel de agarose 1%. Fragmentos (cerca de 5 kb) sem a parte da região variável de anticorpo intrínseca (VH ou VL (vide Figura 1 ou Figura 2)) foram purificados usando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) através do método descrito no manual de instruções em anexo e eluídos com água estéril (30 µL). Os fragmentos, e o fragmento Sfi I-VH ou Sfi I-VL correspondente derivado de anticorpo anti-F.IXa digerido com Sfi I preparado em 3-3, foram submetidos a uma reação de ligação usando o Quick Ligation Kit (New England Biolabs) de acordo com o método descrito no manual de instruções em anexo. Uma cepa de *E. coli* DH5α (DH5α competente superior (TOYOBO)) foi transformada com a solução de reação acima descrita. Ainda, fragmentos obtidos através de remoção da parte variável do anticorpo através de uma técnica similar conforme acima descrito (VH ou VL (vide Figura 2 ou Figura 33)) do plasmídeo de expressão do tipo induzível por análogo de acdisona digerido com Sfi I (pIND-g4H ou pIND-4GL) preparado em 3-4 e o fragmento de Sfi I-VH ou Sfi I-VL derivado de anticorpo anti-F.X digerido com Sfi I foram incorporados através de um método similar.

[000161] Em cada um dos transformantes resistentes à ampicilina desse modo obtido, a inserção do fragmento de interesse foi confirmada através de método de PCR de colônia usando iniciadores que recheiam o fragmento inserido. Primeiro, para o vetor de expressão de cadeia H ou cadeia L quimérico do anticorpo anti-F.IXa, um iniciador de CMVF de 21-mer (SEQ ID N°:10) que anela para o local de inicialização adiante de CMV a montante do local de inserção

e um iniciador de BGHR de 18-mer (SEQ ID N°:11) que anela para o local de inicialização reverso BGH a jusante do local de inserção foram sintetizados (Sigma Genosys). Para o vetor de expressão de cadeia H ou cadeia L quimérico do anticorpo anti-F.X, um iniciador EcdF de 24-mer (SEQ ID N°:12) que anela para a montante do local de inserção e um iniciador de BGHR de 18-mer (SEQ ID N°:11) que anela para o local de inicialização reversa de BGH a jusante do local de inserção foram sintetizados (Sigma Genosys). Para PCR de colônia, uma solução de reação (20 μ L) (iniciador 0,2 μ L (10 μ M), tampão dash KOD (TOYOBO), dNTPS 0,2 mM e 0,75 unidade de polimerase dash KOD de DNA (TOYOBO)) foi preparada. A esta solução de reação, células da cepa transformante foram adicionadas em quantidades apropriadas e PCR foi realizada. PCR foi transformada usando um sistema de PCR GeneAmp ciclizador térmico 9700 (Parkin Elmer) sob condições de 1 minuto de aquecimento a 96° C seguido por 30 ciclos de reação (96° C, 10 Seg, 55° C, 10 Seg e 72° C, 30 Seg em um ciclo). Após PCR, a solução de reação foi submetida à eletroforese de gel de agarose 1%, e clones dos quais fragmentos de amplificação do tamanho desejado foram obtidos foram selecionados. O produto de PCR foi tratado com um ExoSAP-IT (Amersham Bioscience) para inativar iniciadores e dNTPs em excesso de acordo com o manual de instruções em anexo. Sequências de nucleotídeo dos fragmentos de DNA foram determinadas usando um BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) em um sequenciador de DNA ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), de acordo com o método descrito no manual de instruções em anexo. Grupos de sequência determinados através do presente método foram analisados com um software analítico, GENETYX-SV/RC Versao 6.1 (Genetyx). Para VH, clones de interesse não tendo nenhuma inserção, deleção ou mutação foram selecionados. Para VL, diferente de gene pseudo-VL derivado de P3UI

usado em hibridomas, clones de interesse não tendo nenhuma inserção, deleção ou mutação foram selecionados.

[000162] A partir dos clones de interesse, os respectivos DNAs de plasmídeo foram isolados usando um QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) e então dissolvidos em água estéril (100 µL). Vetor de expressão de cadeia H quimérico de anticorpo anti-F.IXa, vetor de expressão de cadeia L quimérico de anticorpo anti-F.IXa, vetor de expressão de cadeia H quimérico de anticorpo anti-F.X e vetor de expressão de cadeia L quimérico de anticorpo anti-F.X foram chamados pcDNA4-g4IxaHn, pcDNA4-g4IxaLn, pIND-g4XHN e pIND-g4XLn, respectivamente. Cada solução de plasmídeo foi armazenada a 4°C até uso.

[Exemplo 4] Expressão de anticorpos biespecíficos de quimera em células animais

4-1. Preparação de soluções de DNA

[000163] A expressão dos vetores de expressão da molécula de HL do braço direito do anticorpo (pcDNA4-g4IXaHN e pcDNA4-g4IXaLn) é induzida por tetraciclina. Na ausência de tetraciclina, plasmídeo codificando repressor Tet pcDNA6/TR (Invitrogen) é requerido para suprimir completamente suas expressões. Ainda, a expressão dos vetores de expressão da molécula de HL do anticorpo do braço esquerdo (pIND-g4XHN e pIND-g4XLn) foi induzida por um análogo de ecdisona de hormônio de inseto (ponasterona A). Isso requer o plasmídeo pVgRXR (Invitrogen) que codifica o receptor de ecdisona e receptor X de retinóide que reage com ponasterona A e induz expressão. Desse modo, para a transfecção de células animais, uma mistura de seis tipos de DNAs de plasmídeo no total foi preparada. Para 1 mL de cultura celular, pcDNA4-g4IXaHN, pcDNA4-g4IXaLn, pIND-g4XHN e pIND-g4XLn (218,8 ng cada), bem como pcDNA6/TR e pVgRXR (1312,5 ng cada) foram usados.

4-2. Transfecção de células animais

[000164] Cepa HEK293H derivada de célula de carcinoma renal fetal humana (Invitrogen) foi suspensa em um meio de cultura DMEM (Invitrogen) contendo FCS 10% (MOREGATE) e 1 mL do qual foi semeado em uma densidade de célula de 5×10^5 células/mL em cada cavidade de uma placa de 12 cavidades para células adesivas (CORNING) e cultivado em uma incubadora de CO₂ (37°C, CO₂ 5%). A mistura de DNA de plasmídeo preparada em 4-1 foi adicionada a uma mistura de reagentes de transfecção, Lipofectaina 2000 (Invitrogen) (7 µL) e meio Opti-MEM I (Invitrogen) (250 µL) e deixada descansar em temperatura ambiente por 20 minutos. A mistura resultante foi adicionada às células em cada cavidade e incubada por 4 a 5 horas em uma incubadora de CO₂ (37°C, CO₂ 5%).

4-3. Indução de expressão de anticorpo IgG biespecífico

[000165] Meio de cultura foi removido através de sucção da cultura de célula transfectada descrita acima e então 1 mL de um meio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) contendo 1 µg/mL de tetraciclina (Wako Pure Chemical Industries) foi adicionado. A mistura resultante foi incubada por um dia em uma incubadora de CO₂ (37° C, CO₂ 5%) para induzir expressão primária da molécula de HL do braço direito do anticorpo. Subsequentemente, após remoção do meio através de sucção, lavagem com 1 mL de meio CHO-S-SFM-II e adição de 1 mL de um meio CHO-S-SFM-II contendo 5 µM de ponasterona A (Invitrogen), a mistura foi incubada em uma incubadora de CO₂ (37° C, CO₂ 5%) por 2 a 3 dias, e expressão secundária da molécula de HL do braço esquerdo do anticorpo foi induzida de modo que o anticorpo biespecífico IgG foi secretado no meio. O sobrenadante da cultura foi recuperado e centrifugado (cerca de 2000 g, 5 min., temperatura ambiente) para remover as células e concentrado usando Microcon® YM-50 (Millipore), se necessário. A amostra foi armazenada a 4° C até uso.

[Exemplo 5] Quantificação de concentração de IgG humano

[000166] Anticorpo purificado com afinidade de cabra para Fc de IgG humano (Cappel) foi ajustado para 1 µg/mL com um tampão de revestimento e imobilizado para uma placa Nunc-Immuno. Após bloqueio com um tampão diluente (D.B.), uma amostra do sobrenadante da cultura diluída com D.B. foi adicionada. Ainda, como um padrão para cálculo da concentração de anticorpo, IgG4 humano (anticorpo anti-TF humanizado, vide WO 99/51743) diluído com D.B. em uma série de diluição de duas vezes até 11 estágios começando em 1000 ng/mL foi similarmente adicionado. Após três lavagens, fosfatase alcalina de IgG anti-humano de cabra (Biosource International) foi reagida. Após cinco lavagens, a placa teve a cor desenvolvida usando o substrato de fosfatase Sigma 104® (Sigma-Aldrich) como um substrato, e a absorbância a 405 nm foi medida em uma leitora de absorbância Modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories) com um comprimento de onda de referência de 655 nm. Usando o software Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), a concentração de IgG humano no sobrenadante de cultura foi calculada a partir da curva padrão.

[Exemplo 6] Ensaio de atividade mimética de F.VIIIa (fator VIII de coagulação ativado)

[000167] A atividade mimética do F.VIIIa de um anticorpo biespecífico foi avaliada através do ensaio enzimático que segue. As reações que seguem foram todas realizadas em temperatura ambiente. Uma mistura de 40 µL de fator IX (3,75 µg/mL; Enzyme Research Laboratories) e 10 µL da solução do anticorpo foi incubada em uma placa de 96 cavidades por 1 hora. Então, 10 µL de fator XIa (10 ng/mL; Enzyme Research Laboratories), 20 µL de fator X (50 µg/mL; Enzyme Research Laboratories), 5 µL de fosfolípídeo (400 µg/mL; vide Exemplos 1-3) e 15 µL de TBSB contendo 5 mM de CaCl₂ e 1 mM de MgCl₂ (daqui em diante abreviado como TBSB-S) foram

adicionados para iniciar a reação enzimática. Após 30 minutos, a reação foi parada através da adição de 10 µL de 0,5 M de EDTA.

[000168] Após a adição de uma solução de substrato colorimétrico (50 µL) a cada cavidade, absorbância a 405 nm (comprimento de onda de referência 655 nm) a 0 e 30 minutos foi medida com uma Leitora de Microplaca Modelo 3550 (Bio Rad Laboratories). A atividade mimética de F.VIIIa foi apresentada como um valor obtido subtraindo o valor de mudança de absorbância em 30 minutos sem adição de anticorpo daquele com a adição de anticorpo (vide Figura 4 e Figura 5).

[000169] TBSB foi usado como um solvente para fosfolipídeos, enquanto TBSB-S foi usado como um solvente para fator XIa, fator IX e fator X. A solução de substrato colorimétrico era uma mistura 1:1 de substrato colorimétrico "Tesutochimu" S-2222 (Chromogenix) dissolvido de acordo com o manual de instruções em anexo e uma solução de polibreno (0,6 mg/L de brometo de hexadimetrina (Sigma)).

[000170] Ainda, a dependência de concentração de atividade mimética de F.VIIa de XB12/SB04, que era a maior dentre todas, foi medida (Figura 6).

[Exemplo 7] Ensaio de coagulação de plasma

[000171] Para elucidar se um anticorpo específico corrige a habilidade de coagulação de sangue de hemofilia A, efeitos do anticorpo biespecífico sobre tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) foram examinados usando plasma deficiente em F.VIII. Uma solução misturada compreendendo uma solução de anticorpo em várias concentrações (50 µL), plasma deficiente em F.VIII (50 µL; Biomerieux) e reagente de APTT (50 µL; Dade Behring) foi aquecida a 37° C por 3 minutos. A reação de coagulação foi iniciada através da adição de 20 mM de CaCl₂ (50 µL; Dade Behring) à mistura descrita acima. O tempo requerido para coagulação foi medido com KC-10A (Amelung) conectado a CR-A (Amelung) (Figura 7 e Figura 8).

[000172] Ainda, XB12/SB04, que mostrou a atividade de diminuição de tempo de coagulação mais alta, foi medido quanto à sua dependência de concentração (Figura 9).

[Exemplo 8] Purificação de anticorpo

[000173] O sobrenadante de cultura (10 mL) obtido através do método descrito no Exemplo 4 foi concentrado para 1 mL com Centricon® YM-50. A este concentrado, BSA 10% (10 µL), Tween® 20 1% (10 µL) e rProtein A Sepharose® Fast Flow (Amersham Biosciences) (100 µL) foram adicionados, e a solução foi misturada através de rotação a 4° C da noite para o dia. A solução foi transferida para um copo de filtro de 0,22 µm Ultrafree®-MC (Milipore) e após lavagem com TBS contendo Tween® 0,01% (500 µL) três vezes, a resina rProtein A Sepharose® foi suspensa em 100 µL de HCl 10 mM/Tween® 20 (pH 2,0) e deixada descansar por 3 minutos. Então, o anticorpo foi eluído e o eluato foi imediatamente neutralizado com a adição de 5 µL de Tris-HCl 1M, pH 8,0. Usando o software Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), a concentração de IgG humano foi calculada a partir da curva padrão. A concentração de anticorpo foi quantificada de acordo com o Exemplo 5.

[Exemplo 9] Western blotting GST-AP de anticorpo anti-F.X

[000174] Uma proteína de fusão expressando *E. coli* recombinante de peptídeo ativado com F.X (AP) com glutathione S transferase (GST) foi construída. O cDNA cobrindo a região de tradução de comprimento completo de F.X humano foi amplificado com PCR a partir do cDNA Marathon-Ready de fígado humano (Clontech). Este cDNA foi então usado como um molde para amplificar a região codificando a região AP através de PCR (Leytus e outros, *Biochemistry*, 1986; 25:5098), que foi subclonado em um vetor pGEM-T (Promega) para se obter pGEX-F10AP codificando GST-AP. *E. coli* transformada com este plasmídeo foi cultivada, e em OD = 0,8, 1 mM de IPTG foi adicionado

para induzir expressão de GST-AP. Após centrifugação da solução de cultura (3.000x g, 30 min, 4°C), as células foram coletadas e armazenadas a -20°C até uso.

[000175] Após ressuspender o pélete de célula em volume de cultura 1/20 de PBS, 2,4 mL de tampão de amostra de SDS-PAGE (IWAKI) foram adicionados para cada 0,1 mL da suspensão e a mistura resultante foi fervida a 95° C por 5 minutos. Esta solução de reação (10 µL) foi adicionada a cada cavidade de um SDS-PAGE mini gel 14% (Asahi Technoglass) e submetida à eletroforese. O gel após eletroforese foi transferido para uma Immobilon-P® Transfer Membrane (MILLIPORE) usando um *blotter* semi-seco (BIO-RAD) e bloqueado com BT-PBS (PBS contendo BSA 2% e Tween® 20 0,05%). Após o bloqueio estar completo, ele foi reagido por 1 hora com anticorpo SB04 ou SB06 de camundongo anti-F.x purificado no Exemplo 1-4 e diluído com BT-PBS para 2 µg/mL. Após lavagem com PBS contendo Tween® 20 0,05%, a membrana foi reagida por 1 hora com um IgG anticamundongo marcado com fosfatase alcalina (H+L) (Zymed Laboratories) diluído 2000 vezes com BT-PBS. Após lavagem com PBS contendo Tween® 20 0,05%, a membrana teve cor desenvolvida com um substrato colorimétrico, BCIP/NBT Phosphatase Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories) (vide Figura 10).

[Exemplo 10] Obtenção de anticorpo biespecífico a partir de biblioteca de scFv derivada de baço de camundongo imunizado

10-1. Antígeno e imunização

[000176] Três camundongos BALB/c (machos, 6 semanas de vida quando a imunização foi iniciada (Japan Charles River)), 3 camundongos MRL/lpr (machos, 6 semanas de vida quando a imunização foi iniciada (Japan Charles River)) e 3 camundongos C57BL/6N (machos, 6 semanas de vida quando a imunização foi iniciada (Japan Charles River)) foram imunizados com fator IXaβ de antígeno (Enzyme

Research Laboratories, Inc.) ou fator X (Enzyme Research Laboratories, Inc.) conforme descrito abaixo. Como uma imunização inicial, o antígeno (40 µg/cabeçote) emulsificado com FCA (adjuvante completo de Freund H37 Ra; Difco Laboratories)) foi subcutaneamente administrado. Duas semanas mais tarde, o antígeno (40 µg/cabeçote) emulsificado com FIA (Adjuvante incompleto de Freund; Difco Laboratories) foi subcutaneamente administrado. Em seguida, três imunizações de reforço foram dadas em intervalos de uma semana, e 8 dias após a imunização final, os baços foram excisados dos camundongos.

10-2. Construção de biblioteca de fago

[000177] Uma porção dos baços excisados dos camundongos imunizados preparados nos Exemplos 1-1 e 2-1 e os baços excisados dos camundongos imunizados preparados no Exemplo 10-1 foram postos em Reagente Trizol (Invitrogen) (50 mg de baço/ml do reagente) e homogeneizados usando um homogeneizador de vidro. Subsequentemente, RNA total foi extraído de acordo com o método descrito no manual de instruções em anexo. A partir da solução do extrato, poliA(+)RNA foi extraído usando um kit PolyAtract System 1000 (Promega) de acordo com o método descrito no manual de instruções em anexo. CDNA foi sintetizado através de RT-PCR (SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen) e armazenado a -20° C até uso.

[000178] Como iniciadores para amplificação de cDNAs de região variável de cadeia pesada (VH) e região variável de cadeia leve (VL) de anticorpo de camundongo, mistura de iniciador HB, mistura de iniciador HF, mistura de iniciador LB e mistura de iniciador LF que foram usadas nos Exemplos 3-2 e 3-3 foram preparadas. Para amplificação de VH, 50 µL de uma solução de reação (2,5 µL de solução de cDNA, tampão de KOD plus (TOYOBO), 0,2 mM de

dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 3,75 unidades de polimerase de DNA KOD plus (TOYOBO)) foram preparados usando 1 μL de 100 μM de mistura de iniciador HB e 100 μM de mistura de iniciador HF cada. Ainda, para amplificação de VL, 50 μL de uma solução de reação da mesma composição conforme descrito acima foram preparados usando 1 μL de 100 μM de mistura de iniciador LB e 100 μM de mistura de iniciador LF cada. PCR foi realizada usando um sistema de PCR GeneAmp ciclizador térmico 9700 (Perkin Elmer) através de um aquecimento de 3 minutos a 98° C seguido por 32 ciclos de reação (98° C, 20 Seg, 58° C, 20 Seg e 72° C, 30 Seg em um ciclo). Após PCR, a solução de reação foi submetida à eletroforese de gel de agarose 2%. Fragmentos amplificados do tamanho de interesse (cerca de 400 pb) foram purificados usando o QIAquick Gel Extraction KIT (QIAGEN) através do método descrito no manual de instruções em anexo e eluídos com água estéril (50 μL). Em seguida, para amplificação de fragmento de scFv, dez tubos de 100 μL de uma solução de reação (3 μL de solução de fragmento de VH, 3 μL de solução de fragmento de VL, tampão KOD plus (TOYOBO), dNTPS 0,2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, 5 unidades de polimerase de DNA KOD plus (TOYOBO)) foram preparados. Após a 1ª PCR (2 minutos de aquecimento a 94° C seguido por 7 ciclos de reação (94° C, 1 min e 63° C, 4 min em um ciclo)), 10 μM de iniciador *scfor* (adiantado) e 10 μM de iniciador *scback* (reverso) (2,5 μL cada) foram adicionados a cada tubo mantido aquecido a 63° C, e então a 2ª PCR (um aquecimento de 35 Seg e 94° C seguido por 30 ciclos de reação (94° C, 2 min e 63° C, 2 min em um ciclo)) foi realizada. Após PCR, a solução de reação foi purificada usando o kit de purificação de PCR QIAquick (QIAGEN) e os produtos purificados foram digeridos com a enzima de restrição Sfi I (Takara Bio) a 50° C da noite para o dia. Após submeter as digestões à eletroforese de gel de agarose 2%, fragmentos amplificados do tamanho de interesse (cerca de 800 pb)

foram purificados usando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) através do método descrito no manual de instruções em anexo e eluídos com uma quantidade apropriada de água estéril. Para apresentação de scFV em proteína III de gene de fago, pELBGlacl (vide Figura 11) foi usado como um vetor de fagemídeo. Após digestão do vetor (10 µg) com as enzimas de restrição Sfi I (Takara Bio) a 50° C da noite para o dia, fragmentos de clivagem do tamanho de interesse (Cerca de 5 kb) foram purificados usando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) através do método descrito no manual de instruções em anexo e eluídos com uma quantidade apropriada de água estéril. O produto de PCR purificado e o fragmento de vetor purificado foram submetidos a uma reação de ligação a 16° C da noite para o dia, usando Ligation High (TOYOBO) de acordo com o método descrito no manual de instruções em anexo. Células Blue XL1 de *E. coli* eletrocompetentes (Stratagene) ou eletromax DG12s (Invitrogen) foram transformadas usando a solução de reação, através de um método de eletroforação de acordo com o método descrito no manual de instruções em anexo. Todos os transformantes resistentes à ampicilina desse modo obtidos foram coletados e armazenados como a biblioteca recombinante a -20° C até uso.

[000179] A biblioteca de *E. coli* (2×10^9 cfu) foi inoculada em 50 mL de 2x YTAG (2 x TY contendo 100 µg/mL de ampicilina e glicose 2%) e cultivada a 37°C até OD 600 atingir 0,4 a 0,5. 4×10^{11} de fago auxiliar VCSM13 (Stratagene) foram adicionada à cultura, que foi deixada descansar a 37°C por 15 minutos para infecção celular. As células infectadas foram cultivadas a 30° C por 10 horas, seguindo a adição de 450 mL de 2x YTAK (2x TY contendo 100 µg/mL de ampicilina e 25 µg/mL de canamicina) e 25 µL de 1 mol/L de IPTG. O sobrenadante de cultura foi coletado através de centrifugação, misturado com 100 mL de solução de PEG-NaCl (polietileno glicol 8000 10%, 2,5 mol/L de

NaCl) e deixado descansar a 4°C por 60 minutos. Fago foi precipitado através de centrifugação a 10.800 x g por 30 minutos, e o precipitado foi suspenso em 40 mL de água, misturado com 8 mL de solução de PEG-NaCl e deixado descansar a 4°C por 1 hora. O fago foi precipitado através de centrifugação a 10.800 x g por 30 minutos e suspenso em 5 mL de PBS para se obter a biblioteca de fago. O fago foi armazenado a 4° C até uso.

10-3. Concentração de falo ligado através de "panning"

[000180] Fator IXa β ou fator X foi marcado com biotina usando No-Weigh Premeasured NHS-PEO4-Biotin Microtubes (Pierce). O fator IXa β ou fator X marcado com biotina (100 pmol) foi adicionado à solução de biblioteca de fago preparada em 10-2 (600 μ L) e contatado com o antígeno por 60 minutos. Contas Dyna M-280 Streptavidina (600 μ L; DYNAL) lavadas com M-PBS 5% (PBS contendo 5% de leite desnatado p/v) foram adicionadas para ligação por 15 minutos. O fago ligado com conta foi lavado várias vezes com PBST (PBS contendo Tween-20 0,1%; 1 mL) e então com PBS. As contas foram suspensas em 0,8 mL de 0,1 mol/L de glicina/HCl (pH 2,2) por 5 minutos para eluir o fago.

[000181] Alternativamente, a biblioteca de fago (80 μ L/cavidade x 5) que tinha sido incubada com 2,5% p/v de leite desnatado por 15 minutos foi adicionada ao fator IXa β ou fator X (10 μ g/cavidade x 5) imobilizado em uma imunoplaça (MaxiSorp, Nunc) e foi contatada com o antígeno por 60 minutos. O fago ligado a antígeno foi lavado várias vezes com PBST (PBS contendo Tween-20 0,1%; 1 mL) e então com PBS. O fago ligado foi incubado com 0,8 mL de 0,1 mL/L de glicina/HCl (pH 2,2) por 5 minutos para eluir o fago.

[000182] A solução de fago então coletada foi neutralizada através da adição de 2 mol/L de Tris (45 μ L), adicionada a 10 mL de células Blue XL1 em fase de crescimento logarítmica (OD 600 = 0,4 a 0,5) e

deixada descansar por 30 minutos a 37° C para infecção celular. A mistura foi pulverizada em uma placa YTAG 2x e cultivada a 30° C. Colônias foram coletadas, inoculadas em YTAG 2x e cultivadas a 37° C até OD 600 = 0,4 a 0,5. IPTG (1 mol/L; 5 µL) e fago de auxílio VCSM13 (1011 pfu) foram adicionadas à solução de cultura (10 mL) e a mistura foi deixada descansar a 37° C por 30 minutos. As células foram coletadas através de centrifugação, ressuspensas em YTAK 2x (100 mL) e cultivadas a 30° C por 10 horas. O sobrenadante de cultura foi recuperado através de centrifugação, misturado com PEG 5 mol/l 10%-solução de NaCl (20 mL) e deixado descansar a 4°C por 20 minutos. Fago foi precipitado através de centrifugação a 10.800 x g por 30 minutos e suspenso em PBS (2 mL) e provido para "panning" subsequente.

10-4 ELISA de fago

[000183] A colônia simples descrita acima foi inoculada com YTAG 2x (100 µL) e cultivada a 30°C da noite para o dia. Após 5 µL desta cultura serem inoculados em YTAG 2x (500 µL) e cultivados a 37°C por 5 horas, fago de auxílio (2×10^8 pfu) foi adicionado e a cultura foi então deixada descansar a 37°C por 30 minutos. Ainda, após cultivo de 30 minutos com agitação a 37°C, 2 x YTAK contendo 0,5 mM de IPTG (120 µL) foi adicionado. Após uma cultura da noite para o dia a 30°C, o sobrenadante centrifugado foi submetido a ELISA. Para ELISA de clones obtidos através de "panning" de antígenos marcados com biotina, uma placa de microtitulação de 96 cavidades Strepta (Roche) revestida com 1,0 µg/mL de antígeno marcado com biotina foi usada. Ainda, para ELISA de clones obtidos através de "panning" de antígenos nativos, uma imunoplaça (MaxiSorp, Nunc) imobilizada com 1,0 µg/mL de antígeno nativo foi usada. Após lavagem com PBST para remover o antígeno, a reação foi bloqueada com 200 µL de M-PBS 2% ou BSA-PBS 2% (PBS contendo 2% p/v de BSA) como um tampão de

bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente. Após remoção do tampão, o sobrenadante de cultura foi adicionado à placa e deixado descansar por 60 minutos para ligação de fago. Após lavagem, o fago ligado foi detectado com um anticorpo anti-M13 ligado a HRP (Amersham Pharmacia Biotech) e substrato de TMB (Zymed). A reação foi parada através da adição de 1 mol/L de H₂SO₄ e o valor A450 foi medido com uma leitora de placa.

10-5. Determinação de Sequência e seleção de clone

[000184] Usando o meio de cultura 2x YTAG de clone de *E. coli* recombinante positivo para ELISA, sequência de nucleotídeo da região de scFV foi determinada através de amplificação de PCR com os iniciadores PBG3-F1 (5'-CAGCTATGAAATACCTATTGCC – 3'/SEQ ID N°:1) e PBG3-R1 (5'-CTTTTCATAATCAAATCACCGG – 3'/SEQ ID N°:2). Uma solução de PCR de 15 µL compreendendo 1 µL de meio de cultura, 1,5 µL de tampão Dash KOD 10x, 0,2 µL cada um de 10 µmol/L de iniciadores e 0,3 µL de polimerase Dash KOD (TOYOBO, 2,5 U/µL) foi submetida a 30 ciclos de amplificação (96° C, 10 Seg, 55° C, 10 Seg e 72° C, 30 Seg) usando o ciclizador térmico de sistema de PCR GeneAmp 9700 (Perkin Elmer). Após PCR, 3 µL de ExoSAP-IT (Amersham) foram adicionados a 5 µL da solução de reação e a mistura foi mantida a 37° C por 15 minutos e subsequentemente a 80° C por 15 minutos. A reação dessa amostra foi realizada usando o BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) com PBG3-F2 (5'-ATTGCCTACGGCAGCCGCT –3'/SEQ ID N°:3) ou PBG3-2 (5'-AAATCACCGGAACCAGAGCC –3'/SEQ ID N°:4) como iniciador, e os produtos sofreram eletroforese com um Sequenciador de DNA PRISM 3700 Applied Biosystems. Como resultado, clones que têm sequências de aminoácido de CDR3 diferentes previstas a partir das sequências de nucleotídeo foram selecionados para 52 clones como antifator IXa e 33 clones como fator anti-X.

10-6. Construção de vetor de expressão de anticorpo IgG biespecífico

[000185] Para expressar anticorpo scFv como um tipo de IgG, regiões variáveis de anticorpo (VH/ VL) foram clonadas em vetores de expressão do tipo induzível, através de meios similares àqueles mostrados nos Exemplos 3-3, 3-4 e 3-5. Regiões variáveis de anticorpo anti-F.IXa (VH e VL) foram individualmente incorporadas a um vetor do tipo induzível por tetraciclina (pcDNA4-g4H e pcDNA4-g4L, respectivamente). Regiões variáveis de anticorpo anti-F.X (VH e VL) foram individualmente incorporadas a um vetor do tipo induzível por análogo de ecdisona (pIND-g4H e pcDNA4-g4L, respectivamente). A partir dos clones de interesse, os respectivos DNAs de plasmídeo foram isolados usando o QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) e dissolvidos em água estéril (100 µL).

10-7. Expressão de anticorpo específico de quimera em células animais

[000186] Usando a solução de DNA preparada através de meios similares àqueles mostrados no Exemplo 4-1, DNA foi expresso em células animais através de meios similares àqueles mostrados nos Exemplos 4-2 e 4-3 e o sobrenadante da cultura foi coletado. A amostra foi armazenada a 4° C até o uso.

[Exemplo 11] Purificação de anticorpo

[000187] A 10 mL do sobrenadante de cultura obtidos através do método descrito no Exemplo 10-7, 100 µL de rProtein A Sepharose® Fast Flow (Amersham Biosciences) foram adicionados e misturados através de rotação a 4° C da noite para o dia. A solução foi transferida para um copo de filtro de 0,22 µm Ultrafree®-MC (Milipore) e após três lavagens com 500 µL de TBS contendo Tween® 20 0,01% (pH 2,0) a resina rProtein A Sepharose® foi suspensa em 100 µL de HCl 10mM/Tween® 20 0,01% (pH 2,0) e deixada descansar por 3 minutos. Então, o anticorpo foi eluído e o eluato foi imediatamente neutralizado

com a adição de 5 µL de Tris-HCl 1M, pH 8,0. Usando o software Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), a concentração de IgG humano no sobrenadante de cultura foi calculada a partir da curva padrão de IgG4 humano (anticorpo anti-TF humanizado, vide WO 99/51743). A concentração de anticorpo foi quantificada de acordo com o Exemplo 5.

[Exemplo 12] Ensaio de atividade mimética de F.VIIIa (fator VIII de coagulação ativado)

[000188] A atividade mimética do F.VIIIa de um anticorpo biespecífico foi avaliada através do ensaio enzimático que segue. As reações que seguem foram todas realizadas em temperatura ambiente. Uma solução mista de 10 µL de fator IX (15 µg/mL; Enzyme Research Laboratories), 5 µL de TSBS contendo 5 mM de CaCl₂ e 20 mM de MgCl₂ e 50 µL do sobrenadante de cultura obtido através do método descrito no Exemplo 10-7 foi incubada em uma placa de 96 cavidades por 1 hora. Então, 10 µL de fator XIa (10 ng/mL; Enzyme Research Laboratories), 20 µL de fator X (50 µg/mL; Enzyme Research Laboratories) e 5 µL de fosfolipídeo (400 µg/mL) foram adicionados para iniciar a reação enzimática. Após 30 minutos, a reação foi parada através da adição de 10 µL de EDTA 0,5M.

[000189] Após a adição de 50 µL de uma solução de substrato colorimétrico a cada cavidade, absorbância a 405 nm (comprimento de onda de referência 655 nm) a 0 e 30 minutos foi medida com uma Leitora de Microplaca Modelo 3550 (Bio Rad Laboratories). A atividade mimética de F.VIIIa foi apresentada como um valor obtido subtraindo o valor de mudança de absorbância no sobrenadante de cultura não expressando nenhum anticorpo daquele sobrenadante expressando o anticorpo (vide Figura 12).

[000190] TBSB foi usado como um solvente para fosfolipídeo, fator XIa, fator IX e fator X. A solução de substrato colorimétrico era uma

mistura 1:1 de substrato colorimétrico "Tesutochimu" S-2222 (Chromogenix) dissolvido de acordo com o manual de instruções em anexo e uma solução de polibreno (0,6 mg/L de brometo de hexadimetrina (Sigma)).

[Exemplo 13] Ensaio de coagulação de plasma

[000191] Para elucidar se um anticorpo biespecífico preparado de acordo com o método do Exemplo 11 recupera a habilidade de coagulação de sangue de hemofilia A, efeitos do anticorpo sobre tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) usando plasma deficiente em F.VIII foram avaliados através de um método similar àquele mostrado no Exemplo 7 (vide Figura 13). Ainda, A44/B26 e A69/B26, que são altamente eficazes na diminuição do tempo de coagulação, foram medidos quanto à sua dependência de concentração (vide Figuras 14 e 15).

[Exemplo 14] Avaliação do uso concomitante de um anticorpo biespecífico e F.VIII

[000192] Uso concomitante de um anticorpo biespecífico e F.VIII foi avaliado sob as condições de ensaio de coagulação de plasma. Uma mistura de 40 µL de solução de anticorpo (25 µg/mL) e 50 µL de plasma deficiente em F.VIII (Biomerieux) foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. A esta mistura, 10 µL da formulação de fator VIII de coagulação sanguínea recombinante Kogenate® FS (BAYER) e 50 µL de reagentes de APTT (Dade Behring) foram adicionados e aquecidos a 37° C por 3 minutos. A reação de coagulação foi iniciada através da adição de 50 µL de 20 mM de CaCl₂ (Dade Behring). O tempo requerido para coagulação foi medido usando KC10A conectado a CR-A (Amelung) (Vide Figura 16).

[Exemplo 15] Efeitos de anticorpo IgG biespecífico em plasma inibidor

[000193] Efeitos de um anticorpo IgG biespecífico no plasma inibidor foram avaliados sob as condições de ensaio de coagulação de plasma

que seguem. Uma mistura de 50 μ L de plasma deficiente em F.VIII (Biomerieux) e 10 μ L de anticorpo de neutralização de F.VIII anti-humano (100 μ g/mL; Número de Catálogo: MAB3440, (CHEMICON) foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Este plasma foi usado como plasma inibidor. A este plasma inibidor, 40 μ L da solução de anticorpo (25 μ g/mL) e 50 μ L de reagente de APTT (Dade Behring) foram adicionados e aquecidos a 37° C por 3 minutos. A reação de coagulação foi iniciada através da adição de 50 μ L de CaCl_2 20 mM (Dade Behring) à mistura. O tempo requerido para coagulação foi medido usando KC10A (Amelung) conectado a CR-A (Amelung) (Vide Figura 17).

[Exemplo 16] Anticorpo biespecíficos humanizado

[000194] Dentre os anticorpos biespecíficos obtidos nos Exemplos 1 a 7, XB12 (anticorpo antifator IXa de camundongo)/SB04 (anticorpo antifator X de camundongo), que era o mais eficaz na diminuição do tempo de coagulação sanguínea, foi submetido à humanização como segue.

16-1. Pesquisa de homologia de anticorpos humanos

[000195] O banco de dados foi construído com base em dados de sequência de aminoácido de anticorpos humanos obtidos do Banco de Dados Kabat (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/>) e Banco de Dados IMGt (<http://imgt.cines.fr>) publicamente disponíveis, e pesquisa de homologia foi realizada separadamente para a região variável de cadeia H de XB12-H de camundongo, região variável de cadeia de XB12-L de camundongo, região variável de cadeia SB04-H de camundongo e região variável de cadeia L de SB04 de camundongos. Os resultados confirmaram que elas têm altas homologias com as sequências de anticorpo humanas mostradas abaixo, e foi então decidido que elas seriam usadas como a região de estrutura principal (daqui em diante referida como FR) de anticorpos humanizados.

(1) Região variável de cadeia de XB12-H: KABATID-020619 (Banco de Dados Kabat) (Marette e outros, *Arthritis Rheum.*, 1993; 36:1315-1324)

(2) Região variável de cadeia XB12-L: No. de acesso EMBL X61642 (Banco de Dados IMGT) (Mark e outros, *J. Mol. Biol.*, 1991; 222; 581-597)

(3) Região variável de cadeia SB04-H: KABATID-025255 (Banco de Dados Kabat) (Damaison e outros, *Immunogenetics*, 1995; 42:342-352)

(4) Região variável de cadeia SB04-L: No. de Acesso EMBL AB064111 (Banco de Dados IMGT) (Dados não-publicados) [000196] Para preparação de anticorpos humanizados, as regiões de determinação de complementariedade (daqui em diante referidas como CDR) de cada anticorpo de camundongo foram enxertadas nas FRs de anticorpos humanos (1)-(4).

[000197] Também, o web site em NCBI publicamente disponível (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) foi usado para pesquisar sequências de sinal secretórias de anticorpo humano que são altamente homólogas para anticorpos humanos (1)-(4). As sequências de sinal secretórias que seguem foram obtidas através de pesquisa de homologia foram usadas.

(1) Região variável de cadeia XB12-H: No. de Acesso no GenBank AF062120

(2) Região variável de cadeia XB12-H: No. de Acesso no GenBank M74019

(3) Região variável de cadeia SB04-H: No. de Acesso no GenBank BC019337

(4) Região variável de cadeia SB-04: No. de Acesso no GenBank AY204756

1-6. Construção de vetor de expressão de gene de anticorpo

humanizado

[000198] Doze oligonucleotídeos sintéticos de cerca de 50 bases foram preparados a partir de uma sequência de nucleotídeo codificando a sequência de aminoácido da sequência de sinal secretória para a região variável de anticorpo, de modo que cerca de 20 bases de seu terminal 3' hibridizam uma com a outra. Ainda, um iniciador hibridizando para o terminal 5' de um gene de região variável de anticorpo e tendo a sequência de clivagem XhoI e um iniciador hibridizando para o terminal 3' de uma região variável de anticorpo e tendo a sequência de clivagem Sfi I foram preparados.

[000199] Os oligonucleotídeos sintéticos preparados (2,5 μ M, 1 μ L cada) foram misturados, e tampão 1x TaKaRa Ex Taq, 0,4 mM dNTPS e 0,5 unidade de TaKaRa Ex Taq (todos da Takara Shuzo) foram adicionados para perfazer 48 μ L de uma solução de reação. Após aquecer a mistura a 94° C por 5 minutos, 2 ciclos de reação (94° C, 2 min, 55° C, 2 min e 72°C, 2 min) foram realizados para montar e alongar cada um dos oligo DNAs sintéticos. Em seguida, um iniciador hibridizando para o terminal 5' e um iniciador hibridizando para o terminal 3' do gene de anticorpo foram adicionados (10 μ M, 1 μ L cada) e os genes de região variável de anticorpo foram amplificados por 35 ciclos de reação (94°C, 30 Seg, 55°C, 30 Seg e 72°C, 1 min) e uma reação de 5 minutos a 75° C. Após PCR, a solução de reação como um todo foi submetida à eletroforese de gel de agarose 1%. Os fragmentos amplificados do tamanho esperado (cerca de 400 pb) foram purificados com um QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) através do método descrito no manual de instruções anexo e eluídos com água estéril (30 μ L). Os fragmentos foram clonados usando o pGEM-T Easy Vector System (Promega) através do método descrito no manual de instruções anexo. Sequências de nucleosídeo dos fragmentos de DNA foram determinadas usando o BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) em ABI

PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems) de acordo com o método descrito no manual de instruções anexo.

[000200] Após digestão de um plasmídeo confirmada compreender a sequência de gene de região variável de anticorpo humanizado correta com XhoI e SfiI, a solução de reação foi submetida à eletroforese de gel de agarose 1%. Fragmentos de DNA do tamanho esperado (cerca de 400 pb) foram purificados usando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) através do método descrito no manual de instruções anexo e eluídos com água estéril (30 µL). Ainda, após digestão dos plasmídeos de expressão do tipo induzível por tetraciclina (pcDNA4-g4H, pcDNA4-g4L) e plasmídeos de expressão do tipo induzível por análogo de ecdisona (pIND-g4H, pIND-g4L) preparados no Exemplo 3-4 com XhoI e SfiI, fragmentos compreendendo a região constante de anticorpo (cerca de 5 kb) foram purificados usando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) através do método descrito no manual de instruções anexo e eluídos com água estéril (30 µL). O fragmento do gene de anticorpo XB12 humanizado (região variável de cadeia H (daqui em diante VH) ou região variável de cadeia L (daqui em diante VL)) digerido com XhoI e SfiI e o plasmídeo de expressão do tipo induzível por tetraciclina (pcDNA4-g4H, pcDNA4-g4L) digerido com XhoI e SfiI foram submetidos a uma reação de ligação usando o Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics) através do método descrito no manual de instruções anexo. Ainda, o fragmento de gene de anticorpo SB04 humanizado digerido com XhoI e SfiI (região variável de cadeia H ou região variável de cadeia L) e o plasmídeo de expressão do tipo induzível por ecdisona digerido com XhoI e SfiI (pIND-g4H, pIND-g4L) foram submetidos a uma reação de ligação usando o Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics) através do método descrito no manual de instruções anexo. Uma porção de cada uma das misturas de reação foi usada para transformar a cepa DH5α de *E. coli* (TOYOBO).

16-3. Preparação de anticorpo biespecífico humanizado

[000201] Os genes foram transfectados e expressos em HEK293H através dos métodos descritos nos Exemplo 4-2 e 4-3 usando quatro tipos de vetores de expressão de anticorpo humanizados, bem como pcDNA6/TR e pVgRXR. Ainda, purificação de anticorpo e concentração de quantificação de anticorpo foram conduzidas através de métodos conhecidos nos Exemplos 8 e 5.

16-4. Avaliação da atividade de anticorpo biespecífico humanizado e modificação de sequência de anticorpo

[000202] Para avaliar a habilidade de coagulação de plasma dos anticorpos biespecíficos humanizados então preparados e anticorpo biespecífico de quimera XB12/SB04, efeitos dos anticorpos sobre APTT foram examinados usando plasma deficiente em F.VIII. Aminoácidos de FR do anticorpo humano foram modificados para aumentar as atividades de anticorpos biespecíficos humanizados cuja capacidade de coagulação foi reduzida. Ainda, os resíduos de cisteína na CDR3 da VH do anticorpo XB12 foram modificados para alanina com preocupação da possível queda em sua termoestabilidade. Especificamente, mutações foram introduzidas no vetor de expressão de anticorpo humanizado usando o QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) através do método descrito no manual de instrução anexo. Repetindo a modificação do aminoácido da sequência FR e avaliação da habilidade de coagulação sanguínea, um anticorpo biespecífico humanizado (anticorpo XB12 humanizado (VH:hXB12f-A, VL:hXBVL)/anticorpo SB04 humanizado (VH:hSB04e, VL:hSBVL-F3f)) foi obtido (Figura 18).

Aplicabilidade Industrial

[000203] A presente invenção provê anticorpos biespecíficos que reconhecem ambos uma enzima e seu substrato, e que funcionalmente substituem um cofator que aumenta a atividade enzimática.

[000204] Os anticorpos biespecíficos de acordo com a presente invenção são imaginados ter alta estabilidade em sangue e baixa antigenicidade. Desse modo, é bastante esperado que eles se tornem agentes farmacêuticos.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo reconhecendo ambos uma enzima proteolítica e um substrato do mesmo, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é um anticorpo biespecífico capaz de agir como um cofator que aumenta a reação enzimática, em que a enzima é o fator IX de coagulação sanguínea e/ou o fator IX de coagulação sanguínea ativado; o substrato é o fator X de coagulação sanguínea; e o cofator é o fator VIII de coagulação sanguínea e/ou o fator VIII de coagulação sanguínea ativado, e em que o referido anticorpo consiste em regiões de determinação de complementariedade (CDRs) consistindo em:

(A) as sequências de aminoácidos de CDRs da cadeia H do anticorpo anti-fator de coagulação sanguínea IX/IXa consistindo em de (a1) ou (a2) e CDRs da cadeia L consistindo nos seguintes (c1) ou (c2); e

(B) as sequências de aminoácidos das CDRs da cadeia H do anticorpo anti-fator de coagulação sanguínea X consistindo em qualquer um dos seguintes (b1) a (b9) e as CDRs da cadeia L consistindo no seguinte (d1) ou (d2):

(a1) sequências de aminoácido da CDR 1, 2 e 3 da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 14, 15 e 16, respectivamente;

(a2) sequências de aminoácido da CDR 1, 2 e 3 da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 18, 19 e 20, respectivamente;

(b1) sequências de aminoácido da CDR 1, 2 e 3 da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 22, 23 e 24, respectivamente;

(b2) sequências de aminoácido da CDR 1, 2 e 3 da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 26, 27 e 28, respectivamente;

(b3) sequências de aminoácido da CDR 1, 2 e 3 da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 30, 31 e 32, respectivamente;

(b4) sequências de aminoácido da CDR 1, 2 e 3 da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 34, 35 e 36, respectivamente;

(b5) sequências de aminoácido da CDR 1, 2 e 3 da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 38, 39 e 40, respectivamente;

(b6) sequências de aminoácido da CDR 1, 2 e 3 da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 42, 43 e 44, respectivamente;

(b7) sequências de aminoácido da CDR 1, 2 e 3 da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 46, 47 e 48, respectivamente;

(b8) sequências de aminoácido da CDR 1, 2 e 3 da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 50, 51 e 52, respectivamente;

(b9) sequências de aminoácido da CDR 1, 2 e 3 da cadeia H descritas nas SEQ ID N^{os}: 54, 55 e 56, respectivamente;

(c1) sequências de aminoácidos de CDR 1, 2 e 3 da cadeia L descritas em SEQ ID NOs: 206, 207 e 208, respectivamente;

(c2) sequências de aminoácidos de CDR 1, 2 e 3 da cadeia L descritas em SEQ ID NOs: 214, 215 e 216, respectivamente;

(d1) sequências de aminoácidos de CDR 1, 2 e 3 da cadeia L descritas em SEQ ID NOs: 210, 211 e 212, respectivamente;

(d2) sequências de aminoácidos de CDR 1, 2 e 3 da cadeia L descritas em SEQ ID NOs: 218, 219 e 220, respectivamente.

2. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo como definido na reivindicação 1, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

3. Uso do anticorpo como definido na reivindicação 1, ou da composição como definida na reivindicação 2, caracterizado pelo fato de ser para preparação da composição farmacêutica para prevenção e/ou tratamento de hemorragia, o distúrbio acompanhado de hemorragia ou distúrbio causado por hemorragia.

4. Uso do anticorpo como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para preparação da composição, como definida na reivindicação 2.

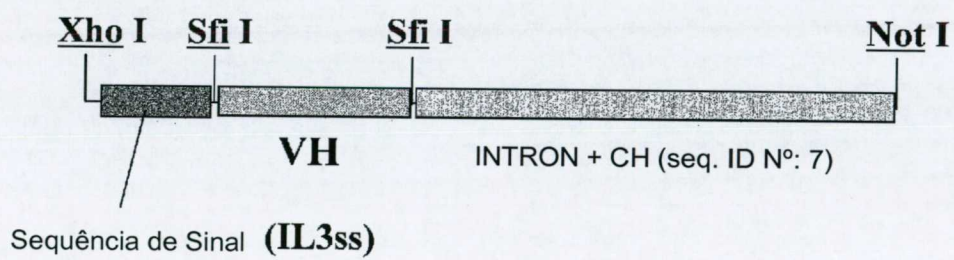
Fig.1

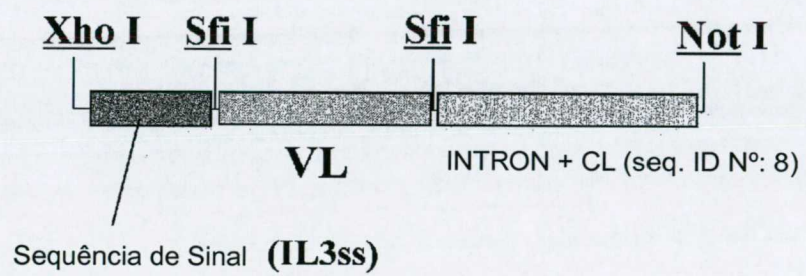
Fig.2

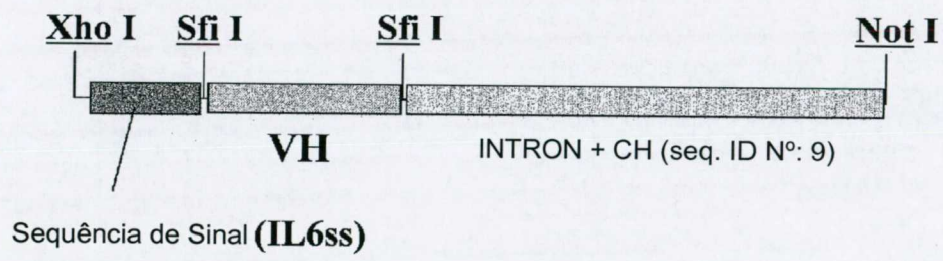
Fig.3

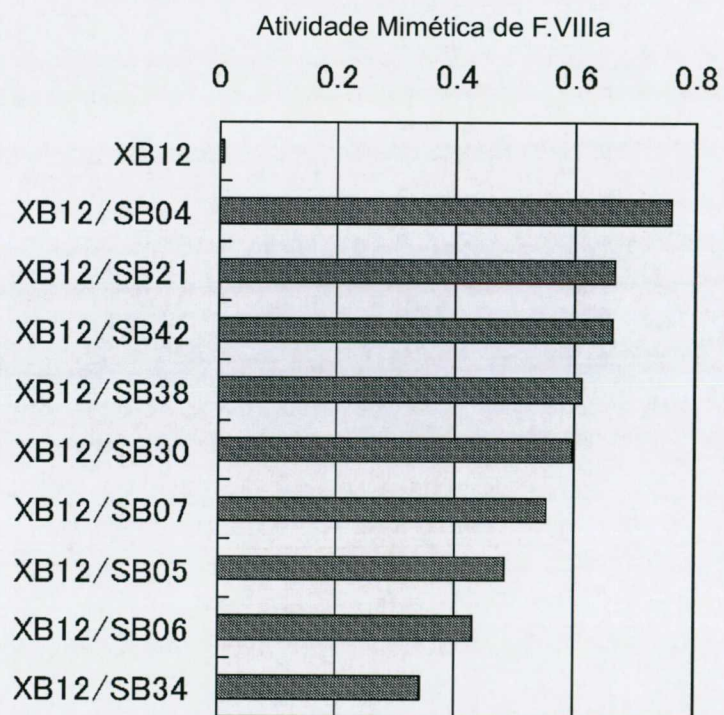
Fig.4

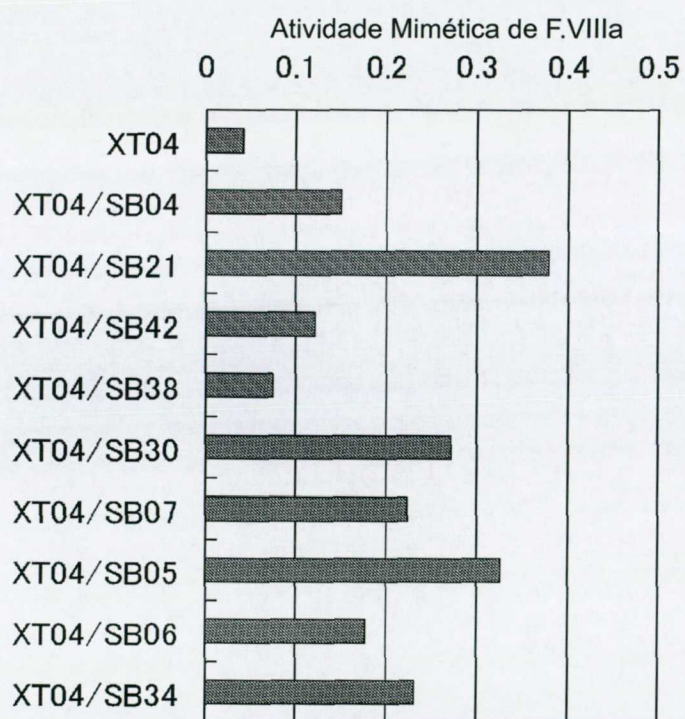
Fig.5

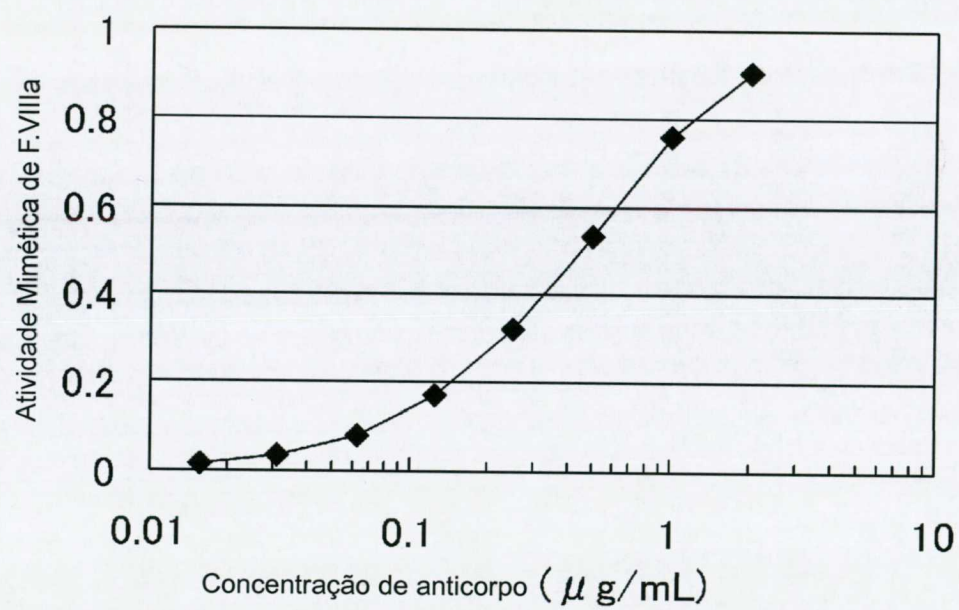
Fig.6

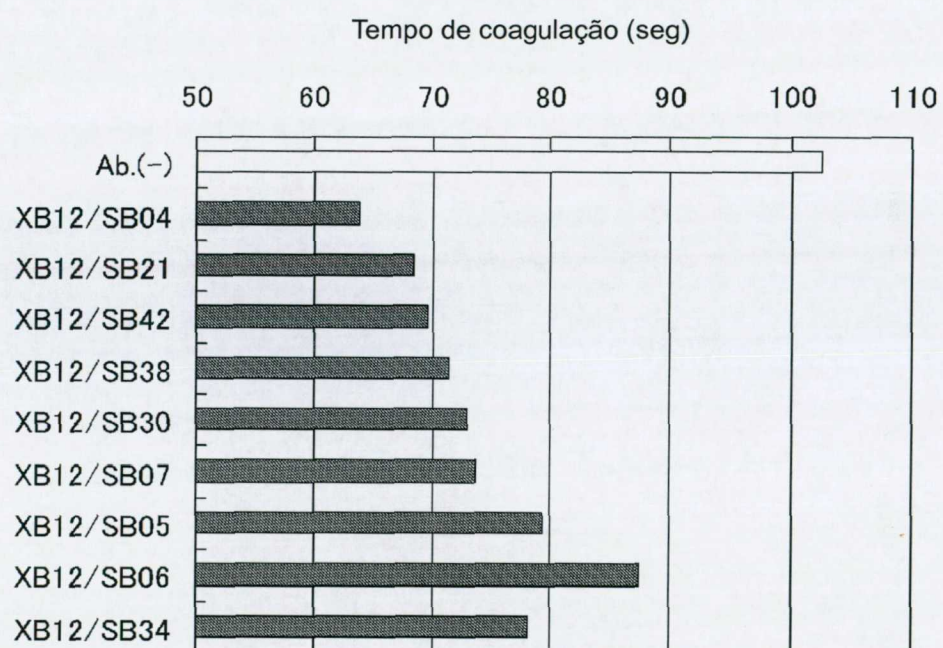
Fig.7

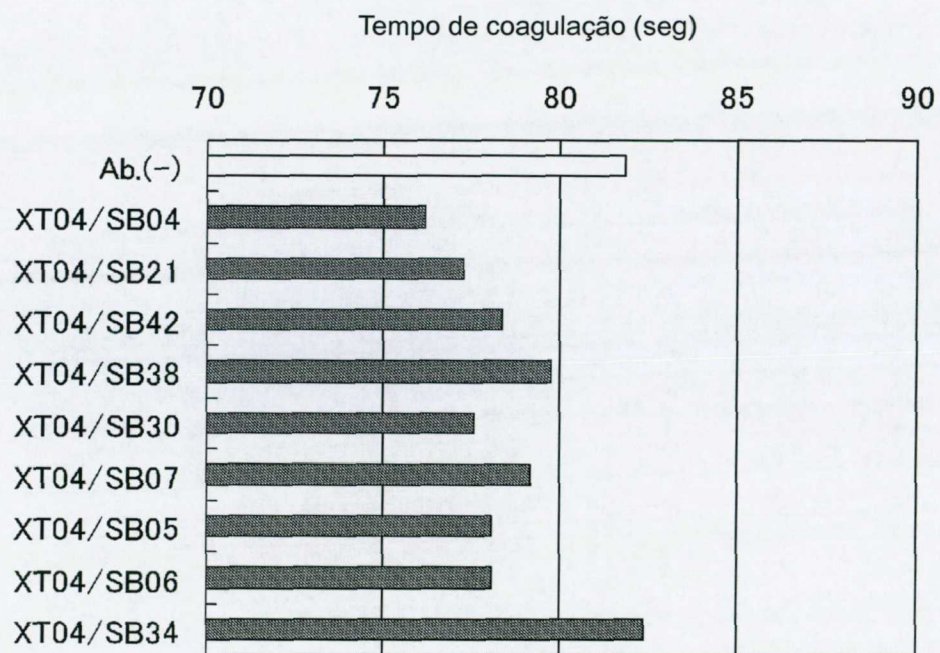
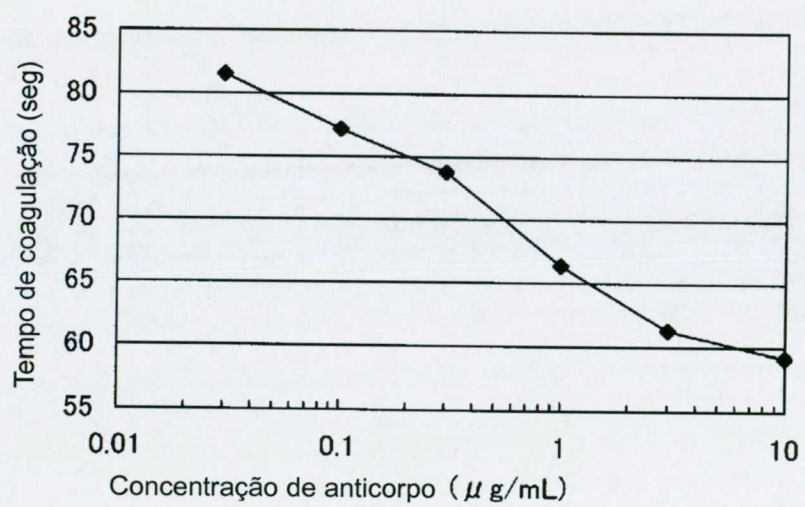
Fig.8

Fig.9

10/18

175

Fig.10

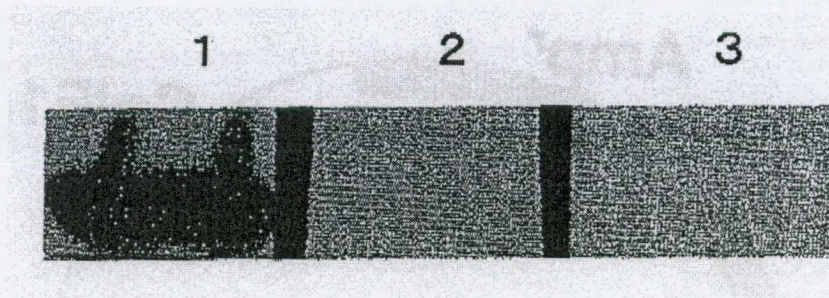


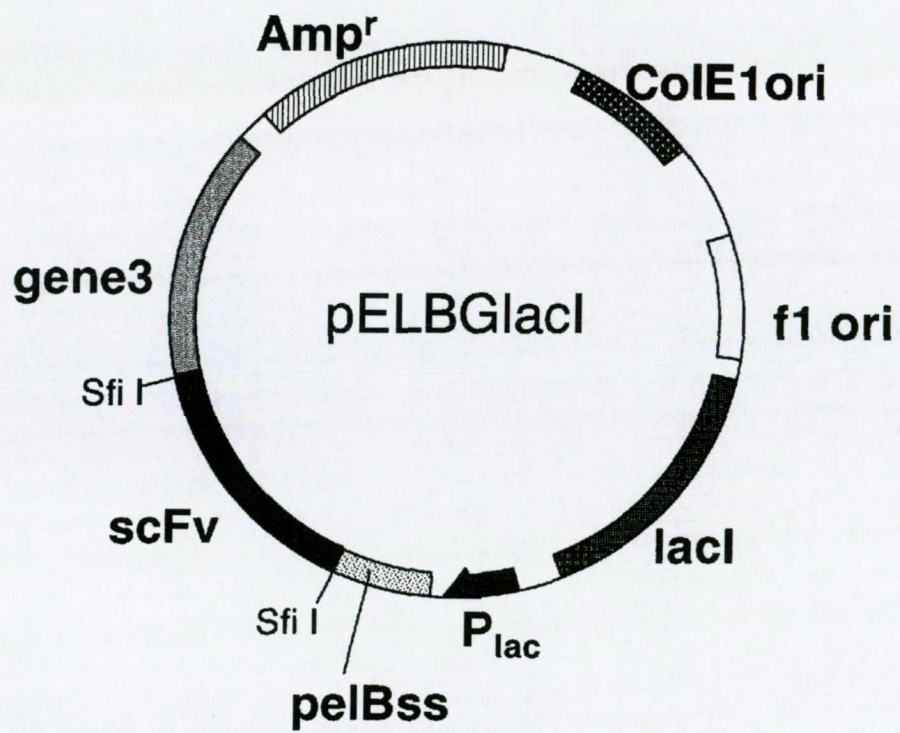
Fig.11

Fig.12

[illegible]

Fig. 13

[illegible]

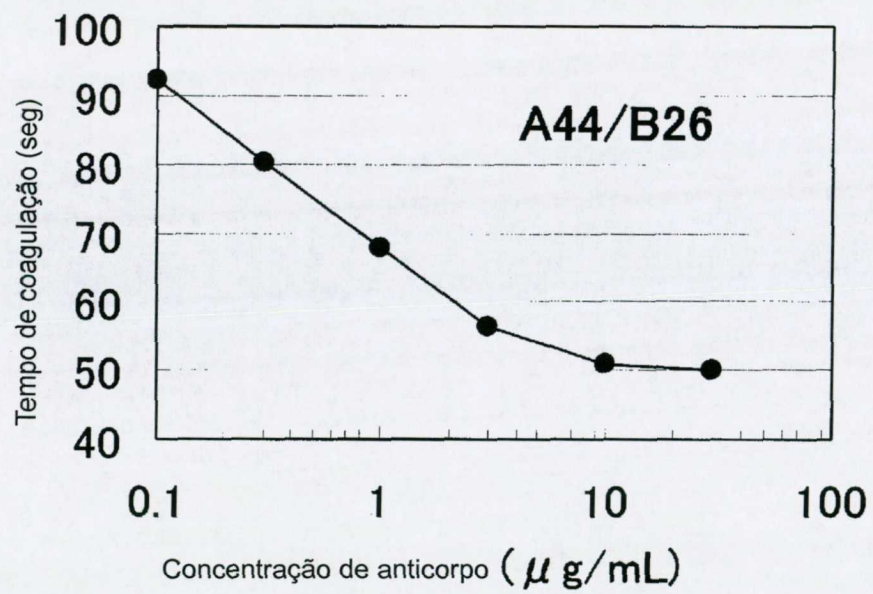
Fig.14

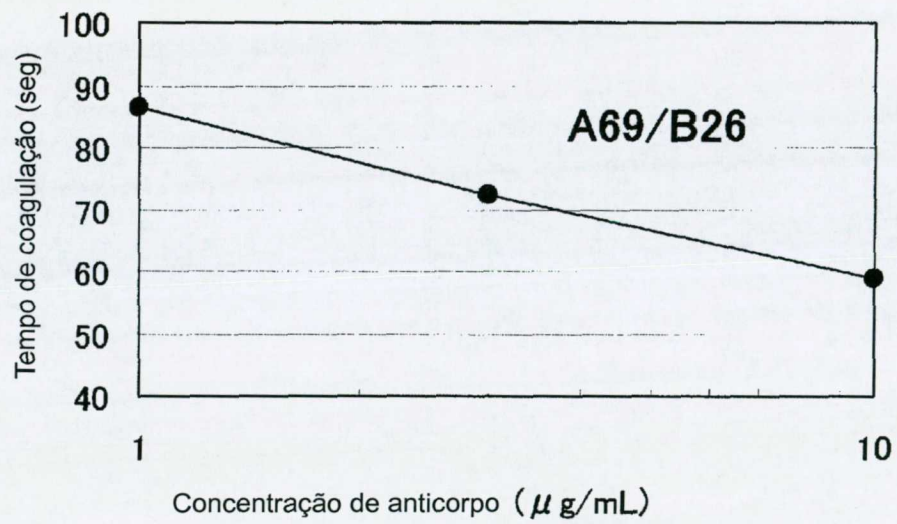
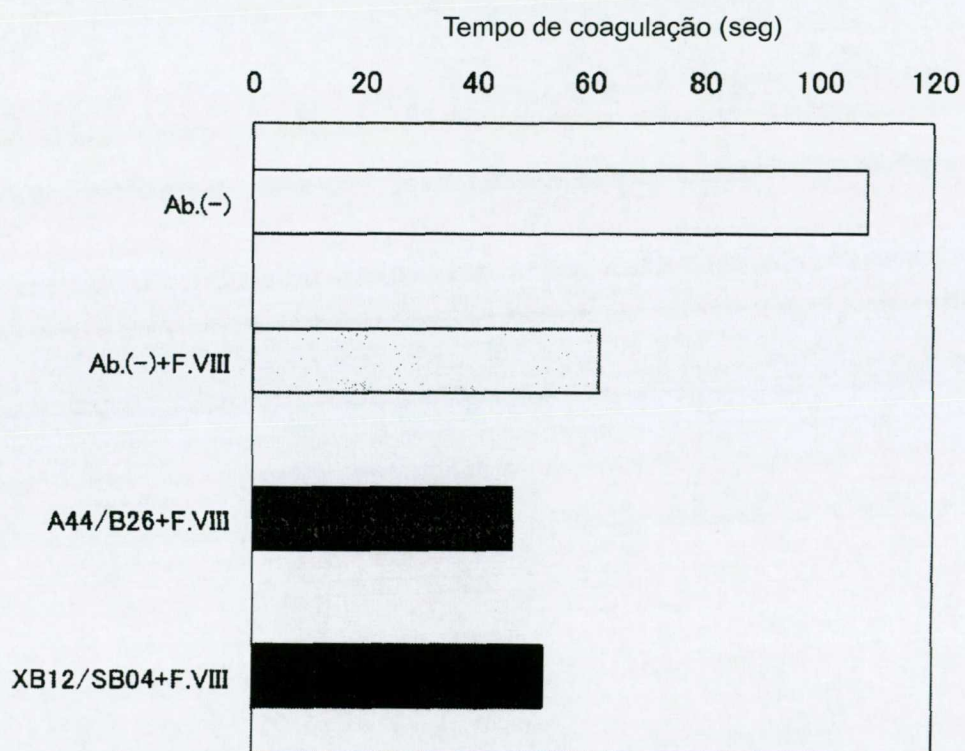
Fig.15

Fig.16

17/18

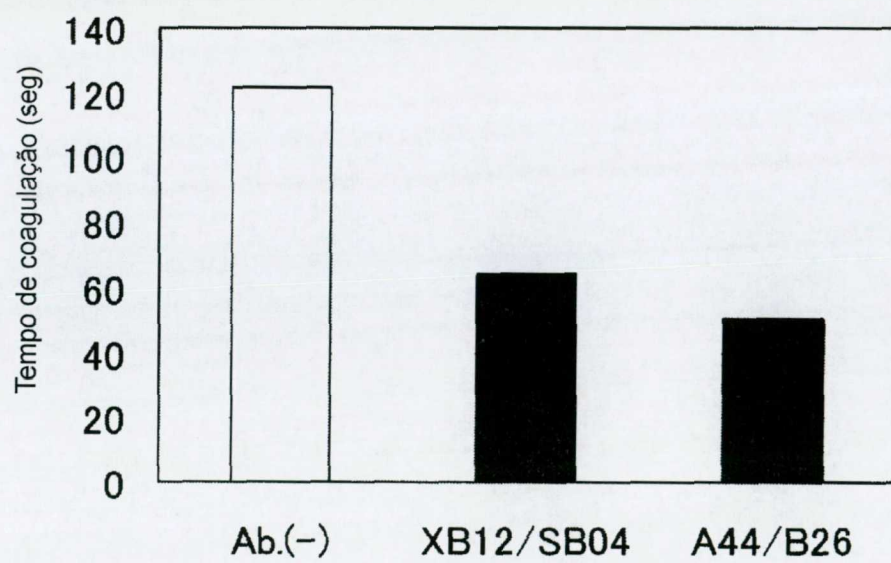
Fig.17

Fig.18