

(11) Número de Publicação: **PT 1527100 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/24 (2007.10) **C12N 5/10** (2007.10)
C12N 15/12 (2007.10) **C12N 15/63** (2007.10)
A61K 39/395 (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2003.03.27**

(30) Prioridade(s): **2002.03.29 US 369044 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.05.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.07.01**
164/2009

(73) Titular(es):

SCHERING CORPORATION
2000 GALLOPING HILL ROAD, KENILWORTH
NEW JERSEY 07033-0530 **US**
ABGENIX, INC. **US**

(72) Inventor(es):

SCOTT GREENFEDER **US**
JOSE CORVALAN **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA INTERLEUCINA-5 E MÉTODOS E COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO OS MESMOS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"Anticorpos monoclonais humanos para interleucina-5 e métodos e composições compreendendo os mesmos"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se a anticorpos monoclonais humanos e suas porções de ligação ao antigénio que se ligam especificamente à interleucina-5 (IL-5) e a métodos e composições compreendendo tais anticorpos monoclonais ou suas porções de ligação ao antigénio.

ANTECEDENTES DO INVENTO

Os eosinófilos têm um papel importante na patogénese da asma. Tanto a gravidade da asma como a extensão da hiper-reatividade das vias aéreas se correlacionam com o número de eosinófilos no sangue e na expectoração. Estudos de biópsias brônquicas mostram que os eosinófilos são uma componente proeminente da inflamação das vias aéreas asmáticas e que conteúdos de grânulos de eosinófilos estão presentes em maiores concentrações no fluido que forra as vias aéreas dos asmáticos. Os conteúdos destes grânulos consistem em várias proteínas que têm efeitos tóxicos directos nas células das vias aéreas através de múltiplos mecanismos tais como desprendimento de células epiteliais, ciliostase, geração de radicais de oxigénio e lesões das fibras nervosas das vias aéreas. Os eosinófilos também produzem mediadores que podem aumentar a libertação de histamina pelos mastócitos. Este espectro de actividades contribui directamente para inflamação crónica das vias aéreas brônquicas tal como manifestado através de inchaço das paredes das vias aéreas e geração de muco das vias aéreas. Ao facilitar a penetração de agentes oriundos do ar através do epitélio danificado das vias aéreas, esta inflamação pode causar directamente maior reactividade neuronal e contracção do músculo liso (Greenfeder et al., *Respiratory Research* 2: 71-79, 2001).

A interleucina-5 (IL-5) é um dos principais mediadores de eosinófilos e um factor crítico em lesões inflamatórias das vias aéreas em asma. É produzida principalmente pelo

subconjunto Th2 de células T e, numa menor extensão, por outros tipos celulares incluindo eosinófilos. A IL-5 é de importância crítica para a maturação dos eosinófilos na medula óssea e de menor importância para a resposta quimiotáctica dos eosinófilos. A IL-5 também estimula a activação de eosinófilos, prolonga a sobrevivência, facilita a desgranulação em resposta a estímulos específicos (tais como IgA ou IgG), e é geralmente um mediador pró-inflamatório. Níveis aumentados de IL-5 foram medidos em asma clínica e modelos brônquicos de confronto com antigénios humanos (Greenfeder *et al.*, *Respiratory Research* 2: 71-79, 2001).

A asma é actualmente mais eficazmente tratada através de um regime de esteróides inalados ou orais que suprimem a expressão de vários mediadores chave na asma, incluindo IL-5, resultando em menor inflamação pulmonar. Existem, no entanto, susceptibilidades perceptíveis a longo prazo da terapia de esteróides. Por essa razão, a terapia directa anti-IL-5 é um alvo atractivo na gestão da asma.

Assim, seria desejável obter anticorpos de elevada afinidade, particularmente anticorpos anti-IL-5 humanos, que pudessem ser utilizados para tratar patologias mediadas por IL-5 em humanos.

SUMÁRIO DA DIVULGAÇÃO

A presente divulgação proporciona anticorpos ou suas porções de ligação ao antigénio, que se ligam especificamente a IL-5 e que são tal como definidos nas reivindicações anexas. Em certas concretizações, os anticorpos ou porções de ligação ao antigénio são isolados e podem ser policlonais ou monoclonais. Os anticorpos do presente invento ligam-se especificamente a IL-5 humana. Em concretizações particularmente preferidas, os anticorpos são anticorpos monoclonais humanos.

São divulgadas sequências de aminoácidos das cadeias pesadas dos anticorpos ou de seus fragmentos de ligação ao antigénio compreendendo uma sequência de aminoácidos derivada das sequências de aminoácidos da linha germinativa de um gene humano V3-23, um gene humano D1-20 e um gene humano de JH4B. A

cadeia pesada CDR2 dos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno pode compreender uma substituição de aminoácidos em comparação com a sequência de aminoácidos da linha germinativa e a cadeia pesada CDR3 contém duas substituições de aminoácidos em comparação com a sequência de aminoácidos da linha germinativa.

São divulgadas sequências de aminoácidos da cadeia leve dos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno compreendendo uma sequência de aminoácidos derivada da sequência de aminoácidos da linha germinativa de um gene humano de VK 08/018 e de um gene humano de JK4. A cadeia leve CDR1, CDR2, FR3, CDR3 e FR4 pode compreender, cada uma, uma substituição de aminoácidos em comparação com a sequência de aminoácidos da linha germinativa.

Num primeiro aspecto, a presente divulgação proporciona um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente a IL-5, em que o referido anticorpo ou fragmento compreende: i) uma sequência de aminoácidos da cadeia pesada seleccionada de entre o grupo que consiste em: (a) a sequência de aminoácidos exposta em SEQ ID NO:2, com ou sem o péptido de sinal; (b) a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:6; (c) a sequência de aminoácidos do resíduo 50-127 de SEQ ID NO:2; e (d) as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 mostradas em SEQ ID NO:8, 10 e 12, respectivamente; e ii) uma sequência de aminoácidos da cadeia leve seleccionada de entre o grupo que consiste em: (a) a sequência de aminoácidos exposta em SEQ ID NO:4, com ou sem o péptido de sinal; (b) a sequência de aminoácidos do resíduo 23-130 de SEQ ID NO:4; (c) a sequência de aminoácidos do resíduo 46-119 de SEQ ID NO:4; e (d) as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 mostradas em SEQ ID NO: 14, 16 e 18, respectivamente. Assim nalgumas concretizações do primeiro aspecto, o anticorpo compreende a sequência de aminoácidos da cadeia pesada mostrada em SEQ ID NO:2. Noutras concretizações, o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a CDR1, CDR2 e CDR3 mostradas em SEQ ID NO: 8, 10 e 12, respectivamente. Noutra concretização, a cadeia pesada do anticorpo compreende uma porção contígua da sequência de aminoácidos mostrada na Tabela 2 de CDR1 a CDR3. Noutra concretização, a cadeia pesada do anticorpo compreende

a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada mostrada em SEQ ID NO:6. Qualquer um dos anticorpos acima descritos compreende ainda a sequência de aminoácidos da cadeia leve mostrada em SEQ ID NO:4, ou a região variável (resíduos de aminoácidos 23-130 de SEQ ID NO:4), CDR1 a CDR3 tal como mostrado na Tabela 3 (resíduos de aminoácidos 46-119 de SEQ ID NO:4) ou CDR1 (SEQ ID NO:14), CDR2 (SEQ ID NO:16) e CDR3 (SEQ ID NO:18) da sequência de aminoácidos da cadeia leve.

Os anticorpos ou suas porções podem ser uma molécula de imunoglobulina G (IgG), uma IgM, uma IgE, uma IgA ou uma IgD. Numa concretização preferida, o anticorpo humano é uma IgG e é um subtipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Numa concretização preferida mais preferida, o anticorpo humano é um subtipo IgG4. Numa concretização ainda mais preferida, o anticorpo humano é 20.13.3. Noutra concretização, o anticorpo ou a sua porção de ligação ao antigénio são derivados de um fragmento Fab, um fragmento F(ab')₂, um fragmento F_v, um anticorpo de cadeia simples ou um anticorpo quimérico. Noutra concretização, o anticorpo ou a sua porção de ligação ao antigénio faz parte de uma proteína de fusão.

Noutro aspecto, a divulgação proporciona moléculas polinucleotídicas compreendendo sequências codificando as moléculas de cadeia pesada e cadeia leve de imunoglobulina ou suas porções, particularmente sequências nucleotídicas codificando regiões variáveis da cadeia pesada e leve, sequências de aminoácidos contíguas da cadeia leve e pesada de CDR1 a CDR3 e CDR individuais. As moléculas polinucleotídicas do presente invento são tal como definidas nas reivindicações anexas.

De acordo com outro objectivo, a divulgação proporciona um anticorpo anti-IL-5 humano ou uma sua porção de ligação ao antigénio que são marcados ou derivados. Numa concretização, o anticorpo ou sua porção são marcados com um marcador radioactivo, um marcador enzimático, uma toxina, um agente magnético ou um conjugado de fármaco. Noutra concretização, o anticorpo ou sua porção são derivados para melhorar uma ou mais das suas características, tais como semivida, biodisponibilidade ou actividade. Numa concretização

preferida, o anticorpo ou sua porção são derivados com polietilenoglicol, pelo menos um grupo metilo ou etilo ou pelo menos uma porção hidrato de carbono. Noutra concretização preferida, o anticorpo marcado ou derivado ou sua porção são utilizados em métodos de diagnóstico ou terapêuticos.

De acordo com outro objectivo, a divulgação proporciona um anticorpo anti-IL-5 ou uma sua porção de ligação ao antigénio que se caracterizam por uma ou mais das seguintes: inibe ou diminui inflamação mediada por IL-5, a maturação, activação, desgranulação ou infiltração de eosinófilos num tecido *in vivo* ou *in vitro*, inibe hiper-reactividade induzida por IL-5 de um músculo liso e diminui os níveis de IL-5 nos pulmões, vias aéreas ou sangue. Numa concretização preferida, o anticorpo humano inibe ou diminui a infiltração de eosinófilos num tecido *in vivo*. Numa concretização preferida, o tecido é pulmão ou tecido que forra as vias aéreas.

De acordo com outro aspecto, a divulgação proporciona composições farmacêuticas e estojos compreendendo o anticorpo ou uma sua porção de ligação ao antigénio e um transportador farmacêuticamente aceitável. Numa concretização preferida, a composição farmacêutica ou estajo compreende ainda outro componente, tal como um reagente de imagiologia ou agente terapêutico. Em concretizações preferidas, a composição farmacêutica ou estajo é utilizada em métodos de diagnóstico ou terapêuticos.

São também aqui divulgados métodos de diagnóstico, p. ex., um método para diagnóstico da presença ou localização de um tecido que expresse IL-5. Num caso preferido, o método utiliza um anticorpo marcado ou sua porção. O método pode ser utilizado *in vivo* ou *in vitro*. Noutro caso, é proporcionado um método de diagnóstico que compreende a determinação de se um anticorpo anti-IL-5 humano inibe ou diminui a infiltração de eosinófilos num tecido, p. ex., o pulmão.

Noutro aspecto, a divulgação proporciona a utilização de anticorpo anti-IL-5 humano ou sua porção de ligação ao antigénio no fabrico de um medicamento tal como definido nas reivindicações anexas. Numa concretização, um método terapêutico compreende o passo de administração de uma

quantidade eficaz do anticorpo a um indivíduo dele necessitado. Numa concretização preferida, o indivíduo sofre de asma, exacerbações da asma, episódios de agravamento da asma, pneumonia crónica, rinite alérgica, rinite alérgica perene, aspergilose broncopulmonar alérgica, hiper-eosinofilia, síndrome de Churg-Strauss, dermatite atópica, oncocercose, angiodema episódico, síndrome de eosinofilia-mialgia, doença celíaca, gastroenterite eosinofílica, infecções helmínticas, doença de Hodgkin, pólipos nasais, síndrome de Loeffler, urticária, bronquite hiper-eosinofílica, arterite nodosa, sinusite, sinusite crónica, esofagite eosinofílica, esofagite eosinofílica alérgica, conjuntivite alérgica. Numa concretização mais preferida, o método inibe ou diminui a infiltração de eosinófilos no pulmão. O anticorpo ou sua porção podem ser administrados de três vezes ao dia a uma vez de seis em seis meses e pode ser administrado através de uma via intravenosa, subcutânea, intramuscular, parentérica, ou tópica. Noutra concretização, o método é efectuado juntamente com cirurgia ou outra imunoterapia. Ainda noutra concretização, o anticorpo é marcado com um marcador radioactivo, um conjugado de fármaco, uma imunotoxina ou uma toxina, ou é uma proteína de fusão compreendendo um péptido tóxico.

Noutro aspecto, a presente divulgação proporciona métodos para produção de um anticorpo da fascículo ou uma sua porção de ligação ao antigénio, incluindo produção através de uma célula imortalizada, meios sintéticos, expressão recombinante ou apresentação fágica.

Outro objecto é proporcionar ácidos nucleicos tal como definidos pelas reivindicações anexas codificando a cadeia pesada e/ou leve, suas porções de ligação ao antigénio ou derivados de um anticorpo anti-IL-5. Numa concretização preferida, a molécula de ácido nucleico é derivada de uma célula ou linha celular que expressa um anticorpo anti-IL-5. Numa concretização mais preferida, o ácido nucleico é derivado de um hibridoma. Numa concretização ainda mais preferida, o hibridoma é 20.13.3. Noutra concretização, a divulgação proporciona vectores e células hospedeiras compreendendo a molécula ou moléculas de ácido nucleico divulgadas. Noutra concretização, a divulgação proporciona um método de produzir

de forma recombinante a cadeia pesada e/ou leve, as suas porções de ligação ao antigénio ou seus derivados.

É também aqui divulgado um método para tratamento de um indivíduo dele necessitado com uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucleico codificando a cadeia pesada e/ou leve, suas porções de ligação ao antigénio ou seus derivados de um anticorpo anti-IL-5. Numa concretização preferida, o método é utilizado para tratar, sem limitação, asma, exacerbações da asma, episódios de agravamento da asma, pneumonia crónica, rinite alérgica, rinite alérgica perene, aspergilose broncopulmonar alérgica, hiper-eosinofilia, síndrome de Churg-Strauss, dermatite atópica, oncocercose, angiodema episódico, síndrome de eosinofilia-mialgia, doença celíaca, gastroenterite eosinofílica, infecções helmínticas, doença de Hodgkin, pólipos nasais, síndrome de Loeffler, urticária, bronquite hiper-eosinofílica, arterite nodosa, sinusite, sinusite crónica, esofagite eosinofílica, esofagite eosinofílica alérgica, conjuntivite alérgica.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Definições e Técnicas Gerais

A menos que indicado em contrário, os termos científicos e técnicos utilizados em ligação com o presente invento deverão ter os significados que são vulgarmente entendidos pelos vulgares peritos na arte. Mais, a menos que requerido em contrário pelo contexto, os termos singulares deverão incluir o plural e os termos plurais deverão incluir o singular. Geralmente, as nomenclaturas utilizadas em relação a, e as técnicas de, cultura celular e de tecidos, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genética e química e hibridação de proteínas e ácidos nucleicos aqui descritas são as bem conhecidas e vulgarmente utilizadas na arte. Os métodos e técnicas são geralmente efectuados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na especialidade e tal como descritos em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo do presente fascículo a menos de indicado em contrário. Ver, p.ex., Sambrook *et al.* "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); e

Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates (1992); e Harlow e Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). As reacções enzimáticas e técnicas de purificação são efectuadas de acordo com a especificação do fabricante, tal como vulgarmente alcançado na especialidade ou tal como aqui descrito. As nomenclaturas utilizadas em relação a, e os procedimentos e técnicas laboratoriais de, química analítica, química orgânica sintética e química medicinal e farmacêutica aqui descritos são aqueles bem conhecidos e vulgarmente utilizados na arte. Técnicas padrão são utilizadas para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação e distribuição, e tratamento de pacientes.

Os seguintes termos, a menos que indicado em contrário, deverão ser entendidos como tendo os seguintes significados:

O termo "polipéptido" engloba proteínas nativas ou artificiais, fragmentos proteicos e análogos polipeptídicos de uma sequência proteica. Um polipéptido pode ser monomérico ou polimérico. Os polipéptidos preferidos de acordo com o presente invento compreendem as moléculas de cadeia pesada da imunoglobulina humana e as moléculas da cadeia leve capa da imunoglobulina humana, bem como moléculas de anticorpo formadas através de combinações compreendendo as moléculas de cadeia pesada da imunoglobulina com as moléculas de cadeia leve da imunoglobulina, tais como as moléculas da cadeia leve κ da imunoglobulina, bem como seus fragmentos e análogos.

A expressão "proteína isolada" ou "polipéptido isolado" é uma proteína ou polipéptido que em virtude da sua origem ou fonte de derivação (1) não está associado a componentes naturalmente associados que o acompanham no seu estado nativo, (2) está livre de outras proteínas da mesma espécie, (3) é expresso por uma célula de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza. Assim, um polipéptido que é quimicamente sintetizado ou sintetizado num sistema celular diferente do da célula da qual é naturalmente originário será "isolado" dos seus componentes naturalmente associados. Uma proteína pode também ser tornada substancialmente livre de componentes

naturalmente associados através de isolamento, utilizando técnicas de purificação de proteínas bem conhecidas na arte.

Uma proteína ou polipéptido é "substancialmente puro", "substancialmente homogêneo" ou "substancialmente purificado" quando pelo menos cerca de 60 a 75% de uma amostra exibe uma única espécie de polipéptido. O polipéptido ou proteína pode ser monomérico ou multimérico. Um polipéptido ou proteína substancialmente puro constituirá tipicamente cerca de 50%, 60, 70%, 80% ou 90% P/P de uma amostra proteica, mais habitualmente cerca de 95% e de preferência será mais de 99% puro. A pureza ou homogeneidade da proteína podem ser indicadas através de vários meios bem conhecidos na arte, tais como electroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra proteica, seguido de visualização de uma única banda polipeptídica após coloração do gel com um corante bem conhecido na arte. Para certos fins, pode ser proporcionada maior resolução através da utilização de HPLC ou outros meios bem conhecidos na especialidade para purificação.

A expressão "fragmento polipeptídico" tal como aqui se utiliza refere-se a um polipéptido que tem uma deleção amino-terminal e/ou carboxi-terminal, mas em que a restante sequência de aminoácidos é idêntica às posições correspondentes na sequência de ocorrência natural. Os fragmentos têm tipicamente pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento, de preferência pelo menos 14 aminoácidos de comprimento, de preferência pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, habitualmente pelo menos 50 aminoácidos de comprimento e ainda de maior preferência pelo menos 70 aminoácidos de comprimento.

A expressão "análogo polipeptídico" tal como aqui se utiliza refere-se a um polipéptido que é constituído por um segmento de pelo menos 25 aminoácidos que tem substancial identidade com uma porção de uma sequência de aminoácidos e que se liga especificamente a IL-5 sob condições de ligação adequadas. Tipicamente, os análogos polipeptídicos compreendem uma substituição (ou inserção ou deleção) de aminoácidos conservativa em relação à sequência de ocorrência natural. Os análogos têm tipicamente pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, de preferência pelo menos 50 aminoácidos de

comprimento ou mais e podem frequentemente ser tão compridos como o polipéptido de ocorrência natural inteiro.

Os análogos não peptídicos são vulgarmente utilizados na indústria farmacêutica como fármacos com propriedades análogas às do péptido molde. Estes tipos de compostos não peptídicos são designados "imitadores de péptidos" ou "peptidomiméticos". Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15: 29, 1986; Veber e Freidinger, *TINS* pág. 392, 1985; e Evans et al., *J. Med. Chem.* 30: 1229, 1987, que são aqui incorporadas por referência. Tais compostos são frequentemente desenvolvidos com o auxílio de modelação molecular computadorizada. Os imitadores de péptidos que são estruturalmente semelhantes a péptidos terapeuticamente úteis podem ser utilizados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. Geralmente, os peptidomiméticos são estruturalmente semelhantes a um polipéptido paradigma (i.e., um polipéptido que tenha uma propriedade bioquímica ou actividade farmacológica desejada), tal como um anticorpo humano, mas têm uma ou mais ligações peptídicas opcionalmente substituídas por uma ligação seleccionada de entre o grupo que consiste em: --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--, --CH=CH-- (*cis* e *trans*), --COCH₂--, --CH(OH)CH₂-- e --CH₂SO--, através de métodos bem conhecidos na arte. A substituição sistémica de um ou mais aminoácidos de uma sequência de consenso com um D-aminoácido do mesmo tipo (p. ex., D-lisina em vez de L-lisina) pode também ser utilizada para gerar péptidos mais estáveis. Adicionalmente, podem ser gerados péptidos constrangidos compreendendo uma sequência de consenso ou uma variação da sequência de consenso substancialmente idêntica através de métodos conhecidos na especialidade (Rizo e Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387, 1992; por exemplo, através da adição de resíduos de cisteína internos capazes de formar pontes dissulfureto intramoleculares que tornem o péptido cíclico.

Uma "imunoglobulina" é uma molécula tetramérica. Numa imunoglobulina de ocorrência natural, cada tetrâmero é constituído por dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, possuindo cada par uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma "pesada" (cerca de 50-70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos primariamente responsáveis pelo

reconhecimento do antígeno. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante primariamente responsável pela função efectora. As cadeias leves humanas são classificadas como cadeias leves κ e λ . As cadeias pesadas são classificadas como μ , Δ , γ , α ou ϵ e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro das cadeias leves e pesadas, as regiões variáveis e constantes são unidas através de uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada a incluir também uma região "D" de cerca de 10 ou mais aminoácidos. *Ver geralmente, "Fundamental Immunology" Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989))*. As regiões variáveis de cada par de cadeias leve/pesada formam o local de ligação do anticorpo de modo que a imunoglobulina intacta tem dois locais de ligação.

As cadeias de imunoglobulina exibem a mesma estrutura geral das regiões estruturais relativamente conservadas (FR) unidas através de três regiões hipervariáveis, também chamadas regiões determinantes de complementaridade ou CDR. As CDR das duas cadeias de cada par são alinhadas através de regiões estruturais, permitindo a ligação a um epítipo específico. Do terminal N ao terminal C, ambas as cadeias leves e pesadas compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A atribuição de aminoácidos a cada domínio é de acordo com as definições de "Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest" (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 e 1991)) ou Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987; Chothia *et al.*, *Nature* 342: 878-883, 1989.

Um "anticorpo" refere-se a uma imunoglobulina intacta ou a uma sua porção de ligação ao antígeno que compita com o anticorpo intacto pela ligação específica. As porções de ligação ao antígeno podem ser produzidas através de técnicas de ADN recombinante ou através de clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. As porções de ligação ao antígeno incluem, *inter alia*, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb e fragmentos de regiões determinantes de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia simples (scFv), anticorpos quiméricos, diacorpos e polipéptidos que contenham pelo menos uma porção de uma imunoglobulina que seja suficiente para conferir ao polipéptido ligação específica ao antígeno. Um fragmento Fab é um fragmento monovalente consistindo nos

domínios VL, VH, CL e CH1; um fragmento $F(ab')_2$ é um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados através de uma ponte dissulfureto na região charneira; um fragmento Fd consiste nos domínios VH e CH1; um fragmento Fv consiste nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo; e um fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341: 544-546, 1989) consiste num domínio VH. Um anticorpo de cadeia simples (scFv) é um anticorpo em que uma região VL e VH são emparelhadas para formar uma molécula monovalente através de um ligante sintético que lhes permita tornarem-se numa única cadeia proteica (Bird *et al.*, *Science* 242: 423-426, 1988; e Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883, 1988). Os diacorpos são anticorpos bivalentes, biespecíficos nos quais os domínios VH e VL são expressos numa única cadeia polipeptídica, mas utilizando um ligante que seja demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, forçando deste modo os domínios a emparelhar com domínios complementares da outra cadeia e criando dois locais de ligação ao antigénio (ver p. ex., Holliger, P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448, 1993; e Poljak, R. J., *et al.*, *Structure* 2: 1121-1123, 1994). Uma ou mais CDR podem ser incorporadas numa molécula covalentemente ou não covalentemente para a tornar numa imunoadesina. Uma imunoadesina pode incorporar a CDR ou CDR como parte de uma cadeia polipeptídica maior, pode ligar covalentemente a CDR ou CDR a outra cadeia polipeptídica ou pode incorporar a CDR ou CDR não covalentemente. As CDR permitem que a imunoadesina se ligue especificamente a um determinado antigénio de interesse.

Um anticorpo pode ter um ou mais locais de ligação. Se existir mais de um local de ligação, os locais de ligação podem ser idênticos um ao outro ou podem ser diferentes. Por exemplo, uma imunoglobulina de ocorrência natural tem dois locais de ligação idênticos, um anticorpo de cadeia simples ou fragmento Fab tem um local de ligação, enquanto um anticorpo "biespecífico" ou "bifuncional" tem dois locais de ligação diferentes. Os anticorpos biespecíficos podem ser produzidos através de uma variedade de métodos incluindo fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Ver, p. ex., Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321, 1990; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1547-1553, 1992.

Um "anticorpo isolado" é um anticorpo que (1) não está associado a componentes naturalmente associados, incluindo outros anticorpos naturalmente associados, que o acompanham no seu estado nativo, (2) está livre de outras proteínas da mesma espécie, (3) é expresso por uma célula de uma espécie diferente ou (4) não ocorre na natureza. Exemplos de anticorpos isolados incluem um anticorpo anti-IL-5 que tenha sido purificado por afinidade utilizando IL-5, um anticorpo anti-IL-5 que tenha sido sintetizado por um hibridoma ou outra linha celular *in vitro* e um anticorpo anti-IL-5 humano derivado de um ratinho transgénico.

A expressão "anticorpo humano" inclui todos os anticorpos que tenham uma ou mais regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina humanas. Estes anticorpos podem ser preparados numa variedade de modos, tal como descrito abaixo.

Um anticorpo humanizado é um anticorpo que é derivado de uma espécie não humana, no qual certos aminoácidos nos domínios estruturais e constantes das cadeias pesadas e leves foram mutados para evitar ou abolir uma resposta imunitária em humanos. Alternativamente, um anticorpo humanizado pode ser produzido através de fusão dos domínios constantes de um anticorpo humano com os domínios variáveis de uma espécie não humana. Exemplos de como fazer anticorpos humanizados podem ser encontrados nas Patentes dos Estados Unidos N^{os} 6054297, 5886152 e 5877293.

A expressão "anticorpo quimérico" refere-se a um anticorpo que contém uma ou mais regiões de um anticorpo e uma ou mais regiões de um ou mais outros anticorpos.

O termo " K_{off} " refere-se à constante de saída para dissociação de um anticorpo do complexo anticorpo/antígeno.

O termo " K_d " refere-se à constante de dissociação de uma determinada interacção anticorpo-antígeno.

O termo "epítopo" inclui qualquer determinante proteico capaz de se ligar especificamente a uma imunoglobulina ou receptor de células T. Os determinantes epitópicos consistem

habitualmente em agrupamentos superficiais quimicamente activos de moléculas tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcares e têm habitualmente características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Um anticorpo é referido como ligando-se especificamente a um antigénio quando a constante de dissociação é $\leq 1 \mu\text{M}$, de preferência $\leq 100 \text{ nM}$ e de maior preferência $\leq 10 \text{ nM}$.

Os fragmentos ou análogos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina podem ser facilmente preparados pelos vulgares peritos na especialidade seguindo os ensinamentos deste fascículo. Os terminais amino e carboxilo preferidos dos fragmentos ou análogos ocorrem próximo dos limites dos domínios funcionais. Os domínios estruturais e funcionais podem ser identificados através de comparação dos dados da sequência nucleotídica e/ou de aminoácidos com bases de dados de sequências públicas ou privadas. De preferência, são utilizados métodos de comparação computadorizados para identificar motivos de sequências ou domínios de conformação de proteínas previstos que ocorram noutras proteínas de estrutura e/ou função conhecidas. Os métodos para identificar sequências proteicas que se dobram numa estrutura tridimensional conhecida são conhecidos. Bowie *et al.*, *Science* 253: 164, 1991.

As substituições de aminoácidos preferidas são as que: (1) reduzem a susceptibilidade a proteólise, (2) reduzem a susceptibilidade a oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para formar complexos proteicos, (4) alteram as afinidades de ligação e (5) conferem ou modificam outras propriedades físico-químicas ou funcionais de tais análogos. Os análogos podem incluir várias muteínas de uma sequência diferentes da sequência peptídica de ocorrência natural. Por exemplo, substituições de aminoácidos simples ou múltiplas (de preferência substituições de aminoácidos conservativas) podem ser feitas na sequência de ocorrência natural (de preferência na porção do polipéptido fora do domínio ou domínios que formam os contactos intermoleculares). Uma substituição de aminoácidos conservativa não deve alterar substancialmente as características estruturais da sequência original (p. ex., um aminoácido de substituição não deve tender a quebrar uma

hélice que ocorra na sequência original, ou destruir outros tipos de estruturas secundárias que caracterizem a sequência original). Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipéptidos reconhecidas na especialidade estão descritas em "Proteins, Structures and Molecular Principles" (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)); "Introduction to Protein Structure" (C. Branden e J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton et al., *Nature* 354: 105, 1991.

Tal como aqui se utiliza, os vinte aminoácidos convencionais e as suas abreviaturas seguem a utilização convencional. Ver "Immunology - A Synthesis" (2ª Edição, E.S. Golub e D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

Estereoisómeros (p. ex., D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não naturais tais como aminoácidos α e α -bissubstituídos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico e outros aminoácidos não convencionais podem também ser componentes adequados para polipéptidos do presente invento. Exemplos de aminoácidos não convencionais incluem: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfo-serina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metil-histidina, 5-hidroxilisina, s-N-metilarginina e outros aminoácidos semelhantes e iminoácidos (p. ex., 4-hidroxiprolina). Na notação de polipéptidos aqui utilizada, a direcção esquerda é a direcção amino-terminal e a direcção direita é a direcção carboxi-terminal, de acordo com a utilização padrão e convenção.

O termo "polinucleótido" tal como aqui referido significa uma forma polimérica de nucleótidos de pelo menos 10 bases de comprimento, ribonucleótidos ou desoxinucleótidos ou uma forma modificada de cada tipo de nucleótido. O termo inclui as formas de ADN de cadeia simples e dupla.

A expressão "polinucleótido isolado" tal como aqui se utiliza deverá significar um polinucleótido de origem genómica, de ADNc ou sintética ou alguma sua combinação, que em virtude da sua origem o "polinucleótido isolado" (1) não está associado a todo ou uma porção de um polinucleótido na

qual o "polinucleótido isolado" se encontra na natureza, (2) está operativamente ligado a um polinucleótido com o qual não está ligado na natureza, ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior.

A expressão "oligonucleótido" aqui referido inclui nucleótidos de ocorrência natural e modificados ligados uns aos outros através de ligações oligonucleotídicas de ocorrência natural e de ocorrência não natural. Os oligonucleótidos são um subconjunto de polinucleótidos compreendendo geralmente um comprimento de 200 bases ou menos. De preferência, os oligonucleótidos têm 10 a 60 bases de comprimento e de maior preferência 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 a 40 bases de comprimento. Os oligonucleótidos são habitualmente de cadeia simples, p. ex., para sondas; embora os oligonucleótidos possam se de cadeia dupla, p. ex., para utilizar na construção de um mutante génico. Os oligonucleótidos podem ser oligonucleótidos com sentido ou anti-sentido.

A expressão "nucleótidos de ocorrência natural" aqui referido inclui desoxirribonucleótidos e ribonucleótidos. A expressão "nucleótidos modificados" aqui referido inclui nucleótidos com grupos açúcar modificados ou substituídos e semelhantes. A expressão "ligações oligonucleotídicas" aqui referido inclui ligações oligonucleotídicas tais como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforodisselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato e semelhantes. Ver p. ex., LaPlanche *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 14: 9081, 1986; Stec *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 106: 6077, 1984; Stein *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16: 3209, 1988; Zon *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 6: 539, 1991, Zon *et al.* "Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach", pág. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press. Oxford England (1991)); Stec *et al.*, Patente U.S. N.º 5151510; Uhlmann e Peyman, *Chemical Reviews* 90: 543, 1990. Um oligonucleótido pode incluir um marcador para detecção, se desejado.

A menos que especificado em contrário, a extremidade esquerda das sequências polinucleotídicas de cadeia simples é a extremidade 5'; o sentido esquerdo das sequências

polinucleotídicas de cadeia dupla é referido como o sentido 5'. O sentido da adição de 5' para 3' dos transcritos de ARN nascentes é referido como o sentido da transcrição; as regiões da sequência na cadeia de ADN possuindo a mesma sequência que o ARN e que estão a 5' da extremidade 5' do transcrito de ARN são referidas como "sequências a montante"; as regiões da sequência na cadeia de ADN possuindo a mesma sequência que o ARN e que estão a 3' da extremidade 3' do transcrito de ARN são referidas como "sequências a jusante".

As sequências "operativamente ligadas" incluem tanto sequências de controlo da expressão que são contíguas ao gene de interesse como sequências de controlo da expressão que actuam *em trans* ou à distância para controlar o gene de interesse. A expressão "sequência de controlo da expressão" tal como aqui se utiliza refere-se a sequências polinucleotídicas que são necessárias para efectuar a expressão e o processamento das sequências de codificação às quais estão ligadas. As sequências de controlo da expressão incluem sequências de iniciação, terminação, promotoras e estimuladoras da transcrição; sinais de processamento do ARN eficientes tais como sinais de processamento e poliadenilação; sequências que estabilizam o ARNm citoplasmático; sequências que estimulam a eficiência da tradução (i.e., sequência de consenso de Kozak); sequências que estimulam a estabilidade das proteínas; e quando desejado, sequências que estimulam a secreção das proteínas. A natureza de tais sequências de controlo difere dependendo do organismo hospedeiro; em procariotas, tais sequências de controlo incluem geralmente uma sequência promotora, um local de ligação ao ribossoma e uma sequência de terminação da transcrição; em eucariotas, geralmente, tais sequências de controlo incluem promotores e sequências de terminação da transcrição. A expressão "sequências de controlo" pretende incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença seja essencial para a expressão e o processamento e podem também incluir componentes adicionais cuja presença seja vantajosa, por exemplo, sequências de comando e sequências parceiras de fusão.

O termo "vector", tal como aqui se utiliza, pretende referir-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Um tipo

de vector é um "plasmídeo", que se refere a uma volta de ADN de cadeia dupla circular na qual podem ser ligados segmentos adicionais de ADN. Outro tipo de vector é um vector viral, em que segmentos adicionais de ADN podem ser ligados no genoma viral. Certos vectores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira na qual são introduzidos (p. ex., vectores bacterianos possuindo uma origem de replicação bacteriana e vectores de mamífero epissómicos). Outros vectores (p. ex., vectores de mamífero não epissómicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após introdução na célula hospedeira e são deste modo replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Para além disso, certos vectores são capazes de dirigir a expressão de genes aos quais estão operativamente ligados. Tais vectores são aqui referidos como "vectores de expressão recombinante" (ou simplesmente, "vectores de expressão"). Em geral, os vectores de expressão de utilidade em técnicas de ADN recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos. No presente fascículo, "plasmídeo" e "vector" podem ser utilizados indiferentemente uma vez que o plasmídeo é a forma de vector mais vulgarmente utilizada. No entanto, a divulgação pretende incluir outras formas de vectores de expressão, tais como vectores virais (p. ex., retrovírus de replicação deficiente, adenovírus e vírus adeno-associados), que servem funções equivalentes.

A expressão "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), tal como aqui se utiliza, pretende referir-se a uma célula na qual foi introduzido um vector de expressão recombinante. Deve entender-se que tais termos pretendem referir-se não só à célula objecto em particular mas à descendência de uma tal célula.

A expressão "híbrida selectivamente" aqui referido significa ligar-se de modo detectável e específico. Os polinucleótidos, oligonucleótidos e seus fragmentos de acordo com o presente invento hibridam selectivamente com cadeias de ácido nucleico sob condições de hibridação e lavagem que minimizam quantidades apreciáveis de ligação detectável a ácidos nucleicos não específicos. Condições de "elevado rigor" ou "altamente rigorosas" podem ser utilizadas para alcançar condições de hibridação selectivas tal como conhecido na especialidade e aqui discutido. Um exemplo de condições de

"elevado rigor" ou "altamente rigorosas" é um método de incubação de um polinucleótido com outro polinucleótido, em que um polinucleótido pode ser afixado numa superfície sólida tal como uma membrana, num tampão de hibridação de SSPE ou SSC 6×, formamida a 50%, reagente de Denhardt 5×, SDS a 0,5%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmão desnaturado e fragmentado a uma temperatura de hibridação de 42°C durante 12-16 horas, seguido de duas lavagens a 55°C utilizando tampão de lavagem de SSC 1×, SDS a 0,5%. Ver também Sambrook *et al.*, *supra*, págs. 9.50-9.55.

Duas sequências de aminoácidos são homólogas se houver uma identidade parcial ou completa entre as suas sequências. Por exemplo, uma homologia de 85% significa que 85% dos aminoácidos são idênticos quando as duas sequências são alinhadas para uma coincidência máxima. Os intervalos (numa das duas sequências a alinhar) são permitidos para maximizar a coincidência; são preferidos comprimentos de intervalos de 5 ou menos sendo mais preferido de 2 ou menos. Alternativamente e de preferência, duas sequências proteicas (ou sequências polipeptídicas derivadas delas com pelo menos 30 aminoácidos de comprimento) são homólogas, tal como este termo se utiliza aqui, se tiverem um registo de alinhamento de mais de 5 (em unidades de desvio padrão) utilizando o programa ALIGN com a matriz de dados de mutação e uma penalidade de intervalo de 6 ou mais. Ver Dayhoff, M.O., em "Atlas of Protein Sequence and Structure", pág. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) e Suplemento 2 a este volume, pág. 1-10. As duas sequências ou suas partes são de preferência homólogas se os seus aminoácidos forem 50% ou mais idênticos quando alinhados de modo óptimo utilizando o programa ALIGN.

A expressão "corresponde a" é aqui utilizado para significar que uma sequência polinucleotídica é idêntica a toda ou a uma porção de uma sequência polinucleotídica de referência, ou que uma sequência polipeptídica é idêntica a uma sequência polipeptídica de referência. Em contraste, a expressão "complementar a" é aqui utilizado para significar que a sequência complementar é idêntica a toda ou a uma porção de uma sequência polinucleotídica de referência. Para ilustração, a sequência nucleotídica "TATAC" corresponde a uma

sequência de referência "TATAC" e é complementar a uma sequência de referência "GTATA".

Os seguintes termos são utilizados para descrever as relações de sequência entre duas ou mais sequências polinucleotídicas ou de aminoácidos: "sequência de referência", "janela de comparação", "identidade de sequência", "percentagem de identidade de sequência" e "identidade substancial". Uma "sequência de referência" é uma sequência definida utilizada como base para uma comparação de sequências; uma sequência de referência pode ser um subconjunto de uma sequência maior, por exemplo, como um segmento de um ADNc inteiro ou uma sequência génica dada numa listagem de sequências ou pode compreender um ADNc completo ou uma sequência génica. Geralmente, uma sequência de referência tem pelo menos 18 nucleótidos ou 6 aminoácidos de comprimento, frequentemente pelo menos 24 nucleótidos ou 8 aminoácidos de comprimento e muito frequentemente pelo menos 48 nucleótidos ou 16 aminoácidos de comprimento. Uma vez que duas sequências polinucleotídicas ou de aminoácidos podem cada uma (1) compreender uma sequência (i.e., uma porção da sequência polinucleotídica ou de aminoácidos completa) que seja semelhante entre as duas moléculas e (2) podem ainda compreender uma sequência que seja divergente entre as duas sequências polinucleotídicas ou de aminoácidos, as comparações de sequências entre duas (ou mais) moléculas são tipicamente efectuadas através da comparação das duas moléculas ao longo de uma "janela de comparação" para identificar e comparar regiões locais de semelhança de sequências. Uma "janela de comparação", tal como aqui se utiliza, refere-se a um segmento conceptual de pelo menos 18 posições nucleotídicas contíguas ou 6 aminoácidos em que uma sequência polinucleotídica ou sequência de aminoácidos pode ser comparada com uma sequência de referência de pelo menos 18 nucleótidos contíguas ou sequências de 6 aminoácidos e em que a porção da sequência polinucleotídica na janela de comparação pode compreender 20 por cento ou menos de adições, deleções, substituições e semelhantes (i.e., intervalos) em comparação com a sequência de referência (que não compreende adições nem deleções) para alinhamento óptimo das duas sequências. O alinhamento óptimo de sequências para alinhar uma janela de comparação pode ser conduzido através do algoritmo de homologia local de Smith e

Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981, através do algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970, através do método de pesquisa de semelhança de Pearson e Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85: 2444, 1988, através de implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA nos pacotes de suporte lógico Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks ou MacVector) ou através de inspecção e é seleccionado o melhor alinhamento (i.e., resultando na percentagem de homologia mais elevada ao longo da janela de comparação) gerado através dos vários métodos.

A expressão "identidade de sequência" significa que duas sequências polinucleotídicas ou de aminoácidos são idênticas (i.e., numa base nucleótido-a-nucleótido ou resíduo-a-resíduo) ao longo da janela de comparação. A expressão "percentagem de identidade de sequência" é calculado através da comparação de duas sequências alinhadas de modo óptimo ao longo da janela de comparação, determinando o número de posições nas quais ocorrem as bases de ácido nucleico (p. ex., A, T, C, G, U ou I) ou resíduos idênticos em ambas as sequências para produzir o número de posições coincidentes, dividindo o número de posições coincidentes pelo número total de posições na janela de comparação (i.e., o tamanho da janela) e multiplicando o resultado por 100 para produzir a percentagem de identidade de sequência. Os termos "identidade substancial" tal como aqui se utiliza denota uma característica de uma sequência polinucleotídica ou de aminoácidos, em que os polinucleótidos ou aminoácidos compreendem uma sequência que tem pelo menos 85 por cento de identidade de sequência, de preferência pelo menos 90 a 95 por cento de identidade de sequência, de maior preferência pelo menos 98 por cento de identidade de sequência, mais habitualmente pelo menos 99 por cento de identidade de sequência em comparação com uma sequência de referência ao longo de uma janela de comparação de pelo menos 18 posições nucleotídicas (6 aminoácidos), frequentemente ao longo de uma janela de pelo menos 24-48 posições nucleotídicas (8-16 aminoácidos), em que a percentagem de identidade de sequência é calculada através da comparação da sequência de referência com a sequência que pode incluir deleções ou adições que totalizem 20 por cento ou menos da sequência de

referência ao longo da janela de comparação. A sequência de referência pode ser um subconjunto de uma sequência maior.

Tal como aplicado a polipéptidos, a expressão "identidade substancial" significa que duas sequências peptídicas, quando alinhadas de modo óptimo, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT utilizando pesos de intervalo por defeito, partilham pelo menos 80 por cento de identidade de sequência, de preferência pelo menos 90 por cento de identidade de sequência, de maior preferência pelo menos 95 por cento de identidade de sequência, ainda de preferência pelo menos 98 por cento de identidade de sequência e ainda de maior preferência pelo menos 99 por cento de identidade de sequência. De preferência, as posições de resíduos que não são idênticas diferem por substituições de aminoácidos conservativas. As substituições de aminoácidos conservativas referem-se à capacidade de alternância de resíduos possuindo cadeias laterais semelhantes. Por exemplo, um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais alifáticas é glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais hidroxilo alifáticas é serina e treonina; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais contendo amida é asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais aromáticas é fenilalanina, tirosina e triptofano; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais básicas é lisina, arginina e histidina; e um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais contendo enxofre é cisteína e metionina. Os grupos de substituições de aminoácidos conservativas preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina.

Tal como aqui se utiliza, os termos "marcador" ou "marcado" referem-se à incorporação de outra molécula no anticorpo. Numa concretização, o marcador é um marcador detectável, p. ex., a incorporação de um aminoácido marcado radioactivamente ou ligação a um polipéptido de porções biotiniladas que podem ser detectadas através de avidina marcada (p. ex., estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou actividade enzimática que possa ser detectada através de métodos ópticos ou colorimétricos). Noutra

concretização, a etiqueta ou marcador pode ser terapêutico, p. ex., um conjugado de fármaco ou toxina. Vários métodos de marcação de polipéptidos e glicoproteínas são conhecidos na especialidade e podem ser utilizados. Exemplos de marcadores para polipéptidos incluem, mas não se limitam aos seguintes: radioisótopos ou radionuclídeos (p. ex., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (p. ex., FITC, rodamina, fósforos de lantanídeo), marcadores enzimáticos (p. ex., peroxidase de rábano, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), marcadores quimioluminescentes, grupos biotinilo, epítomos polipeptídicos predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (p. ex., sequências pares de fechos de leucina, locais de ligação a anticorpos secundários, domínios de ligação a metais, etiquetas epítopo), agentes magnéticos, tais como quelatos de gadolínio, toxinas tais como a toxina da tosse convulsa, taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, di-hidroxi-antracinaodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidro testosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puomicina e análogos ou seus homólogos. Nalgumas concretizações, os marcadores são ligados através de braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o potencial impedimento espacial.

O termo "agente" é aqui utilizado para denotar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica ou um extracto feito a partir de materiais biológicos.

A expressão "agente farmacêutico ou fármaco" tal como aqui se utiliza refere-se a um composto químico ou composição capaz de induzir um efeito terapêutico desejado quando adequadamente administrado a um paciente. Outros termos químicos são aqui utilizados de acordo com a utilização convencional na arte, tal como exemplificado por "The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms" (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

O termo paciente inclui indivíduos humanos e veterinários.

Ao longo desta descrição e reivindicações, a palavra "compreende" ou variações tais como "compreendem" ou "compreendendo" serão entendidas como implicando a inclusão de um inteiro ou grupo de inteiros referidos mas não a exclusão de qualquer outro inteiro ou grupo de inteiros.

Anticorpos Humanos e Humanização de Anticorpos

Os anticorpos humanos evitam certos dos problemas associados a anticorpos que possuem regiões variáveis e/ou constantes de ratinho ou rato. A presença de tais proteínas derivadas de ratinho ou rato podem levar à rápida eliminação dos anticorpos ou podem levar à criação de uma resposta imunitária contra o anticorpo por um paciente. Espera-se que os anticorpos anti-IL-5 completamente humanos minimizem as respostas imunogénicas e alérgicas intrínsecas a Mab de ratinho ou derivados de ratinho e aumentem assim a eficácia e segurança dos anticorpos administrados. Pode-se esperar que a utilização de anticorpos completamente humanos proporcione uma vantagem substancial no tratamento de doenças humanas crónicas e recorrentes, tais como inflamação e cancro, que possam requerer administrações de anticorpos repetidas.

Métodos de Produção de Anticorpos e Linhas Celulares Produtoras de Anticorpos

Imunização

Numa concretização, anticorpos humanos são produzidos através de imunização de um animal não humano compreendendo parte ou todo o *locus* de uma imunoglobulina humana com um antigénio de IL-5 ou seu fragmento imunogénico. Numa concretização preferida, o animal não humano é um XenoMouseTM.

O XenoMouseTM é uma estirpe de ratinho modificada que compreende grandes fragmentos dos *loci* de imunoglobulinas humanas e é deficiente na produção de anticorpos de ratinho. Ver, p. ex., Green et al., *Nature Genetics* 7: 13-21, 1994; e Patentes dos Estados Unidos 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 e 6130364. Ver também WO 91/10741, publicado a 25 de Julho de 1991, WO 94/02602 publicado a 3 de Fevereiro de 1994, WO 96/34096 e WO 96/33735

ambos publicados a 31 de Outubro de 1996, WO 98/16654 publicado a 23 de Abril de 1998, WO 98/24893 publicado a 11 de Junho de 1998, WO 98/50433 publicado a 12 de Novembro de 1998, WO 99/45031 publicado a 10 de Setembro de 1999, WO 99/53049 publicado a 21 de Outubro de 1999, WO 00/09560 publicado de 24 de Fevereiro de 2000 e WO 00/037504 publicado a 29 de Junho de 2000.

As estirpes de XenoMouseTM foram modificadas com cromossomas artificiais de levedura (YAC) contendo fragmentos com configuração da linha germinativa de 245 kb e 190 kb de tamanho do *locus* da cadeia pesada e do *locus* da cadeia leve capa humanos, respectivamente, que continham sequências centrais da região variável e constante. *Id.* O XenoMouseTM produz um repertório humano semelhante ao do adulto de anticorpos completamente humanos e gera anticorpos monoclonais (Mab) humanos específicos do antigénio. Uma segunda geração de XenoMouseTM contém aproximadamente 80% do repertório de anticorpos humanos através da introdução de fragmentos YAC de configuração da linha germinativa com um tamanho de megabases dos *loci* da cadeia pesada e *loci* da cadeia leve capa humanos. Ver Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15: 146-156, 1997; Green e Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188: 483-495, 1998; e Patente US 7064244, apresentada a 3 de Dezembro de 1996.

Noutra concretização, os animais não humanos compreendendo *loci* de genes de imunoglobulinas humanas são animais que têm um "*minilocus*" de imunoglobulinas humanas. Na abordagem do *minilocus*, um *locus* de Ig exógeno é imitado através da inclusão de genes individuais do *locus* de Ig. Assim, um ou mais dos genes de V_H, um ou mais dos genes de D_H, um ou mais dos genes de J_H, uma região constante mu e uma segunda região constante (de preferência uma região constante gama) são formados numa construção para inserção num animal. Esta abordagem é descrita, *inter alia*, nas Patentes US 5545807, 5545806, 5625825, 5625126, 5633425, 5661016, 5770429, 5789650, 5814318, 5591669, 5612205, 5721367, 5789215 e 5643763.

Uma vantagem da abordagem do *minilocus* é a rapidez com que construções incluindo porções do *locus* de Ig podem ser geradas e introduzidas em animais. No entanto, uma potencial

desvantagem da abordagem do *minilocus* é que pode não haver suficiente diversidade de imunoglobulinas para suportar o desenvolvimento completo de células B, como tal pode haver menor produção de anticorpos.

Ácidos Nucleicos, Vectores, Células Hospedeiras e Métodos Recombinantes de Mascaram Anticorpos

Ácidos Nucleicos

Estão também englobadas moléculas de ácido nucleico codificando anticorpos humanos anti-IL-5 tal como definido nas reivindicações anexas. Numa concretização, a molécula de ácido nucleico codifica uma cadeia pesada e/ou leve de uma imunoglobulina humana anti-IL-5 intacta. Numa concretização preferida, uma única molécula de ácido nucleico codifica uma cadeia pesada de uma imunoglobulina humana anti-IL-5 e outra molécula de ácido nucleico codifica a cadeia leve de uma imunoglobulina humana anti-IL-5. Numa concretização mais preferida, a imunoglobulina codificada é uma IgG humana. A cadeia leve codificada pode ser uma cadeia λ ou uma cadeia κ . Numa concretização ainda mais preferida, a cadeia leve codificada é uma cadeia κ .

Em concretizações preferidas, a molécula de ácido nucleico codificando a região variável da cadeia pesada (VH) é derivada de um gene humano de VH DP-47/3-11. Em várias concretizações, a molécula de ácido nucleico codificando a VH não contém mais de dez, não mais de seis ou não mais de três mudanças de aminoácidos do gene DP-47/3-11 da linha germinativa. Numa concretização preferida, a molécula de ácido nucleico codificando a VH contém pelo menos uma mudança de aminoácidos em comparação com a sequência da linha germinativa que é idêntica à mudança de aminoácidos na sequência da linha germinativa da cadeia pesada do anticorpo 20.13.3. Numa concretização ainda mais preferida, a VH contém pelo menos três mudanças de aminoácidos em comparação com as sequências da linha germinativa que são idênticas a pelo menos três mudanças de aminoácidos na sequência da linha germinativa da VH do anticorpo 20.13.3.

Nalgumas concretizações, a molécula de ácido nucleico compreende ainda uma sequência nucleotídica derivada de um gene do segmento de diversidade D1-20 humano. Ainda noutras concretizações, a molécula de ácido nucleico compreende ainda uma sequência nucleotídica derivada de um JH4B humano.

A Tabela 1 lista as sequências de ácido nucleico e as correspondentes sequências de aminoácidos que estas codificam, do anticorpo 20.13.3 ou suas porções.

Tabela 1. LISTA DE SEQUÊNCIAS PARA MAB 20.13.3 OU SUAS PORÇÕES

SEQ ID NO:	INFORMAÇÃO DA SEQUÊNCIA
1	Sequência de ADN Completa da Cadeia Pesada
2	Sequência PROTEICA Completa da Cadeia Pesada
3	Sequência de ADN Completa da Cadeia Leve
4	Sequência PROTEICA Completa da Cadeia Leve
5	Sequência de ADN da região variável (V _H) da Cadeia Pesada
6	Sequência PROTEICA da região variável (V _H) da Cadeia Pesada
7	Sequência de ADN de CDR1 de V _H
8	Sequência PROTEICA de CDR1 de V _H
9	Sequência de ADN de CDR2 de V _H
10	Sequência PROTEICA de CDR2 de V _H
11	Sequência de ADN de CDR3 de V _H
12	Sequência PROTEICA de CDR3 de V _H
13	Sequência de ADN de CDR1 de V _L
14	Sequência PROTEICA de CDR1 de V _L
15	Sequência de ADN de CDR2 de V _L
16	Sequência PROTEICA de CDR2 de V _L
17	Sequência de ADN de CDR3 de V _L
18	Sequência PROTEICA de CDR3 de V _L

Em concretizações preferidas, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácidos da VH do anticorpo 20.13.3 pelo menos

desde a CDR1 até à CDR3 tal como mostrado na Tabela 2. É também aqui divulgada uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácidos de uma ou mais das CDR da cadeia pesada do anticorpo 20.13.3. Noutra concretização, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo monoclonal 20.13.3 mostrada em SEQ ID NO:2. Noutra concretização, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência nucleotídica codificando a cadeia pesada do anticorpo monoclonal 20.13.3 mostrada em SEQ ID NO:1. É aqui também divulgada uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica codificando uma ou mais das CDR da cadeia pesada do anticorpo monoclonal 20.13.3 mostradas na Tabela 2 ou mostradas em SEQ ID NO: 8, 10 e 12, respectivamente.

Tabela 2. SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS (SEQ ID NO:2) DA CADEIA PESADA DO ANTICORPO MONOCLONAL 20.13.3

O péptido de sinal, os primeiros 19 aminoácidos, está sublinhado. As regiões determinantes de complementaridade 1-3 (CDR1, CDR2 e CDR3) estão a negrito e sublinhadas.	
1	<u>MEFGLSWLFL VAILKGVQCE</u> <u>VQLLES</u> GGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS <u>PÉPTIDO DE SINAL</u>
51	<u>YAMSWVRQAP GKGLEWVSTI</u> <u>SGSGGSTYYA DSVKGRFTIS</u> RDNSKNTLYL
	CDR1 CDR2
101	<u>QMNSLRAEDT AVYYCAKERY</u> <u>NWNYLHYWGQ</u> GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA
	CDR3 ▲'COMECA CH1
151	PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201	YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPSCPAP
251	EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV
301	EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI
351	EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
401	SNGQPENNYK TIPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL
451	HNHYTQKSLS LSLGK

Noutras concretizações do presente invento, as moléculas de ácido nucleico acima descritas podem hibridar sob condições altamente rigorosas, tais como as descritas acima, com qualquer uma das sequências de ácido nucleico descritas acima,

até ao ponto em que estas estejam englobadas pelas reivindicações anexas.

Noutras concretizações, a molécula de ácido nucleico codificando a região variável da cadeia leve do anticorpo compreende uma sequência nucleotídica derivada de um gene de V_K 08/018 humano. A referida molécula de ácido nucleico pode conter até dez, até 6 ou até 3 mudanças de aminoácidos do gene de V_K 08/018 da linha germinativa. Em concretizações preferidas, a molécula de ácido nucleico contém pelo menos três mudanças de aminoácidos em comparação com a sequência de V_K da linha germinativa que são idênticas às mudanças da linha germinativa verificadas no anticorpo monoclonal 20.13.3. Noutras concretizações, qualquer uma das moléculas de ácido nucleico antecedentes compreende ainda uma sequência nucleotídica derivada de um gene do segmento de união humano J_K4.

Em concretizações preferidas, uma molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve do anticorpo monoclonal 20.13.3, pelo menos desde a CDR1 até à CDR3 tal como mostrado na Tabela 3. É também aqui divulgada uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácidos de uma ou mais das CDR da cadeia leve do anticorpo 20.13.3. Noutra concretização, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica codificando a sequência de aminoácidos da cadeia leve do anticorpo monoclonal 20.13.3 (SEQ ID NO:4). Noutra concretização, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica mostrada em SEQ ID NO:3. É também aqui divulgada uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos de uma ou mais das CDR mostrada em SEQ ID NO:14, 16 e 18.

Tabela 3. SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS (SEQ ID NO:4) DA CADEIA LEVE DO ANTICORPO MONOCLONAL 20.13.3

O péptido de sinal, os primeiros 22 aminoácidos, está sublinhado. Nota: É incerto se o péptido de sinal começa com "MDMRV..." ou "MRV...". As regiões determinantes de complementaridade 1-3 (CDR1, CDR2 e CDR3) estão a negrito e sublinhadas.	
1	<u>MDMRVPAQLL GLLLLWLSGARCDIQMTQSP SLSASVGDR VTITCQASQD</u> CDR1
51	<u>IINYNWYQQ KPGKAPKLLI YSASNLETRV PSRFGSGSG TDFTFTISL</u> CDR1 CDR2
101	<u>QPEDIATYYC QQYDNHPLTF</u> GGGTKVEIRR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG CDR3 ▲ COMEÇA CL1
151	TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST
201	LTLISKADYEK KVIYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

Noutra concretização, a molécula de ácido nucleico codificando uma VL pode hibridar sob condições altamente rigorosas, tais como as descritas acima, com uma sequência de ácido nucleico codificando uma VL descrita imediatamente acima, até ao ponto em que o ácido nucleico esteja englobado pelas reivindicações anexas.

Uma molécula de ácido nucleico codificando a cadeia pesada inteira ou a leve inteira de um anticorpo anti-IL-5 ou as suas regiões variáveis podem ser obtidas a partir de qualquer fonte que produza um anticorpo anti-IL-5. Numa concretização do presente invento, as moléculas de ácido nucleico podem ser obtidas a partir de um hibridoma que expresse um anticorpo anti-IL-5. Os métodos de isolamento de ARNm codificando um anticorpo são bem conhecidos na arte. Ver, p. ex., Sambrook et al. O ARNm pode ser utilizado para produzir ADNc para utilizar na reacção em cadeia da polimerase (PCR) ou clonagem de ADNc de genes do anticorpo. Numa concretização preferida, a molécula de ácido nucleico é derivada de um hibridoma que tenha como um dos seus parceiros de fusão uma célula de um animal transgénico que expresse genes de imunoglobulinas humanas. Numa concretização ainda mais preferida, a célula animal parceira de fusão é derivada de um animal XenoMouseTM. Noutra concretização, o hibridoma é

derivado de um animal transgênico não humano, não ratinho tal como descrito acima.

Numa concretização preferida, a cadeia pesada de um anticorpo anti-IL-5 pode ser construída através da fusão de uma molécula de ácido nucleico codificando o domínio variável de uma cadeia pesada com um domínio constante de uma cadeia pesada. De modo semelhante, a cadeia leve de um anticorpo anti-IL-5 pode ser construída através da fusão de uma molécula de ácido nucleico codificando o domínio variável de uma cadeia leve com um domínio constante de uma cadeia leve. Numa concretização mais preferida, o ácido nucleico codificando a região variável da cadeia pesada codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6 e a molécula de ácido nucleico codificando a região variável das cadeias leves codifica a sequência de aminoácidos do resíduo 23-130 de SEQ ID NO:4. A sequência de aminoácidos do resíduo 139-465 de SEQ ID NO:2 representa a sequência de aminoácidos da região constante da cadeia pesada de 20.13.3 e a sequência de aminoácidos do resíduo 131-236 de SEQ ID NO:4 representa a sequência de aminoácidos da região constante da cadeia leve de 20.13.3. A sequência de ácido nucleico do nucleótido 415-709, 1102-1137, 1256-1585 e 1683-2002 de SEQ ID NO:1 representa a sequência de ácido nucleico codificando a região constante da cadeia pesada de 20.13.3 e a sequência de ácido nucleico do nucleótido 391-708 de SEQ ID NO:3 representa a sequência de ácido nucleico codificando a região constante da cadeia leve de 20.13.3. Numa concretização preferida, a molécula de ácido nucleico codificando o domínio constante da cadeia pesada codifica a sequência de aminoácidos do resíduo 139-465 de SEQ ID NO:2 e a molécula de ácido nucleico codificando o domínio constante da cadeia leve codifica a sequência de aminoácidos do resíduo 131-236 de SEQ ID NO:4. Numa concretização ainda mais preferida, a molécula de ácido nucleico codificando o domínio constante da cadeia pesada tem a sequência de ácido nucleico do nucleótido 415-709, 1102-1137, 1256-1585 e 1683-2002 de SEQ ID NO:1 e a molécula de ácido nucleico codificando o domínio constante da cadeia leve tem a sequência de ácido nucleico da sequência de ácido nucleico do nucleótido 391-708 de SEQ ID NO:3.

Noutra concretização, pode ser isolada a própria célula produtora de anticorpo anti-IL-5 a partir de um animal não humano. O animal transgénico pode ser um ratinho, tal como um ratinho XenoMouseTM, ou outro animal transgénico não humano. Noutra concretização, a célula produtora de anticorpo anti-IL-5 é derivada de um animal não transgénico.

Noutra concretização, as moléculas de ácido nucleico podem ser utilizadas para produzir vectores utilizando métodos conhecidos dos vulgares peritos na arte. Ver, p. ex., Sambrook *et al.* e Ausubel *et al.* Numa concretização, os vectores podem ser vectores plasmídicos ou cosmídicos. Noutra concretização, os vectores podem ser vectores virais. Os vectores virais incluem, sem limitação, adenovírus, retrovírus, vírus adeno-associados e outros picornavírus, vírus da hepatite e baculovírus. Os vectores podem também ser bacteriófagos incluindo, sem limitação, M13.

As moléculas de ácido nucleico podem ser utilizadas para expressar de modo recombinante grandes quantidades de anticorpos anti-IL-5, tal como descrito abaixo. As moléculas de ácido nucleico podem também ser utilizadas para produzir anticorpos quiméricos, anticorpos de cadeia simples, imunoadesinas, diacorpos, anticorpos mutados e derivados de anticorpo, tal como descrito mais abaixo.

Numa concretização, as moléculas de ácido nucleico codificando a região variável das cadeias pesadas (VH) e leves (VL) são convertidas em genes de anticorpo inteiros. Numa concretização, tais moléculas de ácido nucleico são inseridas em vectores de expressão compreendendo já sequências codificando as regiões constantes da cadeia pesada ou constantes da cadeia leve, respectivamente, para que o segmento VH ou VL fique operativamente ligado ao segmento ou segmentos CH ou CL, respectivamente, dentro do vector. Noutra concretização, as moléculas de ácido nucleico codificando as cadeias VH e/ou VL são convertidas em genes de anticorpo inteiros através da ligação da molécula de ácido nucleico codificando uma cadeia VH a uma molécula de ácido nucleico codificando uma cadeia CH utilizando técnicas de biologia molecular padrão. O mesmo pode ser alcançado utilizando moléculas de ácido nucleico codificando as cadeias VL e CL. As

sequências dos genes das regiões constantes das cadeias pesadas e leves humanas são conhecidos na arte. Ver, p. ex., Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed., N° Publ. NIH 91-3242, 1991.

Vectores

Para expressar os anticorpos, ou porções de anticorpo tal como divulgado, inserem-se ADN codificando cadeias leves e pesadas parciais ou inteiras, obtidos tal como descrito acima, em vectores de expressão, de modo a que os genes fiquem operativamente ligados a sequências de controlo da transcrição e da tradução. Os vectores de expressão incluem plasmídeos, retrovírus, cosmídeos, YAC, epissomas derivados de EBV e semelhantes. O gene do anticorpo é ligado num vector de modo a que as sequências de controlo da transcrição e da tradução dentro do vector sirvam a sua função pretendida de regular a transcrição e a tradução do gene do anticorpo. O vector de expressão e as sequências de controlo da expressão são escolhidos para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão utilizada. O gene da cadeia leve do anticorpo e o gene da cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos em vectores separados. Numa concretização preferida, ambos os genes são inseridos no mesmo vector de expressão. Os genes do anticorpo são inseridos no vector de expressão através de métodos padrão (p. ex., ligação de locais de restrição complementares no fragmento do gene do anticorpo e no vector, ou ligação de extremidades cegas se não estiverem presentes locais de restrição).

Um vector conveniente é um que codifica uma sequência de CH ou CL de imunoglobulina humana completa, com locais de restrição apropriados inseridos de modo a que qualquer sequência de VH ou VL possa ser facilmente inserida e expressa, tal como descrito acima. Em tais vectores, ocorre normalmente processamento alternativo entre o local dador de união na região J inserida e o local aceitador da união que precede a região C humana e também nas regiões de união que ocorrem dentro dos exões de CH humanos. A poliadenilação e a terminação da transcrição ocorrem em locais cromossómicos nativos a jusante das regiões de codificação. O vector de expressão recombinante pode também codificar um péptido de

sinal que facilite a secreção da cadeia de anticorpo a partir de uma célula hospedeira. O gene da cadeia de anticorpo pode ser clonado no vector de modo a que o péptido de sinal fique ligado enquadrado com o terminal amino do gene da cadeia do anticorpo. O péptido de sinal pode ser um péptido de sinal de imunoglobulina ou um péptido de sinal heterólogo (i.e., um péptido de sinal de uma proteína não imunoglobulina).

Para além dos genes das cadeias do anticorpo, os vectores de expressão recombinante do presente invento possuem sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes das cadeias do anticorpo numa célula hospedeira. Será apreciado pelos peritos na especialidade que o desenho do vector de expressão, incluindo a selecção de sequências reguladoras pode depender de factores tais como a escolha da célula hospedeira a transformar, o nível de expressão da proteína desejada, etc. Sequências reguladoras preferidas para expressão de células hospedeiras de mamífero incluem elementos virais que dirigem elevados níveis de expressão proteica em células de mamífero, tais como promotores e/ou estimuladores derivados de LTR retrovirais, citomegalovírus (CMV) (tais como o promotor/estimulador de CMV), Vírus Símio 40 (SV40) (tal como o promotor/estimulador de SV40), adenovírus (p. ex., o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)), poliovírus e promotores fortes de mamífero tais como promotores nativos de imunoglobulinas e da actina. Para mais descrições de elementos reguladores virais e suas sequências, ver p. ex., Patente U.S. 5168062 de Stinski, Pat. U.S. 4510245 de Bell *et al.* e Pat. U.S. 4968615 de Schaffner *et al.*

Para além dos genes das cadeias do anticorpo e das sequências reguladoras, os vectores de expressão recombinante do presente invento podem possuir sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vector em células hospedeiras (p. ex., origens de replicação) e genes marcadores seleccionáveis. O gene marcador seleccionável facilita a selecção de células hospedeiras nas quais o vector foi introduzido (ver p. ex., Pat. U.S. 4399216, 4634665 e 5179017, todas de Axel *et al.*). Por exemplo, tipicamente o gene marcador seleccionável confere resistência a fármacos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, numa célula hospedeira na qual o vector foi introduzido. Genes marcadores

seleccionáveis preferidos incluem o gene da di-hidrofolato-redutase (DHFR) (para utilizar em células hospedeiras *dhfr*⁻ com selecção/amplificação em metotrexato) e o gene *neo* (para selecção em G418).

Células Hospedeiras Que Não Híbridomas e Métodos de Produção Recombinante de Proteínas

As moléculas de ácido nucleico codificando anticorpos anti-IL-5 e os vectores compreendendo estes anticorpos podem ser utilizados para transformação de uma célula hospedeira de mamífero adequada. A transformação pode ser através de qualquer método conhecido para introdução de polinucleótidos numa célula hospedeira. Os métodos para introdução de polinucleótidos heterólogos em células de mamífero são bem conhecidos na especialidade e incluem transfecção mediada por dextrano, precipitação em fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, electroporação, encapsulação do polinucleótido ou polinucleótidos em lipossomas e micro-injecção directa do ADN em núcleos. Adicionalmente, as moléculas de ácido nucleico podem ser introduzidas em células de mamífero através de vectores virais. Os métodos de transformação de células são bem conhecidos na arte. Ver, p. ex., Patentes U.S. 4399216, 4912040, 4740461 e 4959455.

As linhas celulares de mamífero disponíveis como hospedeiros para expressão são bem conhecidas na especialidade e incluem muitas linhas celulares imortalizadas disponíveis em American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluem, *inter alia*, células de ovário de *hamster* chinês (CHO), NS0, células SP2, células HeLa, células de rim de *hamster* bebé (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ex., Hep G2), células A549 e várias outras linhas celulares. As linhas celulares de particular preferência são seleccionadas através da determinação de quais as linhas celulares que têm elevados níveis de expressão. Outras linhas celulares que podem ser utilizadas são linhas celulares de insecto, tais como células Sf9. Quando os vectores de expressão recombinante codificando os genes do anticorpo são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos através da cultura das células

hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, de preferência, a secreção do anticorpo para o meio de cultura no qual as células hospedeiras são criadas. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura utilizando métodos padrão de purificação de proteínas.

Mais, a expressão de anticorpos (ou outras suas porções) a partir de linhas celulares de produção pode ser estimulada utilizando várias técnicas conhecidas. Por exemplo, o sistema de expressão do gene da glutamina-sintase (o sistema GS) é uma abordagem comum para estimular a expressão sob certas condições. O sistema GS é discutido na totalidade ou em parte em ligação com as Patentes Europeias 0216846, 0256055 e 0323997 e o Pedido de Patente Europeia EP-A-0338841.

Animais Transgênicos

Os anticorpos do presente invento podem também ser produzidos de modo transgênico através da criação de um mamífero ou de uma planta que seja transgênico para as sequências das cadeias pesadas e leves de imunoglobulina de interesse e produção do anticorpo numa forma recuperável a partir deste. Em ligação com a produção transgênica em mamíferos, os anticorpos podem ser produzidos e recuperados a partir do leite de cabras, vacas ou outros mamíferos. Ver, p. ex., Patentes U.S. 5827690, 5756687, 5750172 e 5741957. Numa concretização, animais transgênicos não humanos que compreendem loci de imunoglobulinas humanas são imunizados com IL-5 ou uma sua porção. Pode-se produzir tais animais transgênicos utilizando métodos descritos nas Patentes dos Estados Unidos 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 e 6130364. Ver também WO 91/10741, publicado a 25 de Julho de 1991, WO 94/02602, publicado a 3 de Fevereiro de 1994, WO 96/34096 e WO 96/33735, ambos publicados a 31 de Outubro de 1996, WO 98/16654, publicado a 23 de Abril de 1998, WO 98/24893, publicado a 11 de Junho de 1998, WO 98/50433, publicado a 12 de Novembro de 1998, WO 99/45031, publicado a 10 de Setembro de 1999, WO 99/53049, publicado a 21 de Outubro de 1999, WO 00/09560, publicado a 24 de Fevereiro de 2000 e WO 00/037504, publicado a 29 de Junho de 2000. Noutra concretização, os animais transgênicos podem compreender um

"*minilocus*" de genes de imunoglobulinas humanas. Os métodos aqui divulgados podem ser modificados tal como descrito, *inter alia*, Patente dos Estados Unidos 5994619. Numa concretização preferida, os animais não humanos podem ser ratos, ovelhas, porcos, cabras, gado ou cavalos. Noutra concretização, os animais transgénicos compreendem moléculas de ácido nucleico codificando anticorpos anti-IL-5. Numa concretização preferida, os animais transgénicos compreendem moléculas de ácido nucleico codificando cadeias pesadas e leves específicas para IL-5. Noutra concretização, os animais transgénicos compreendem moléculas de ácido nucleico codificando um anticorpo modificado tal como um anticorpo de cadeia simples, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado. Os anticorpos anti-IL-5 podem ser produzidos em qualquer animal transgénico. Numa concretização preferida, os animais não humanos são ratinhos, ratos, ovelhas, porcos, cabras, gado ou cavalos.

Mudança de Classe

Outro aspecto é proporcionar um mecanismo através do qual a classe de um anticorpo anti-IL-5 pode ser mudada para outra. Num aspecto do presente invento, uma molécula de ácido nucleico codificando VL ou VH é isolada utilizando métodos bem conhecidos na especialidade de modo a que não inclua quaisquer sequências de ácido nucleico codificando CL ou CH. A molécula de ácido nucleico codificando VL ou VH são então operativamente ligadas a uma sequência de ácido nucleico codificando uma CL ou CH de uma classe diferente de molécula de imunoglobulina. Isto pode ser alcançado utilizando um vector ou uma molécula de ácido nucleico que compreenda uma cadeia CL ou CH, tal como descrito acima. Por exemplo, um anticorpo anti-IL-5 que era originalmente IgM pode ser mudado de classe para uma IgG. Mais, a mudança de classe pode ser utilizada para converter uma subclasse de IgG noutra, p. ex., de IgG1 para IgG2.

Derivados de Anticorpo

Pode-se utilizar as moléculas de ácido nucleico descritas acima para gerar derivados de anticorpo utilizando técnicas e métodos conhecidos de um vulgar perito na arte.

Anticorpos Mutados

Noutra concretização, as moléculas de ácido nucleico, vectores e células hospedeiras podem ser utilizados para produzir anticorpos anti-IL-5 mutados. Os anticorpos podem ser mutados nos domínios variáveis das cadeias pesadas e/ou leves para alterar uma propriedade de ligação do anticorpo. Por exemplo, pode ser feita uma mutação numa ou mais das regiões CDR para aumentar ou diminuir a K_d do anticorpo para IL-5, para aumentar ou diminuir a K_{off} , ou para alterar a especificidade de ligação do anticorpo. As técnicas em mutagénese dirigida ao local são bem conhecidas na arte. Ver, p. ex., Sambrook *et al.* e Ausubel *et al.*, *supra*. Numa concretização preferida, são feitas mutações num resíduo de aminoácido que se sabe estar mudado em comparação com a linha germinativa numa região variável de um anticorpo anti-IL-5. Numa concretização mais preferida, são feitas uma ou mais mutações num resíduo de aminoácido que se sabe estar mudado em comparação com a linha germinativa numa região variável de um dos anticorpos anti-IL-5 do presente invento. Noutra concretização, as moléculas de ácido nucleico são mutadas numa ou mais das regiões estruturais. Pode ser feita uma mutação numa região estrutural ou num domínio constante para aumentar a semivida do anticorpo anti-IL-5. Ver, p. ex., Pedido dos Estados Unidos US 2002/0142374 A1, apresentado a 17 de Agosto de 1999. Pode também ser feita uma mutação numa região estrutural ou num domínio constante para alterar a imunogenicidade do anticorpo, para proporcionar um local para ligação covalente ou não covalente a outra molécula, ou para alterar propriedades tais como a fixação do complemento. Podem ser feitas mutações em cada uma das regiões estruturais, no domínio constante e nas regiões variáveis num único anticorpo mutado. Alternativamente, podem ser feitas mutações em apenas uma das regiões estruturais, nas regiões variáveis ou no domínio constante num único anticorpo mutado.

Numa concretização, não existem mais de dez mudanças de aminoácidos em qualquer uma das regiões VH ou VL do anticorpo anti-IL-5 mutado em comparação com o anticorpo anti-IL-5 antes da mutação. Numa concretização mais preferida, não existem mais de cinco mudanças de aminoácidos em qualquer uma das regiões VH ou VL do anticorpo anti-IL-5 mutado, de maior

preferência não mais de três mudanças de aminoácidos. Noutra concretização, não existem mais de quinze mudanças de aminoácidos nos domínios constantes, de maior preferência, não mais de dez mudanças de aminoácidos, sendo preferível não mais de cinco mudanças de aminoácidos.

Anticorpos de Fusão e Imunoadesinas

Noutra concretização, pode ser produzido um anticorpo de fusão ou imunoadesina que compreenda todo ou uma porção de um anticorpo anti-IL-5 ligado a outro polipéptido. Numa concretização preferida, apenas as regiões variáveis do anticorpo anti-IL-5 estão ligadas ao polipéptido. Noutra concretização preferida, o domínio VH de um anticorpo anti-IL-5 é ligado a um primeiro polipéptido, enquanto o domínio VL de um anticorpo anti-IL-5 é ligado a um segundo polipéptido que se associa com o primeiro polipéptido de um modo em que os domínios VH e VL possam interagir um com o outro para formar um local de ligação do anticorpo. Noutra concretização preferida, o domínio VH é separado do domínio VL através de um ligante de modo a que os domínios VH e VL possam interagir um com o outro (ver abaixo sob Anticorpos de Cadeia Simples). O anticorpo VH-ligante-VL é então ligado ao polipéptido de interesse. O anticorpo de fusão é útil para dirigir um polipéptido para uma célula ou tecido que expresse IL-5. O polipéptido pode ser um agente terapêutico, tal como uma toxina, um factor de crescimento ou outra proteína reguladora ou pode ser um agente de diagnóstico, tal como uma enzima que possa ser facilmente visualizada, tal como uma peroxidase de rábano. Adicionalmente, podem ser criados anticorpos de fusão em que dois (ou mais) anticorpos de cadeia simples são ligados um ao outro. Isto é útil se se pretender criar um anticorpo bivalente ou polivalente numa cadeia polipeptídica simples ou se se pretender criar um anticorpo biespecífico. Numa concretização, o anticorpo de fusão ou imunoadesina é preparado utilizando as regiões variáveis do anticorpo monoclonal 20.13.3. Noutra concretização, o anticorpo de fusão ou imunoadesina é preparado utilizando uma ou mais regiões CDR de um anticorpo anti-IL-5, tal como de 20.13.3.

Anticorpos de Cadeia Simples

Para criar um anticorpo de cadeia simples (scFv), os fragmentos de ADN codificando VH e VL são operativamente ligados a outro fragmento codificando um ligante flexível, p. ex., codificando a sequência de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de modo a que as sequências de VH e VL possam ser expressas como uma proteína de cadeia simples contígua, com as regiões VL e VH unidas através do ligante flexível (ver p. ex., Bird *et al.*, *Science* 242: 423-426, 1988; Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883, 1988; McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-554, 1990). O anticorpo de cadeia simples pode ser monovalente, se apenas forem utilizadas uma VH e VL, bivalente, se forem utilizadas duas VH e VL, ou polivalente, se forem utilizadas mais de duas VH e VL.

Numa concretização, o anticorpo de cadeia simples é preparado utilizando uma ou mais das regiões variáveis do anticorpo monoclonal 20.13.3. Noutra concretização, o anticorpo de cadeia simples é preparado utilizando uma ou mais regiões CDR do referido anticorpo anti-IL-5.

Capacorpos, Minicorpos, Diacorpos e Janusinas

Noutra concretização, podem ser preparados outros anticorpos modificados utilizando moléculas de ácido nucleico codificando anti-IL-5. Por exemplo, "Capacorpos" (Ill *et al.*, *Protein Eng.* 10: 949-57, 1997), "Minicorpos" (Martin *et al.*, *EMBO J.* 13: 5303-9, 1994), "Diacorpos" (Holliger *et al.*, *PNAS USA* 90: 6444-6448, 1993), ou "Janusinas" (Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655-3659, 1991 e Traunecker *et al.* "Janusin: new molecular design for bispecific reagents", *Int. J. Cancer*, Supl. 7: 51-52, 1992) podem ser preparados utilizando técnicas padrão de biologia molecular seguindo os ensinamentos do fascículo.

Numa concretização, os anticorpos modificados são preparados utilizando uma ou mais das regiões variáveis do anticorpo monoclonal 20.13.3. Noutra concretização, o anticorpo modificado é preparado utilizando uma ou mais das regiões CDR do referido anticorpo anti-IL-5.

Anticorpos Quiméricos

Noutro aspecto, podem ser gerados anticorpos biespecíficos. Numa concretização, pode ser gerado um anticorpo quimérico que se ligue especificamente a IL-5 através de um domínio de ligação e a uma segunda molécula através de um segundo domínio de ligação. O anticorpo quimérico pode ser produzido através de técnicas de biologia molecular recombinantes ou podem ser fisicamente conjugadas uma com a outra. Adicionalmente, pode ser gerado um anticorpo de cadeia simples contendo mais de uma VH e VL que se ligue especificamente a IL-5 e a outra molécula. Tais anticorpos biespecíficos podem ser gerados utilizando técnicas que são bem conhecidas, por exemplo, Fanger *et al.*, *Immunol. Methods* 4: 72-81, 1994 e Wright e Harris, *supra* e em ligação com (iii) ver p. ex., Traunecker *et al.*, *Int. J. Cancer* (Supl.) 7: 51-52, 1992. Numa concretização preferida, o anticorpo quimérico liga-se a IL-5 e a outra molécula envolvida na promoção da proliferação de eosinófilos e basófilos. Em concretizações preferidas, a outra molécula é eotaxina, IL-3 ou GM-CSF.

Numa concretização, os anticorpos quiméricos são preparados utilizando uma ou mais das regiões variáveis do anticorpo monoclonal 20.13.3. Noutra concretização, o anticorpo quimérico é preparado utilizando uma ou mais das regiões variáveis CDR do referido anticorpo anti-IL-5.

Anticorpos Derivados e Marcados

Um anticorpo ou porção de anticorpo pode ser derivada ou ligada a outra molécula (p. ex., outro péptido ou proteína). Em geral, os anticorpos ou suas porções são derivados de modo a que a ligação de IL-5 não seja afectada adversamente pela derivação ou marcação. Deste modo, os anticorpos e as porções de anticorpo podem incluir tanto formas intactas como modificadas dos anticorpos anti-IL-5 humanos aqui descritos. Por exemplo, um anticorpo ou porção de anticorpo pode ser funcionalmente ligado (através de ligação química, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, tal como outro anticorpo (p. ex., um anticorpo biespecífico ou um diacorpo), um agente de detecção, um agente citotóxico, um agente farmacêutico e/ou uma proteína ou péptido que possa mediar a associação do

anticorpo ou porção de anticorpo com outra molécula (tal como uma região central de estreptavidina ou uma etiqueta de polihistidina).

Um tipo de anticorpo derivado é produzido através de ligação cruzada de dois ou mais anticorpos β (do mesmo tipo ou de tipos diferentes, p. ex., para criar anticorpos biespecíficos). Ligantes cruzados adequados incluem os que são heterobifuncionais, possuindo dois grupos distintamente reactivos separados por um espaçador apropriado (p. ex., éster de m-maleimidobenzoíl-N-hidroxissuccinimida) ou homobifuncional (p. ex., suberato de di-succinimidilo). Tais ligantes estão disponíveis em Pierce Chemical Company, Rockford, III.

Outro tipo de anticorpo derivado é um anticorpo marcado. Agentes de detecção úteis com os quais um anticorpo ou porção de anticorpo do presente invento pode ser derivado incluem compostos fluorescentes, incluindo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloreto de 5-dimetilamino-1-naftalenossulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantanídeo e semelhantes. Um anticorpo pode também ser marcado com enzimas que sejam úteis para detecção, tais como peroxidase de rábano, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina, glicose-oxidase e semelhantes. Quando um anticorpo é marcado com uma enzima detectável, é detectado através da adição de reagentes adicionais que a enzima utiliza para produzir um produto reaccional que pode ser discernido. Por exemplo, quando está presente o agente peroxidase de rábano, a adição de peróxido de hidrogénio e diaminobenzidina conduz a um produto reaccional colorido, que é detectável. Um anticorpo pode também ser marcado com biotina e detectado através da medição indirecta da ligação de avidina ou estreptavidina. Um anticorpo pode também ser marcado com epítomos polipeptídicos predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (p. ex., sequências pares de fechos de leucina, locais de ligação a anticorpos secundários, domínios de ligação a metais, etiquetas epítopo). Nalgumas concretizações, os marcadores são ligados através de braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o potencial impedimento espacial.

Um anticorpo anti-IL-5 pode também ser marcado com um aminoácido marcado radioativamente. O marcador radioativo pode ser utilizado tanto para fins de diagnóstico como terapêuticos. O anticorpo anti-IL-5 marcado radioativamente pode ser utilizado em diagnóstico, por exemplo, para determinação dos níveis de IL-5 num indivíduo. Mais, o anticorpo anti-IL-5 marcado radioativamente pode ser utilizado terapêuticamente para tratamento, por exemplo, de doenças alérgicas caracterizadas por pronunciada infiltração de eosinófilos, tais como, sem limitação, asma, exacerbações da asma, episódios de agravamento da asma, pneumonia crónica, rinite alérgica, rinite alérgica perene, aspergilose broncopulmonar alérgica, hiper-eosinofilia, síndrome de Churg-Strauss, dermatite atópica, oncocercose, angiodema episódico, síndrome de eosinofilia-mialgia, doença celíaca, gastroenterite eosinofílica, infecções helmínticas, doença de Hodgkin, pólipos nasais, síndrome de Loeffler, urticária, bronquite hiper-eosinofílica, arterite nodosa, sinusite, sinusite crónica, esofagite eosinofílica, esofagite eosinofílica alérgica, conjuntivite alérgica. Exemplos de marcadores para polipéptidos incluem, mas não se limitam aos seguintes radioisótopos ou radionuclídeos - ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

Um anticorpo anti-IL-5 pode também ser derivado com um grupo químico tal como polietilenoglicol (PEG), um grupo metilo ou etilo ou um grupo hidrato de carbono. Estes grupos podem ser úteis para melhorar as características biológicas do anticorpo, p. ex., para aumentar a semivida sérica ou para aumentar a ligação aos tecidos.

Caracterização de Anticorpos Anti-IL-5

Classe e Subclasse de Anticorpos Anti-IL-5

A classe e subclasse de anticorpos anti-IL-5 podem ser determinadas através de qualquer método conhecido na arte. Em geral, a classe e subclasse de um anticorpo podem ser determinadas utilizando anticorpos que sejam específicos para uma determinada classe e subclasse de anticorpo. Tais anticorpos estão comercialmente disponíveis. A classe e subclasse podem ser determinadas através de ELISA, *Western blot* bem como outras técnicas. Alternativamente, a classe e

subclasse podem ser determinadas através da sequenciação de todos ou de uma porção dos domínios constantes das cadeias pesadas e/ou leves dos anticorpos, comparando as suas sequências de aminoácidos com as sequências de aminoácidos conhecidas de várias classes e subclasses de imunoglobulinas e determinando a classe e subclasse dos anticorpos.

Numa concretização, o anticorpo é um anticorpo policlonal. Noutra concretização, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. O anticorpo pode ser uma molécula IgG, IgM, IgE, IgA ou IgD. Numa concretização preferida, o anticorpo é uma IgG e é um subtipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Numa concretização mais preferida, os anticorpos anti-IL-5 são da subclasse IgG2. Noutra concretização preferida, os anticorpos anti-IL-5 são da mesma classe e subclasse que o anticorpo monoclonal 20.13.3.

Afinidade de Ligação de Anti-IL-5 a IL-5

Os anticorpos anti-IL-5 ligam-se a IL-5 com elevada afinidade. Os anticorpos ligam-se a IL-5 com substancialmente a mesma K_d que o anticorpo monoclonal 20.13.3.

A afinidade de ligação e a taxa de dissociação de um anticorpo anti-IL-5 a IL-5 podem ser determinadas através de qualquer método conhecido na arte. Numa concretização, a afinidade de ligação pode ser medida através de ELISA competitivos, RIA, BIAcore ou tecnologia KinExA. A taxa de dissociação pode também ser medida através de BIAcore ou tecnologia KinExA. Numa concretização, a afinidade de ligação e a taxa de dissociação são medidas através de ressonância plasmónica de superfície utilizando, p. ex., um BIAcore.

Identificação de Epítomos de IL-5 Reconhecidos pelo Anticorpo Anti-IL-5

A divulgação proporciona também um anticorpo anti-IL-5 que se liga ao mesmo antigénio ou epítopo que um anticorpo anti-IL-5 humano. Mais, a divulgação proporciona um anticorpo anti-IL-5 que compete de forma cruzada com um anticorpo anti-IL-5 humano. Numa concretização preferida, o anticorpo anti-IL-5 humano é o anticorpo monoclonal 20.13.3. Noutra concretização preferida, o anti-IL-5 humano compreende uma ou

mais CDR do anticorpo monoclonal 20.13.3. Numa concretização preferida, o anticorpo anti-IL-5 é outro anticorpo humano.

Pode-se determinar se um anticorpo anti-IL-5 se liga ao mesmo antigénio utilizando uma variedade de métodos conhecidos na arte. Por exemplo, pode-se determinar se um anticorpo anti-IL-5 de teste se liga ao mesmo antigénio através da utilização de um anticorpo anti-IL-5 para capturar um antigénio que se saiba ligar-se ao anticorpo anti-IL-5, tal como IL-5, eluindo o antigénio do anticorpo e depois determinando se o anticorpo de teste se liga ao antigénio eluído. Pode-se determinar se um anticorpo se liga ao mesmo epítopo que um anticorpo anti-IL-5 através da ligação do anticorpo anti-IL-5 a IL-5 sob condições saturantes e depois medindo a capacidade do anticorpo de teste para se ligar a IL-5. Se o anticorpo de teste for capaz de se ligar a IL-5 ao mesmo tempo que o anticorpo anti-IL-5, então o anticorpo de teste liga-se a um epítopo diferente do do anticorpo anti-IL-5. No entanto, se o anticorpo de teste não for capaz de se ligar a IL-5 ao mesmo tempo, então o anticorpo de teste liga-se ao mesmo epítopo que o anticorpo anti-IL-5 humano. Esta experiência pode ser efectuada utilizando ELISA, RIA ou ressonância plasmónica de superfície. Numa concretização preferida, a experiência é efectuada utilizando ressonância plasmónica de superfície. Numa concretização mais preferida, é utilizado BIAcore. Pode-se também determinar se um anticorpo anti-IL-5 compete de modo cruzado com um anticorpo anti-IL-5. Numa concretização preferida, pode-se determinar se um anticorpo anti-IL-5 compete de modo cruzado com outro através da utilização do mesmo método que é utilizado para medir se o anticorpo anti-IL-5 é capaz de se ligar ao mesmo epítopo que outro anticorpo anti-IL-5.

Utilização da Cadeia Leve e da Cadeia Pesada

A divulgação proporciona também um anticorpo anti-IL-5 que compreende sequências variáveis da cadeia leve codificadas por um gene de Vk humano e um gene de Jk humano. No anticorpo monoclonal 20.13.3, as cadeias leves κ utilizam um gene de Vk 08/018 humano unido a um gene de Jk4 humano.

Em concretizações preferidas, a região variável da cadeia leve dos anticorpos anti-IL-5 do presente invento contém as mesmas substituições de aminoácidos relativamente à sequência

de aminoácidos do gene 08/018 da linha germinativa, que o anticorpo monoclonal 20.13.3. Por exemplo, nalgumas concretizações, a região variável da cadeia leve do anticorpo anti-IL-5 pode conter uma ou mais das substituições de aminoácidos relativas à sequência da linha germinativa de 08/018 que estão presentes no anticorpo monoclonal 20.13.3. Deste modo, pode-se misturar e fazer coincidir características diferentes da ligação do anticorpo para alterar, p. ex., a afinidade do anticorpo a IL-5 ou a sua taxa de dissociação do antigénio.

Noutra concretização, a região variável da cadeia leve contém substituições de aminoácidos nas mesmas posições que no anticorpo monoclonal 20.13.3, mas utiliza diferentes aminoácidos nessas posições. De preferência a substituição é conservativa relativamente ao aminoácido presente nessa posição em 20.13.3. Por exemplo, se estiver presente glutamato em 20.13.3 numa determinada posição e o glutamato representar uma substituição em comparação com a linha germinativa, de acordo com o presente invento pode-se substituir de modo conservativo por aspartato nessa posição. De modo semelhante, se a substituição de aminoácido for serina, pode-se mudar a serina por treonina.

Noutra concretização preferida a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos que é a mesma da sequência de aminoácidos da VL do Mab 20.13.3. Noutra concretização altamente preferida, a cadeia leve compreende sequências de aminoácidos que são as mesmas das regiões CDR da cadeia leve do anticorpo monoclonal 20.13.3 (tal como mostrado na Tabela 3 e em SEQ ID NO: 14, 16 e 18, respectivamente).

Noutra concretização, o anticorpo ou a sua porção compreendem uma cadeia leve lambda.

É também proporcionado um anticorpo anti-IL-5 ou uma sua porção compreendendo uma cadeia pesada humana ou uma sequência derivada de uma cadeia pesada humana. Numa concretização, a sequência de aminoácidos da cadeia pesada é derivada de uma família de genes DP-47 de V_H . Numa concretização mais preferida, a cadeia pesada não compreende mais de oito mudanças de aminoácidos de V_H DP-47 da linha germinativa, de

maior preferência não mais de seis mudanças de aminoácidos e ainda de maior preferência não mais de três mudanças de aminoácidos.

Numa concretização preferida, a VH do anticorpo anti-IL-5 contém as mesmas substituições de aminoácidos, relativamente à sequência de aminoácidos da linha germinativa, que o Mab 20.13.3. Noutra concretização, as substituições de aminoácidos são feitas na mesma posição que as verificadas na VH do Mab 20.13.3, mas são feitas substituições de aminoácidos conservativas em vez de utilizar o mesmo aminoácido.

Noutra concretização preferida, a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos que é a mesma da sequência de aminoácidos da VH do Mab 20.13.3. Noutra concretização altamente preferida, a cadeia pesada compreende sequências de aminoácidos que são as mesmas das regiões CDR da cadeia pesada do anticorpo monoclonal 20.13.3 mostradas na Tabela 2. São também aqui divulgadas cadeias pesadas compreendendo uma sequência de aminoácidos de pelo menos uma região CDR da cadeia pesada do anticorpo monoclonal 20.13.3. Noutra concretização preferida, a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir de SEQ ID NO:2, 6, 8, 10 e 12. Noutra concretização preferida, a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir SEQ ID NO: 8, 10 e 12.

Inibição da Actividade do Receptor de IL-5 pelo Anticorpo Anti-IL-5

Inibição da Ligação de IL-5 ao Receptor de IL

Noutra concretização, a divulgação proporciona um anticorpo anti-IL-5 que inibe a ligação de IL-5 ao receptor de IL-5. Numa concretização preferida, o receptor de IL-5 é humano. Noutra concretização preferida, o anticorpo anti-IL-5 é um anticorpo humano. Noutra concretização, o anticorpo ou sua porção inibem a ligação entre IL-5 e o receptor de IL-5 com uma CI_{50} de não mais de 50 nM. Numa concretização preferida, a CI_{50} não é mais de 10 nM. Numa concretização mais preferida, a CI_{50} não é mais de 2,0 nM, 0,5 nM, 0,25 nM, 0,1 nM, ou 0,05 nM. A CI_{50} pode ser medida através de qualquer

método conhecido na arte. Tipicamente, uma CI_{50} pode ser medida através de ELISA, RIA, ou Antagonismo Funcional. Numa concretização preferida, a CI_{50} é medida através de Antagonismo Funcional.

Inibição da Proliferação Celular Mediada por IL-5 através do Anticorpo Anti-IL-5 (in vitro)

Noutra concretização preferida, a divulgação proporciona um anticorpo anti-IL-5 que inibe a proliferação mediada por IL-5 de uma linha celular que responde a IL-5. Numa concretização preferida, a linha celular é humana. Numa concretização ainda mais preferida, a linha celular é uma linha celular de eosinófilos humanos ou uma linha celular de eritroleucemia humana, por exemplo, TF-1.

Numa concretização preferida, o anticorpo é um anticorpo humano. Numa concretização mais preferida, o anticorpo é o anticorpo monoclonal 20.13.3 ou seus fragmentos funcionais.

Em certas concretizações, o anticorpo anti-IL-5 ou a sua porção funcional inibem a proliferação de uma linha celular que responde a IL-5 com um valor de CI_{50} de não mais de 10 nM. Em concretizações preferidas, a CI_{50} não é mais de 1 nM. Noutras concretizações preferidas, a CI_{50} não é mais de 250 pM. Em concretizações preferidas adicionais, a CI_{50} não é mais de 100 pM. Ainda noutras concretizações preferidas, a CI_{50} não é mais de 50 pM.

Inibição da Acumulação de Eosinófilos in vivo

Noutra concretização, um anticorpo anti-IL-5 inibe a acumulação de eosinófilos *in vivo*. Numa concretização preferida, o anticorpo inibe a acumulação de eosinófilos em comparação com a acumulação de eosinófilos num animal não tratado. Numa concretização mais preferida, o anticorpo inibe a acumulação de eosinófilos em 50%. Numa concretização ainda mais preferida, o anticorpo inibe a acumulação de eosinófilos em 75%.

Em certas concretizações, a terapia de anticorpo anti-IL-5 é conduzida em conjunto com terapia com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Numa concretização preferida,

o agente adicional promove mais inibição da produção, maturação, migração para o sangue, activação, acumulação ou infiltração em tecidos de eosinófilos num mamífero. Em certas concretizações, a terapia adicional compreende a administração de um ou mais dos agentes seleccionados de entre o grupo que consiste em corticosteróides, β_2 -agonistas, inibidores de 5-L0, antagonistas do receptor de LTD4 e anti-histamínicos. Exemplos de corticosteróides para tal terapia incluem, mas não se limitam a beta-metasona, prednisolona e hidrocortisona. O agente ou mais agentes terapêuticos adicionais podem ser administrados separadamente ou simultaneamente com um anticorpo anti-IL-5 do presente invento. Numa concretização preferida, a co-administração de um agente e o anticorpo anti-IL-5 inibe a acumulação de eosinófilos em pelo menos 50%, de maior preferência 75%, ainda de maior preferência 90% após um período de 22-24 dias.

Composições Farmacêuticas e Estojos

A divulgação refere-se também a composições farmacêuticas para o tratamento de distúrbios, particularmente distúrbios alérgicos, caracterizados por produção, maturação, migração para o sangue, activação ou infiltração em tecidos de eosinófilos, mediada por IL-5 num mamífero. Numa concretização, a referida composição farmacêutica é para tratamento de doenças eosinofílicas tais como, sem limitação, asma, exacerbações da asma, episódios de agravamento da asma, pneumonia crónica, rinite alérgica, rinite alérgica perene, aspergilose broncopulmonar alérgica, hiper-eosinofilia, síndrome de Churg-Strauss, dermatite atópica, oncocercose, angiodema episódico, síndrome de eosinofilia-mialgia, doença celíaca, gastroenterite eosinofílica, infecções helmínticas, doença de Hodgkin, pólipos nasais, síndrome de Loeffler, urticária, bronquite hiper-eosinofílica, arterite nodosa, sinusite, sinusite crónica, esofagite eosinofílica, esofagite eosinofílica alérgica, conjuntivite alérgica.

Os anticorpos anti-IL-5 podem ser incorporados em composições farmacêuticas adequadas para administração a um indivíduo. Tipicamente, a composição farmacêutica compreende um anticorpo ou seu fragmento funcional do presente invento e um transportador farmacêuticamente aceitável. Tal como aqui se

utiliza, "transportador farmacologicamente aceitável" inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e de retardamento da absorção, e semelhantes que sejam fisiologicamente compatíveis. Exemplos de transportadores farmacologicamente aceitáveis incluem um ou mais de água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, dextrose, glicerol, etanol e semelhantes, bem como suas combinações. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, poli-álcoois tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. Substâncias farmacologicamente aceitáveis tais como substâncias molhantes ou quantidades menores de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, conservantes ou tampões, aumentarão a duração de armazenagem ou eficácia do anticorpo ou porção de anticorpo.

As composições podem estar numa variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, formas de dosagem líquidas, semi-sólidas e sólidas, tais como soluções líquidas (p. ex., soluções injectáveis e de infusão), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende do modo de administração e da aplicação terapêutica pretendidos. Composições preferidas típicas estão na forma de soluções injectáveis ou de infusão, tais como composições farmacêuticas semelhantes às utilizadas para imunização passiva de humanos com outros anticorpos. O modo de administração preferido é o parentérico (p. ex., intravenoso, subcutâneo, intraperitoneal, intramuscular). Numa concretização preferida, o anticorpo é administrado através de infusão ou injeção intravenosa. Noutra concretização preferida, o anticorpo é administrado através de injeção intramuscular ou subcutânea.

As composições terapêuticas têm tipicamente de ser estéreis e estáveis sob as condições de fabrico e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para concentração elevada de fármaco. Podem ser preparadas soluções injectáveis estéreis através da incorporação do anticorpo anti-IL-5 na quantidade requerida num solvente apropriado com um ingrediente ou uma combinação

de ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido de esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas através da incorporação do composto activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários dos enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são a secagem em vácuo e a secagem por congelação que produz um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma sua solução previamente esterilizada por filtração. A fluidez correcta de uma solução pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de um revestimento tal como lecitina, através da manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e através da utilização de tensioactivos. A absorção prolongada de composições injectáveis pode ser alcançada através da inclusão na composição de um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio podem ser administrados através de uma variedade de métodos conhecidos na arte, embora para muitas aplicações terapêuticas, a via/o modo de administração preferido é subcutânea, intramuscular, intravenosa ou infusão. Tal como será apreciado pelo perito na especialidade a via e/ou o modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados.

Em certas concretizações, o composto activo pode ser preparado com um transportador que protegerá o composto contra a libertação rápida, tal como uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de distribuição microencapsulados. Podem ser utilizados polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, tais como etileno-acetato de vinilo, polianidridos, poli(ácido glicólico), colagénio, poliortoésteres e poli(ácido láctico). Muitos métodos para a preparação de tais formulações estão patenteados ou são geralmente conhecidos dos peritos na arte. Ver, p. ex., "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Em certas concretizações, o anticorpo anti-IL-5 ou fragmentos de ligação ao antigénio podem ser administrados oralmente, por exemplo, com um diluente inerte ou um transportador edível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se desejado) pode também ser encerrado numa cápsula de gelatina de revestimento duro ou mole, prensado em comprimidos, ou incorporado directamente na dieta do indivíduo. Para administração terapêutica oral, os compostos podem ser incorporados com excipientes e utilizados na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, bolachas e semelhantes. Para administrar um composto do presente invento através de uma administração que não parentérica, pode ser necessário revestir o composto ou co-administrar o compostos com um material para impedir a sua inactivação.

Pode-se também incorporar nas composições compostos activos suplementares. Em certas concretizações, um anticorpo anti-IL-5 é co-formulado e/ou co-administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Estes agentes incluem, sem limitação, anticorpos que se ligam a outros alvos (p. ex., anticorpos que se ligam a um ou mais factores de crescimento ou citocinas ou aos seus receptores da superfície celular), agentes que reduzem a produção ou actividade de IL-5, tais como proteínas de ligação a IL-5, oligonucleótidos anti-sentido contra IL-5 ou o receptor de IL-5, análogos peptídicos que bloqueiem a activação do receptor de IL-5, receptor solúvel de IL-5, glucocorticóides e ciclosporina e agentes que inibam a produção, maturação, sobrevivência, activação ou migração da medula óssea de eosinófilos, tais como corticosteróides. Tais terapias de combinação podem requerer dosagens inferiores do anticorpo anti-IL-5 e/ou dos agentes co-administrados, evitando assim possíveis toxicidades ou complicações associadas às várias monoterapias.

As composições farmacêuticas podem incluir uma "quantidade terapêuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilacticamente eficaz" de um anticorpo ou porção de anticorpo do presente invento. Uma "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, a dosagens e durante períodos de tempo necessários, para se alcançar o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade

terapeuticamente eficaz do anticorpo ou porção de anticorpo pode variar de acordo com factores tais como o estado de doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo ou porção de anticorpo para desencadear uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapêuticamente eficaz é também uma na qual quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do anticorpo ou porção de anticorpo são compensados pelos efeitos terapêuticamente benéficos. Uma "quantidade profilacticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, nas dosagens e durante os períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente, uma vez que uma dose profilática é utilizada em indivíduos antes ou num estado inicial da doença, a quantidade profilacticamente eficaz será menor que a quantidade terapêuticamente eficaz.

Os regimes de dosagem podem ser ajustados para proporcionar a resposta óptima desejada (p. ex., uma resposta terapêutica ou profilática). Por exemplo, pode ser administrado um bolo, podem ser administradas várias doses divididas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada tal como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parentéricas na forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade da dosagem. A forma de unidade de dosagem tal como aqui se utiliza refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos mamíferos a tratar; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto activo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o transportador farmacêutico requerido. A especificação para as formas de unidade de dosagem do presente invento são ditadas e directamente dependentes (a) das características únicas do anticorpo e do efeito terapêutico ou profilático particular a alcançar e (b) das limitações inerentes na especialidade de composição de um tal anticorpo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Um intervalo exemplar não limitante para uma quantidade terapêuticamente ou profilacticamente eficaz de um anticorpo ou porção de anticorpo do presente invento é 0,1-100 mg/kg, de

preferência 0,1-50 mg/kg, de maior preferência 0,1-20 mg/kg e ainda de maior preferência 1-10 mg/kg (p. ex., a 0,3, 1 ou 3 mg/kg). Deve notar-se que os valores da dosagem podem variar com o tipo e a gravidade da condição a aliviar. Deve entender-se ainda que para qualquer indivíduo particular, regímenes de dosagem específicos devem ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade individual e a avaliação profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições, e que os intervalos de dosagem aqui expostos são apenas exemplares e não se pretende que limitem o âmbito ou a prática da composição reivindicada.

Outro aspecto da presente divulgação proporciona estojos compreendendo os anticorpos anti-IL-5 ou fragmentos de ligação ao antigénio e as composições farmacêuticas compreendendo estes anticorpos. Um estojo pode incluir, para além do anticorpo ou da composição farmacêutica, agentes de diagnóstico ou terapêuticos. Um estojo pode também incluir instruções para utilização num método de diagnóstico ou terapêutico. Numa concretização preferida, o estojo inclui o anticorpo ou uma sua composição farmacêutica e um agente de diagnóstico que possa ser utilizado num método descrito abaixo. Noutra concretização preferida, o estojo inclui o anticorpo ou uma sua composição farmacêutica e um ou mais agentes terapêuticos que possam ser utilizados num método descrito abaixo.

Métodos de Utilização em Diagnóstico

Os anticorpos anti-IL-5 ou seus fragmentos de ligação ao antigénio podem ser utilizados para detectar IL-5 numa amostra biológica. Os anticorpos anti-IL-5 podem ser utilizados num imunoensaio convencional, incluindo, sem limitação, um ELISA, um RIA, FACS, imuno-histoquímica de tecidos, *Western blot* ou imunoprecipitação. Os anticorpos anti-IL-5 podem ser utilizados para detectar IL-5 de humanos. Noutra concretização, os anticorpos anti-IL-5 podem ser utilizados para detectar IL-5 de primatas do Velho Mundo tais como macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) e *Rhesus*, chimpanzés e macacos. Os anticorpos e fragmentos de ligação ao antigénio do presente invento podem ser utilizados num método para detecção de IL-5 numa amostra biológica compreendendo o

contacto de uma amostra biológica com um anticorpo anti-IL-5 do presente invento ou seus fragmentos de ligação ao antigénio e detecção do anticorpo ligado a IL-5, para detectar a IL-5 na amostra biológica. Numa concretização, o anticorpo anti-IL-5 é directamente marcado com um marcador detectável. Noutra concretização, o anticorpo anti-IL-5 (o primeiro anticorpo) não é marcado e um segundo anticorpo ou outra molécula que se possa ligar ao anticorpo anti-IL-5 é marcada. Tal como é bem conhecido de um perito na arte, é escolhido um segundo anticorpo que seja capaz de se ligar especificamente à espécie e classe específicas do primeiro anticorpo. Por exemplo, se o anticorpo anti-IL-5 for uma IgG humana, então o anticorpo secundário pode ser um anti-IgG humana. Outras moléculas que se podem ligar a anticorpos incluem, sem limitação, Proteína A e Proteína G, ambas as quais estão comercialmente disponíveis, p. ex., em Pierce Chemical Co.

Marcadores adequados para o anticorpo ou anticorpo secundário foram divulgados *supra* e incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes e materiais radioactivos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, β -galactosidase ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína; rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; e exemplos de material radioactivo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H .

Numa concretização alternativa, a IL-5 pode ser ensaiada numa amostra biológica através de um imunoensaio de competição utilizando padrões de IL-5 marcados com uma substância detectável e um anticorpo anti-IL-5 não marcado. Neste ensaio, a amostra biológica, os padrões de IL-5 marcados e o anticorpo anti-IL-5 são combinados e é determinada a quantidade de padrão de IL-5 marcada ligada ao anticorpo não marcado. A quantidade de IL-5 na amostra biológica é inversamente proporcional à quantidade de IL-5 marcada ligada ao anticorpo anti-IL-5.

Pode-se utilizar os imunoensaios aqui divulgados para vários fins. Numa concretização, os anticorpos anti-IL-5 ou fragmentos podem ser utilizados para detectar IL-5 numa amostra, particularmente numa amostra biológica.

Métodos de Utilização Terapêutica

É também aqui divulgado um método para inibição da actividade de IL-5 através da administração de um anticorpo anti-IL-5 tal como reivindicado ou um seu fragmento de ligação ao antigénio a um paciente dela necessitado. Qualquer um dos tipos de anticorpos aqui descritos pode ser utilizado terapeuticamente. Numa concretização preferida, o anticorpo anti-IL-5 é um anticorpo humano. Noutra concretização preferida, a IL-5 é humana e o paciente é um paciente humano. Alternativamente, o anticorpo ou fragmento pode ser administrado a um mamífero não humano expressando uma IL-5 com a qual o anticorpo reage de forma cruzada (i.e. um primata, macaco *Cynomolgus* ou *Rhesus*) para fins veterinários ou como um modelo animal de doença humana. Tais modelos animais podem ser úteis para avaliação da eficácia terapêutica dos anticorpos do presente invento.

Tal como aqui se utiliza, a expressão "um distúrbio no qual a actividade de IL-5 é prejudicial" pretende incluir doenças e outros distúrbios nos quais se mostrou que a presença de IL-5 num indivíduo sofrendo do distúrbio era ou era suspeita de ser responsável pela patofisiologia do distúrbio ou um factor que contribui para um agravamento do distúrbio. Deste modo, o presente invento proporciona, de acordo com as reivindicações anexas, a utilização de um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio no fabrico de um medicamento para prevenção ou inibição de uma condição ou distúrbio caracterizado por actividade de IL-5 indesejada. Deste modo, um distúrbio no qual a actividade de IL-5 é prejudicial é um distúrbio no qual se espera que a inibição da actividade de IL-5 alivie os sintomas e/ou a progressão do distúrbio. Tais distúrbios mediados por IL-5 incluem, mas não se limitam a distúrbios alérgicos, particularmente distúrbios alérgicos da pele e dos tecidos pulmonares e inflamação pulmonar. Tais distúrbios podem ser evidenciados, por exemplo, através de um maior número de eosinófilos e/ou basófilos na

medula óssea, sangue ou outros tecidos, ou em líquido de lavagem broncoalveolar (LBA). Em particular, tais distúrbios podem ser caracterizados por eosinofilia pulmonar ou cutânea, hiper-reactividade brônquica, acumulação de eosinófilos nos tecidos pulmonares, nas regiões perivasculares e/ou peribrônquicas, lesões do epitélio das vias aéreas, edema intersticial das vias aéreas, maior secreção de muco nos brônquios ou broncoconstrição. Alternativamente, a actividade patológica de IL-5 pode ser evidenciada através de um ou mais de eosinopoiese aumentada na medula óssea, sobrevivência aumentada de eosinófilos, adesão aumentada de eosinófilos a células endoteliais e actividade citotóxica aumentada dos eosinófilos.

Numa concretização preferida, um anticorpo anti-IL-5 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio podem ser administrados a um paciente sofrendo de inflamação, incluindo doença alérgica caracterizada por pronunciada infiltração eosinofílica, tal como rinite nasal, pólipos nasais, asma, síndromas eosinófilos idiopáticos e dermatite atópica. Numa concretização ainda mais preferida, o anticorpo anti-IL-5 é administrado a um paciente que tem inflamação pulmonar crónica. Numa concretização altamente preferida, o método faz com que a inflamação se torne menos grave ou desapareça.

Noutra concretização preferida, um anticorpo anti-IL-5 pode ser administrado a um paciente possuindo níveis aumentados de eosinófilos na medula óssea, sangue ou outros tecidos corporais. A presença aumentada de eosinófilos é conhecida na especialidade como estando associada a doenças tais como, sem limitação, asma, exacerbações da asma, episódios de agravamento da asma, pneumonia crónica, rinite alérgica, rinite alérgica perene, aspergilose broncopulmonar alérgica, hiper-eosinofilia, síndrome de Churg-Strauss, dermatite atópica, oncocercose, angiodema episódico, síndrome de eosinofilia-mialgia, doença celíaca, gastroenterite eosinofílica, infecções helmínticas, doença de Hodgkin, pólipos nasais, síndrome de Loeffler, urticária, bronquite hiper-eosinofílica, arterite nodosa, sinusite, sinusite crónica, esofagite eosinofílica, esofagite eosinofílica alérgica, conjuntivite alérgica. Numa concretização preferida, o anticorpo anti-IL-5 do presente invento ou um seu fragmento

de ligação ao antigénio é administrado a um paciente com asma. Numa concretização ainda mais preferida, o método previne ou reduz a gravidade da doença.

O anticorpo ou fragmento pode ser administrado desde de cerca de três vezes ao dia a cerca de uma vez de seis em seis meses e de preferência pode ser administrado através de uma via oral, mucosa, bocal, intranasal, inalável, intravenosa, subcutânea, parentérica, intratumoral ou tópica. O anticorpo pode também ser administrado continuamente através de uma minibomba. O anticorpo será geralmente administrado enquanto a condição de doença estiver presente, desde que o anticorpo faça com que a condição pare de se agravar ou melhore. O anticorpo será geralmente administrado como parte de uma composição farmacêutica tal como descrito *supra*. O anticorpo pode também ser administrado profilacticamente para impedir que ocorra inflamação alérgica e/ou infiltração eosinofílica. Isto pode ser especialmente útil em pacientes em que se tenha mostrado terem um risco maior de desenvolver uma condição mediada por IL-5 ou eosinófilos.

Terapia Génica

As moléculas de ácido nucleico podem ser administradas a um paciente delas necessitado através de terapia génica. A terapia pode ser *in vivo* ou *ex vivo*. Num caso preferido, as moléculas de ácido nucleico codificando tanto uma cadeia pesada como uma cadeia leve são administradas a um paciente. Num caso mais preferido, as moléculas de ácido nucleico são administradas de modo a que sejam estavelmente integradas no cromossoma de células B devido a estas células serem especializadas na produção de anticorpos. Num caso preferido, células B precursoras são transfectadas ou infectadas *ex vivo* e re-transplantadas num paciente delas necessitado. Noutro caso, células B precursoras ou outras células são infectadas *in vivo* utilizando um vírus que se saiba infectar o tipo celular de interesse. Vectores típicos utilizados para terapia génica incluem lipossomas, plasmídeos ou vectores virais, tais como retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados. Após infecção *in vivo* ou *ex vivo*, os níveis de expressão do anticorpo podem ser monitorizados tomando uma amostra do

paciente tratado e utilizando qualquer imunoensaio conhecido na especialidade e aqui discutido.

Num caso preferido, o método de terapia génica compreende os passos de administração de uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucleico isolada codificando a cadeia pesada ou a sua porção de ligação ao antigénio do anticorpo humano e a expressão da molécula de ácido nucleico. Noutro caso, o método de terapia génica compreende os passos de administração de uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucleico isolada codificando a cadeia leve ou a sua porção de ligação ao antigénio do anticorpo humano e a expressão da molécula de ácido nucleico. Num caso mais preferido, o método de terapia génica compreende os passos de administração de uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucleico isolada codificando a cadeia pesada ou a sua porção de ligação ao antigénio do anticorpo humano e uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucleico isolada codificando a cadeia leve ou a sua porção de ligação ao antigénio do anticorpo humano e a expressão das moléculas de ácido nucleico. O método de terapia génica pode também compreender o passo de administração doutro agente que tenha efeitos terapêuticos semelhantes aos do anticorpo ou seu fragmento funcional tais como os enumerados, *supra*.

Para que este invento possa ser melhor compreendido, são expostos os seguintes exemplos.

EXEMPLO 1

Criação de Hibridomas Produtores de Anticorpo Anti-IL-5

Os anticorpos do presente invento foram preparados, seleccionados e ensaiados como se segue:

Imunização e Criação de Hibridomas

Um total de 288 XenoMiceTM IgG2 ou IgG4 divididos em grupos de 15 a 20 ratinhos com 8 a 15 semanas foram imunizados de acordo com o programa mostrado na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Programas de Imunização

Gr.	# ratinho		Fusão #	Imunogénio	via	dose		Intervalo	# doses
	Gama-2	Gama-4				1. ^a	outras		
1	10	15	SPI-SP2	em CFA/IFA	bot	20ug	10ug	2-3sem.	4
	10	13	SP3-SP6						7
2	10	15	SP7-SP10	em CFA/IFA	bot	20ug	10ug	2-3sem.	4
	10	15	SP11-SP14						7
3	10	15	SP15-SP18	em CFA/IFA	bot	20ug	10ug	2-3sem.	4
	10	15	SP19-SP20						7
4	20	20	SP23-SP24	em CFA/IFA	bot	20ug	10ug	4-5sem.	7
5	10	20	SP33-SP35	em CFA/IFA	bot	20ug	10ug	3-4sem.	8
6	10	10	SP21-SP22	em Ribí	fp	20ug	10ug	3-4dias	7
7	20	20	SP25-SP30	Ribí ou CFA	bip	20ug	10ug	2-3sem.	5
8	10	10	SP31-SP32	IL5-anti m-CD3	bot	20ug	20ug	2-3sem.	4

Para imunizações na base da cauda (bot), a IL-5 humana foi emulsionada em adjuvante completo de Freund (CFA) para a primeira imunização e em adjuvante incompleto de Freund (IFA) para subseqüentes imunizações nas doses e tempos indicados acima. (Para informação sobre a sequência de IL-5, ver publicação do Pedido de Patente Europeia número EP0267779). Para a imunização na almofada da pata (FP), o antígeno foi emulsionado em adjuvante Ribí. Alguns animais (grupo 7) receberam antígeno tanto através de bot como intraperitonealmente (ip) em CFA ou Ribí. O grupo 8 recebeu antígeno na forma de conjugado no qual a IL-5 humana foi quimicamente conjugada com um anticorpo de ratinho anti-CD3.

Células do baço e/ou dos nódulos linfáticos de ratinhos imunizados foram fundidas com a linha celular de mieloma não secretora P3-X63-Ag8.653 (ATCC, Rockville, MD) ou com a linha celular de mieloma NS0-bcl2 (B. Diamond, Albert Einstein College of Medicine, NY), tal como anteriormente descrito (Galfre e Milstein, *Methods Enzymol.* 73: 3-46, 1981). As culturas foram examinadas regularmente quanto ao crescimento de células híbridas e os sobrenadantes das células contendo hibridomas foram colhidos para uma pesquisa primária de ELISA da presença de IgG/capa humano específico para IL-5.

Ensaio de Ligação a IL-5

Placas de ELISA foram revestidas com 50 µl/poço de antigénio IL-5 a 2 µg/ml em tampão de Revestimento (tampão carbonato 0,1 M, pH 9,6 e 8,4 g/l de NaHCO₃ (PM 84)) e incubadas a 4°C de um dia para o outro ou a 37°C durante 2 horas. As placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tween 20 a 0,05% em PBS) três vezes, bloqueadas com 200 µl/poço de tampão de bloqueio (BSA a 0,5%, Tween 20 a 0,1%, Timerosal a 0,01% em PBS 1×) durante 1 hora à temperatura ambiente e lavadas três ou mais vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados aos poços 15 µl/poço de amostra (ou controlos) e incubou-se à temperatura ambiente durante 2 horas. Após três lavagens com tampão de lavagem, foram adicionados a cada poço 100 µl/poço de anticorpo de detecção de cabra anti-huIgGfc-HRP (Caltag, n.º cat. H10507) (e GT anti-hkappa-HRP na pesquisa secundária) e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e foram adicionados a cada poço 100 µl de solução de revelação (10 ml de tampão de substrato, 7,14 g/l de ácido cítrico e 16,96 g/l de fosfato de sódio dibásico), 10 mg o-fenilenodiamina (Sigma, n.º cat. P-7288) e 10 µl de H₂O₂ a 30%). Após aproximadamente 10 minutos, foi adicionada solução de paragem (H₂SO₄ 2 M) a cada poço e as placas foram analisadas utilizando um leitor de placas ELISA a um comprimento de onda de 492 nm. As culturas positivas foram transferidas para placas de 48 poços e foram subsequentemente transferidas para placas de 24 poços após alcançarem confluência.

Foi obtido um total de 116 hibridomas produtores de anticorpos reactivos com IL-5, dos quais 7 eram IgG2 e 109 eram IgG4. Pensa-se que prevalência desproporcionada de anticorpos IgG4 esteja relacionada com um efeito de IL-5 na mudança de classe. Dos 116 hibridomas produtores de anticorpos específicos de IL-5, um hibridoma IgG4/capa designado 20.13 foi seleccionado para posterior caracterização com base na sua forte actividade de neutralização comparável com a de um anticorpo de controlo IgG de ratinho (39D10 de Schering-Plough).

EXEMPLO 2**Ensaio de Proliferação para Determinação de Anticorpos Biologicamente Funcionais**

As ascites e os sobrenadantes dos hibridomas purificados por afinidade foram utilizados para um ensaio funcional quantitativo para neutralização da proliferação de células TF1 induzida por IL-5 (DNAX). Resumidamente, IL-5 humana recombinante foi diluída em meio de cultura RPMI-1640 com FBS a 1% até uma concentração final de 1,0 ng/ml e o anticorpo de controlo, 39D10 (Schering-Plough), foi diluído até uma concentração final de 1,0 µg/ml com meio de IL-5. Foi adicionada aos poços de placas de 96 poços a solução de IL-5 ou a solução de IL-5 mais 39D10. Os poços de controlo continham apenas meio ou apenas IL-5.

As células TFP1 foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 e ressuspensas até uma concentração final de $2,5 \times 10^5$ células TF1 por ml em meio de cultura FBS. Foram adicionados 100 µl da suspensão celular a cada poço e incubou-se durante 48-56 horas a 37°C e CO₂ a 5%. Após 48 horas, foram adicionados 20 µl de Azul Alamar a cada poço e incubou-se de um dia para o outro. As placas foram analisadas utilizando um leitor de placas FluoroCount™ a um comprimento de onda de excitação de 530 nm, comprimento de onda de emissão de 590 nm e PMT de 600 volts.

Os resultados dos estudos utilizando o anticorpo 20.13.3, purificado a partir de ascites ou sobrenadantes, mostram que 20.13.3 bloqueou eficazmente a proliferação celular induzida por IL-5.

EXEMPLO 3**Determinação da CI₅₀ de Neutralização**

O Mab 20.13.3 foi testado no ensaio anti-proliferação de TF-1 contra IL-5 humana e de murídeo (Egan *et al.*, *Drug Res.* 49: 779-790, 1999). Resumidamente, foram adicionados aos poços de uma placa de cultura de 96 poços 50 µl de meio de ensaio (RPMI 1640 suplementado com glutamina a 1%, solução pen/estrep a 1%, mercaptoetanol a 0,1%, fungizona a 0,05% e soro fetal

bovino a 1%). Foram adicionadas concentrações variáveis de Mab 20.13.3 aos poços e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos. Foram adicionados a cada poço (excepto nos controlos negativos) 20 microlitros (20 µl) de IL-5 humana e de murídeo (12 ng/ml). Células TF-1 foram preparadas a uma concentração de 5×10^5 células por ml e foram adicionadas alíquotas de 30 µl de suspensão celular a todos os poços. As placas foram incubadas durante 44-48 horas a 37°C e CO₂ a 5%. Foram então adicionados a cada poço 25 µl de uma solução MTT a 5 mg/ml e incubou-se outras 6 horas. Foram adicionados a cada poço 100 µl de uma solução de SDS a 10% e as placas foram incubadas de um dia para o outro. As placas foram analisadas num espectrofotómetro de UV MAXTM. Os resultados indicam que no ensaio o Mab 20.13.3 exhibe valores de CI₅₀ de 250 pM e 380 pM contra a IL-5 humana e de murídeo, respectivamente.

EXEMPLO 4

Ensaio Funcional in vivo

Um anticorpo anti-IL-5 do presente invento foi avaliado num modelo de ratinho de inflamação pulmonar induzida por antigénio (Kung *et al.*, 1994). Resumidamente, a ratinhos sensibilizados com ovalbumina (OVA) foi dada uma dose de solução salina, Mab 20.13.3 a 5, 1, 0,5 ou 0,1 mg/kg s.c., ou um Mab anti-IL-5 de murídeo de controlo positivo, TRFK-5 (Schering Plough Research Institute; Mita *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125: 233, 1987) a 1 mg/kg i.p 2 h antes do confronto com OVA em aerossol. O líquido da lavagem broncoalveolar (LBA) foi colhido 24 h após confronto e foi determinada a celularidade. O TRFK-5 produziu uma diminuição significativa em todos os parâmetros. O Mab 20.13.3 inibiu significativamente as células totais e os eosinófilos no LBA a 5, 1 e 0,5 mg/kg.

A duração da actividade dos anticorpos anti-IL-5 do presente invento foi avaliada no modelo acima descrito. Foi dada uma dose a ratinhos sensibilizados com ovalbumina (OVA) de solução salina ou Mab 20.13.3 a 5 e 1 mg/kg s.c. 2 h, 2 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas ou 12 semanas antes do confronto com OVA em aerossol. O líquido da lavagem broncoalveolar foi colhido 24 h após o confronto e foi determinada a celularidade. Foram tomadas amostras de sangue

no momento da colheita de LBA para análise farmacocinética. As doses de 5 e 1 mg/kg de Mab 20.13.3 inibiram significativamente as células totais e os eosinófilos no LBA quando dadas 2 h e 13 dias antes do confronto com OVA. O Mab 20.13.3 inibiu significativamente as células totais e os eosinófilos no LBA quando dado 4 semanas (s) antes do confronto apenas na dose de 5 mg/kg. Já não foi observada inibição quando o Mab 20.13.3 foi dado 6s-12s antes do confronto.

Avaliámos o Mab 20.13.3 num modelo de macaco *Cynomolgus* de inflamação pulmonar induzida por antigénio (Mauser *et al.* 1995). Resumidamente, nove macacos naturalmente sensíveis a *Ascaris suum* foram primeiro falsamente tratados com veículo (solução salina subcutânea) e 18 h depois confrontados com *Ascaris suum* (antigénio) em aerossol. Vinte e quatro horas após o confronto com *Ascaris*, foi colhida uma amostra de líquido LBA e obteve-se uma amostra de sangue periférico. O conteúdo celular das amostras de LBA e de sangue foi determinado.

Três semanas depois, foi dada uma dose aos nove macacos de Mab 20.13.3 a 0,3 mg/kg s.c. Dezoito horas depois os macacos foram confrontados com *Ascaris suum* em aerossol e foi colhida uma amostra de LBA 24 h depois. Foram tomadas amostras de sangue antes e em momentos seleccionados após a administração de *Ascaris suum*. O confronto com *Ascaris suum* foi repetido 4 e 8 semanas após a dosagem inicial com Mab 20.13.3 e o conteúdo celular no líquido LBA foi analisado antes e 24 horas após cada confronto com *Ascaris*. O Mab 20.13.3 reduziu significativamente a acumulação de eosinófilos induzida pelo antigénio no LBA 4s após a dosagem com uma tendência para níveis reduzidos (55% de redução) 8s após a dosagem. O Mab 20.13.3 reduziu significativamente o número de eosinófilos no sangue periférico 42 h, 2s, 4s, 8s e 12s após a dosagem com os níveis a voltar para próximo dos níveis de pré-dosagem pelas 14s.

EXEMPLO 5**Análise Estrutural de Anticorpos Monoclonais Anti-IL-5 Inteiramente Humanos**

Para analisar a estrutura de anticorpos produzidos de acordo com o presente invento, clonámos e sequenciámos ácidos nucleicos codificando fragmentos das cadeias pesadas e leves de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-IL-5. Analisámos todas as sequências através de alinhamentos com o "directório de sequências V BASE" (Tomlinson *et al.*, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) utilizando os programas de suporte lógico MacVector e Geneworks.

Para clonar o ADNc codificando o anticorpo monoclonal 20.13.3, isolámos ARN de aproximadamente 1×10^6 células de hibridoma através do método RNazol (Tel-Test, INC.). Transcrevemos de forma inversa o ARNm utilizando oligo-dT(18) e o estojo de RT/PCR AdvantageTM (Clonetech). Utilizámos os seguintes iniciadores para amplificar o ADNc.

Nome do iniciador	Sequência do Iniciador
Cadeia Leve de Sentido Directo: vk018-Eco	5'-GGAAGAATTCACCCTGTGCAGGAGTCAGTCC-3' (SEQ ID NO: 19)
Cadeia Leve Anti-sentido: ckp2-Apa	5'-TGAGATCGAGGGCCCCTTCTCCCTCTAACACTCTCC-3' (SEQ ID NO: 20)
Cadeia Pesada de Sentido Directo: v3-23-Eco	5'-CCGGAATTCAGAGAGAACTCACCATGGAGTTTG-3' (SEQ ID NO: 21)
Cadeia Pesada Anti-sentido: Jh4/5-Nhe	5'-GAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCCT-3' (SEQ ID NO: 22)

Os produtos de PCR da cadeia leve do ADNc de 20.13.3 foram sujeitos a electroforese em géis de agarose a 1%/TAE e uma banda de ~760 pb foi excisada e purificada com contas Sephaglas (Amersham) e subclonada no vector de PCR TOP02.1 (Invitrogen). As inserções de ADNc foram sequenciadas com um estojo de sequenciação de iniciador com corante (Applied Biosystems) com os iniciadores vk018-Eco e ckp2-Apa. A análise da sequência foi efectuada utilizando suporte lógico SeqEd e GeneWorks. Os fragmentos EcoRI/ApaI isolados de plasmídeos identificados foram clonados no vector de expressão pManuKappa.

Os produtos de PCR da cadeia pesada de 20.13.3 foram digeridos com *EcoRI/NheI*, sujeitos a electroforese em géis de agarose a 1%/TAE e uma banda de ~435 pb foi excisada e purificada com sephaglas (Amersham) e subclonada em pManuGamma4. Os clones foram sequenciados com um estojo de sequenciação de iniciador com corante (Applied Biosystems) com os iniciadores v3023-Eco e Jh4-Nhe.

Para cada clone, verificámos a sequência em ambas as cadeias em pelo menos três reacções.

Análise de Utilização dos Genes

A Tabela 5 expõe a utilização dos genes pelo hibridoma 20.13.3 de acordo com o presente invento.

TABELA 5 Utilização dos Genes da Cadeia Pesada e Leve

Clone	Cadeia Pesada			Cadeia Leve Capa	
	VH	D	JH	VK	JK
20.13.3	(3-23) DP-47	D1-20	JH4B	08/018	JK4

Análise de Mutações

Tal como será apreciado, a análise de utilização dos genes proporciona apenas uma perspectiva global limitada da estrutura do anticorpo. Uma vez que as células B de animais XenoMouseTM geram estocasticamente transcritos de cadeia pesada V-D-J ou leve capa V-J, existem vários processos secundários que ocorrem, incluindo, sem limitação, hipermutação somática, adições e prolongamentos de CDR3. Ver, por exemplo, Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15: 146-156, 1997 e Publicação de Patente Internacional WO 98/24893, publicada a 11 de Outubro de 1998. Assim, para melhor examinar a estrutura do anticorpo, gerámos sequências de aminoácidos previstas dos anticorpos a partir dos ADNC obtidos a partir dos clones.

O domínio variável da cadeia pesada do Mab 20.13.3 contém três substituições de aminoácidos em comparação com a linha germinativa - uma na CDR2 e duas na CDR3. O domínio variável

da cadeia leve do Mab 20.13.3 contém cinco mutações da linha germinativa, uma em cada uma de CDR1, CDR2, FR3, CDR3 e FR4.

Será apreciado que muitas das substituições ou inserções de aminoácidos identificadas acima existem em íntima vizinhança com ou dentro de uma CDR. Tais substituições parecerão possuir algum efeito sobre a ligação do anticorpo à molécula de IL-5. Mais, tais substituições poderão ter um efeito significativo sobre a afinidade dos anticorpos.

EXEMPLO 6

Determinação das Constantes de Afinidade (K_d) do Anticorpo Monoclonal Anti-IL-5 Inteiramente Humano através de Ensaio de Exclusão Cinética

A constante de dissociação de equilíbrio (K_d) para o anticorpo monoclonal humano 20.13.3 foi determinada utilizando o instrumento KinExA 3000TM (Sapidyne Instruments Inc.). O KinExA utiliza o princípio do método do Ensaio de Exclusão Cinética baseado na medição da concentração do anticorpo não complexado numa mistura de anticorpo, antigénio e complexo anticorpo-antigénio. A concentração de anticorpo livre é medida através da exposição da mistura a um antigénio imobilizado numa fase sólida durante um período de tempo muito breve. Na prática, isto é alcançado através do fluxo da mistura antigénio-anticorpo na fase de solução por partículas revestidas de antigénio aprisionada numa célula de fluxo. Os dados gerados pelo instrumento são analisados utilizando suporte lógico feito à medida. As constantes de equilíbrio são calculadas utilizando uma teoria matemática baseada nas seguintes assunções:

1. A ligação segue a equação de ligação reversível para o equilíbrio:

$$K_{on}[Ab][Ag]=K_{off}[Ab\ Ag];$$

2. O anticorpo e o antigénio ligam-se 1:1 e o anticorpo total iguala o complexo antigénio-anticorpo mais o anticorpo livre;
e

3. O sinal do instrumento está linearmente relacionado com a concentração de anticorpo livre.

Todos os procedimentos experimentais foram efectuados de acordo com o Manual de KinExA 3000TM. Todas as corridas foram feitas em duplicado. A seguinte tabela mostra as condições de ensaio para as corridas de Kd padrão a concentrações de Ac de 0,1 nM e 0,01 nM, respectivamente:

	Concentração de Ac	
	0,1 nM	0,01 nM
Volume da amostra:	500 µl	2000 µl
Caudal da amostra:	0,25 ml/min	0,25 ml/min
Volume de marcador:	500 µl	500 µl
Caudal de marcador:	0,25 ml/min	0,25 m/min
Maior concentração de Ag:	500 pM	40 pM
Menor concentração de Ag:	0,5 pM	0,07 pM

Em cada ensaio, foram preparadas diluições em série de duas vezes do antigénio e misturou-se com o anticorpo a uma concentração constante. A mistura foi incubada durante 2 horas à temperatura ambiente para equilibrar.

Os materiais utilizados nos ensaios de cima foram: Mab 20.13.3; IL-5 humana recombinante (rhIL-5) (disponível em Sigma (N.º Cat. I5273), R&D Systems (N.º Cat. 205-IL-005), Amersham (N.º Cat. ARM19005) e Calbiochem (N.º Cat. 407641)); partículas PMMA, 8 micrómetros (Sapidyne, N.º Cat. 440198); Neutravidin (Pierce, N.º Cat. 31000); EZ-link TFP PEO-Biotina (Pierce, N.º Cat. 21219); rhIL-5 Biotinilada (razão Biotina/proteína: 19/1); e anticorpo de Cabra anti-HuIgG (H+L) conjugado com Cy5 (Jackson Immunoresearch Laboratories N.º Cat. 109-175-003). As partículas PMMA foram revestidas com rhIL-5 biotinilada de acordo com Sapidyne "Protocol for coating PMMA particles with biotinylated ligands having short or nonexistent linker arms". Para biotinilação da rhIL-5 foi utilizado EZ-link TFP PEO-biotina de acordo com as recomendações do fabricante (boletim Pierce 0874). Foi estimada a razão biotina/proteína utilizando o ensaio HABA (boletim Pierce 0212).

A análise de Curva Dupla (concentrações de Anticorpo de 0,1 e 0,01 nM) no "modo Padrão" (ver Manual de KinExA 3000TM para uma explicação dos métodos de análise dos dados da Curva Dupla) gerou uma curva de melhor ajustamento para Kd com um claro mínimo. O valor calculado da Kd para o Mab 20.13.3 para este método de análise foi $1,5 \times 10^{-11}$ M. A Kd do Mab 20.13.3 calculada através do método de Curva Dupla (Antigénio Desconhecido) foi de $1,95 \times 10^{-11}$ M, que se aproxima razoavelmente da Kd obtida através do método de Curva Dupla (Padrão). O peso molecular do anticorpo utilizado para o cálculo foi 150 kDa.

As análises cinéticas indicam que os anticorpos preparados de acordo com o presente invento possuem elevadas afinidades para a IL-5 humana.

Ao longo desta descrição e reivindicações, a palavra "compreende" ou variações tais como "compreendem" ou "compreendendo" serão entendidas como implicando a inclusão de um inteiro ou grupo de inteiros referidos mas não a exclusão de qualquer outro inteiro ou grupo de inteiros.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Schering Corporation and Abgenix, Inc.
Scott Greenfeder,
Jose Corvalan,

<120> ANTICORPOS MONOCLONAIIS HUMANOS CONTRA INTERLEUCINA-5 E
MÉTODOS E COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO OS MESMOS

<130> LI01564WI

<160> 22

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 2002
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> região V
<222> (1)..(414)
<223>

<220>

<221> região C CH1

<222> (415)..(709)

<223>

<220>

<221> Charneira

<222> (1102)..(1137)

<223>

<220>

<221> região C CH2

<222> (1256)..(1585)

<223>

<220>

<221> região C CH3

<222> (1683)..(2002)

<223>

<400> 1

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtgag 60

gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg ggggggccct gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac cttagcagc tatgccatga gctgggtccg ccaggctcca 180

gggaaggggc tggagtgggt ctcaactatt agtggtagtg gtggtagcac atactacgca 240

gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

```

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcaa agagaggtat 360
aactggaact acctacacta ctggggccag ggaacctggt tcaccgtctc ctcagctagc 420
accaagggcc catccgtctt cccctggcg cctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 480
gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgctg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 660
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagtgg tgagaggcca 720
gcacagggag ggagggtgtc tgctggaagc caggctcagc cctcctgcct ggacgcaccc 780
cggctgtgca gccccagccc agggcagcaa ggcctgccc atctgtctcc tcaccggag 840
gcctctgacc accccactca tgctcaggga gaggggtctt tggatttttc caccaggctc 900
cgggcagcca caggttgat gccctaccc caggccctgc gcatacagg gcaggtgctg 960
cgctcagacc tgccaagagc catatccggg aggaccctgc cctgaccta agccccccc 1020
aaaggccaaa ctctccactc ctcagctca gacacctct ctctcccag atctgagtaa 1080
ctccaatct tctctctgca gagtccaaat atgggtcccc atgcccata tgcccaggta 1140
agccaacca ggcctgccc tccagctcaa ggcgggacag gtgccctaga gtagcctgca 1200
tccagggaca gccccagcc ggggtgtgac gcacccact ccatctcttc ctcagcact 1260
gagttcctgg ggggaccatc agtcttctg tccccccaa aaccaagga cactctcatg 1320
atctcccga cccctgaggt cactgtcgtg gtggtggacg tgagccagga agaccccgag 1380
gtccagtcca actggtacgt ggatggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 1440
gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1500
tggtgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc 1560
gagaaaacca tctccaaagc caaagggtgg acccacggg tgcgaggggc acatggacag 1620
aggtcagctc gccccaccct ctgccctggg agtgaccgct gtgccaacct ctgtccctac 1680
agggcagccc cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa 1740
gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtctctac cccagcgaca tcgccgtgga 1800
gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc tgctggactc 1860
cgacggctcc ttcttctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg 1920
gaatgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag 1980
cctctccctg tctctgggta aa 2002

```

<210> 2

<211> 465

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> SINAL

<222> (1)..(19)

<223>

<220>

<221> Região Variável

<222> (20).. (138)

<223>

<220>

<221> Região CH1

<222> (139)..(236)

<223>

<220>

<221> Região Charneira

<222> (237)..(248)

<223>

<220>

<221> Região CH2

<222> (249)..(358)

<223>

<220>

<221> Região CH3

<222> (359)..(465)

<223>

<400> 2

Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly
1				5					10					15	

Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
			20					25					30		

Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
		35					40					45			

Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
		50				55					60				

Glu	Trp	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala
65					70					75					80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Leu His Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 225 230 235 240

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

	325		330		335
Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys				
	340		345		350
Thr Ile Ser	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr				
	355		360		365
Leu Pro Pro	Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr				
	370		375		380
Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu				
385		390		395	400
Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu				
	405		410		415
Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys				
	420		425		430
Ser Arg Trp	Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu				
	435		440		445
Ala Leu His	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly				
	450		455		460
Lys					
465					

<210> 3

<211> 708

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

atggacatga	gggtccctgc	tcagctcctg	gggtccctgc	tgctctggct	ctcaggtgcc	60
agatgtgaca	tccagatgac	ccagtctcca	tcctccctgt	ctgcatctgt	gggagacaga	120
gtcaccatca	cttgccaggc	gagtcaggac	attatcaact	atttaaattg	gtatcagcag	180
aaaccaggga	aagcccctaa	actcctgac	tacagtgctt	ccaatttgga	aacaagagtc	240
ccatcaaggt	tcagtgggaag	tggttctggg	acagatttta	ctttcaccat	cagcagcctg	300
cagcctgaag	atattgcaac	atattattgt	caacagtatg	ataatcaccc	gctcactttc	360
ggcggaggga	ccaaggtgga	gatcagacga	actgtggctg	caccatctgt	cttcactttc	420
ccgccatctg	atgagcagtt	gaaatctgga	actgcctctg	ttgtgtgcct	gctgaataac	480

```

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac      540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc      600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacagagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat      660
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt                    708

```

<210> 4

<211> 236

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> Péptido de Sinal

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 4

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

```

```

Leu Ser Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
          20          25          30

```

```

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

```

```

Gln Asp Ile Ile Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
          50          55          60

```

```

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Arg Val
65          70          75          80

```

```

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
          85          90          95

```

```

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
          100          105          110

```

```

Tyr Asp Asn His Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
          115          120          125

```

```

Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          130          135          140

```

```

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145          150          155          160

```

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 5

$\langle 211 \rangle$ 414

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

atggagtttg	ggctgagctg	gctttttctt	gtggctattt	taaaagggtg	ccagtgtgag	60
gtgcagctgt	tggagtctgg	gggaggcttg	gtacagcctg	gggggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcct	ctggattcac	cttttagcagc	tatgccatga	gctgggtccg	ccaggctcca	180
gggaaggggc	tggagtgggt	ctcaactatt	agtggtagtg	gtggtagcac	atactacgca	240
gactccgtga	agggccgggt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gctgagagc	cgaggacacg	gccgtatatt	actgtgcgaa	agagaggtat	360
aactggaact	acctacacta	ctggggccag	ggaaccctgg	tcaccgtctc	ctca	414

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

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

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

Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Glu Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 15

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

agctatgccca tgagc 15

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 9

<211> 51

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

actattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 11
gagaggtata actggaacta cctacactac 30

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12
Glu Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Leu His Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 33
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 13
caggcgagtc aggacattat caactattta aat 33

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ile Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 15
gtgcttccaa tttggaaaca 20

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16
Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 17
<211> 27
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 17
caacagtatg ataatcaccc gctcact 27

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Gln Gln Tyr Asp Asn His Pro Leu Thr
1 5

<210> 19

<211> 31

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

ggaagaattc accctgtgca ggagtcagtc c 31

<210> 20

<211> 36

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

tgagatcgag ggccccttct ccctctaaca ctctcc 36

<210> 21

<211> 34

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

ccggaattcc agagagaact caccatggag tttg 34

<210> 22

<211> 40

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

gagagagagc tagctgagga gacggtgacc agggttccct 40

Lisboa, 2009-08-19

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio que se ligam especificamente a IL-5, em que o referido anticorpo ou fragmento compreendem:

- i) uma sequência de aminoácidos da cadeia pesada seleccionada de entre o grupo que consiste em:
 - a) a sequência de aminoácidos exposta em SEQ ID NO:2, com ou sem o péptido de sinal;
 - b) a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:6;
 - c) a sequência de aminoácidos dos resíduos 50-127 de SEQ ID NO:2; e
 - d) as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 mostradas em SEQ ID NO: 8, 10 e 12, respectivamente; e
- ii) a sequência de aminoácidos da cadeia leve seleccionada de entre o grupo que consiste em:
 - a) a sequência de aminoácidos exposta em SEQ ID NO:4, com ou sem o péptido de sinal;
 - b) a sequência de aminoácidos dos resíduos 23-130 de SEQ ID NO:4;
 - c) a sequência de aminoácidos dos resíduos 46-119 de SEQ ID NO:4; e
 - d) as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 mostradas em SEQ ID NO:14, 16 e 18, respectivamente.

2. Molécula de ácido nucleico compreendendo:

- i) uma sequência nucleotídica codificando um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antigénio compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste em:
 - a) a sequência de aminoácidos exposta em SEQ ID NO:2, com ou sem o péptido de sinal;
 - b) a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:6;
 - c) a sequência de aminoácidos dos resíduos 50-127 de SEQ ID NO:2; e
 - d) as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 mostradas em SEQ ID NO: 8, 10 e 12, respectivamente; e

- ii) uma sequência nucleotídica codificando uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste em:
 - a) a sequência de aminoácidos exposta em SEQ ID NO:4, com ou sem o péptido de sinal;
 - b) a sequência de aminoácidos dos resíduos 23-130 de SEQ ID NO:4;
 - c) a sequência de aminoácidos dos resíduos 46-119 de SEQ ID NO:4; e
 - d) as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 mostradas em SEQ ID NO:14, 16 e 18, respectivamente.

3. Molécula de ácido nucleico codificando um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, compreendendo o referido ácido nucleico:

- i) uma sequência nucleotídica seleccionada de entre o grupo que consiste em:
 - a) a sequência nucleotídica dos nucleótidos 1-709, 1102-1137, 1256-1585 e 1683-2002 de SEQ ID NO:1;
 - b) a sequência nucleotídica dos nucleótidos 58-709, 1102-1137, 1256-1585 e 1683-2002 de SEQ ID NO:1;
 - c) a sequência nucleotídica dos nucleótidos 58-709 de SEQ ID NO:1;
 - d) a sequência nucleotídica dos nucleótidos 148 a 381 de SEQ ID NO:1; e
 - e) a sequência nucleotídica dos nucleótidos 1 a 2002 de SEQ ID NO:1; e
- ii) uma sequência nucleotídica seleccionada de entre o grupo que consiste em:
 - a) a sequência nucleotídica exposta em SEQ ID NO:3;
 - b) a sequência nucleotídica dos nucleótidos 67-708 exposta em SEQ ID NO:3;
 - c) a sequência nucleotídica dos nucleótidos 67-390 exposta em SEQ ID NO:3; e
 - d) a sequência nucleotídica dos nucleótidos 67-357 exposta em SEQ ID NO:3.

4. Molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-3, operativamente ligada a uma sequência de controlo da expressão.

5. Célula hospedeira transformada com uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4.

6. Método para produção de uma imunoglobulina ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio que se liga especificamente a IL-5, compreendendo o passo de cultura de uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 5.

7. Célula hospedeira transformada com uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 2 ou a reivindicação 3.

8. Método para produção de um anticorpo ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio que se liga especificamente a IL-5, compreendendo o passo de cultura de uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 7.

9. Composição compreendendo o anticorpo ou o seu fragmento de acordo com a reivindicação 1 e um transportador farmacologicamente aceitável.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9, compreendendo ainda um componente seleccionado de entre o grupo que consiste em:

- a) um agente de diagnóstico; e
- b) um agente terapêutico.

11. Estojo compreendendo o anticorpo ou o seu fragmento de acordo com a reivindicação 1.

12. Utilização do anticorpo ou seu fragmento de acordo com a reivindicação 1 ou de uma composição de acordo com a reivindicação 9 ou 10, no fabrico de um medicamento para prevenção ou inibição de uma condição ou distúrbio **caracterizados por** actividade indesejada de IL-5.

13. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que a condição ou distúrbio são seleccionados de entre o grupo que

consiste em: asma, exacerbações da asma, episódios de agravamento da asma, pneumonia crónica, rinite alérgica, rinite alérgica perene, aspergilose broncopulmonar alérgica, hiper-eosinofilia, síndrome de Churg-Strauss, dermatite atópica, oncocercose, angiodema episódico, síndrome de eosinofilia-mialgia, doença celíaca, gastroenterite eosinofílica, infecções helmínticas, doença de Hodgkins, pólipos nasais, síndrome de Loeffler, urticária, bronquite hiper-eosinofílica, arterite nodosa, sinusite, sinusite crónica, esofagite eosinofílica, esofagite eosinofílica alérgica, conjuntivite alérgica.

14. Utilização de acordo com a reivindicação 12 ou 13, em que o método diminui ou inibe a infiltração de eosinófilos no tecido afectado.

15. Utilização do anticorpo ou seu fragmento de acordo com a reivindicação 1 ou de uma composição de acordo com a reivindicação 9 ou 10 no fabrico de um medicamento para prevenção ou inibição de uma resposta alérgica mediada por IL-5 num indivíduo.

16. Utilização do anticorpo ou seu fragmento de acordo com a reivindicação 1 ou de uma composição de acordo com a reivindicação 9 ou 10, no fabrico de um medicamento para prevenção ou inibição de um acontecimento mediado por IL-5 seleccionado de entre o grupo que consiste em:

- a) proliferação, maturação, sobrevivência, activação, migração para a corrente sanguínea, adesão ao endotélio e infiltração em tecidos de eosinófilos;
- b) edema pulmonar;
- c) broncoconstrição;
- d) hiper-reactividade das vias aéreas;
- e) eosinofilia ou neutrofilia pulmonares;
- f) eosinofilia cutânea; e
- g) danos no epitélio das vias aéreas.

17. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 14-16, em que o anticorpo anti-IL-5 é

administrado em conjunto com a administração de outro agente terapêutico.

18. Método *in vitro* para prevenção ou inibição da ligação de IL-5 a um receptor de IL-5, compreendendo o passo de administração no ambiente em que existem células que expressam um receptor de IL-5 de um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1 ou de uma composição de acordo com a reivindicação 9 ou 10.

19. Método *in vitro* para prevenção ou inibição da fosforilação de tirosina mediada pelo receptor de IL-5 compreendendo o passo de administração no ambiente em que existem células que expressam um receptor de IL-5 de um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1 ou de uma composição de acordo com a reivindicação 9 ou 10.

20. Utilização de um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1 ou de uma composição de acordo com a reivindicação 9 ou 10, no fabrico de uma composição para prevenção ou inibição da ligação de IL-5 a um receptor de IL-5.

21. Utilização de um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1 ou de uma composição de acordo com a reivindicação 9 ou 10, no fabrico de uma composição para prevenção ou inibição da fosforilação de tirosina mediada pelo receptor de IL-5.

Lisboa, 2009-08-19

RESUMO

"Anticorpos monoclonais humanos para interleucina-5 e métodos e composições compreendendo os mesmos"

O presente invento refere-se a anticorpos e suas porções de ligação ao antigénio que se ligam especificamente a interleucina 5 (IL-5), que é de preferência IL-5 humana. O presente invento refere-se também a anticorpos anti-IL-5 humanos, incluindo anticorpos quiméricos, biespecíficos, derivados, de cadeia simples ou porções de proteínas de fusão. O presente invento refere-se também a moléculas de cadeia pesada e leve de imunoglobulina isoladas derivadas de anticorpos anti-IL-5 e a moléculas de ácido nucleico codificando tais moléculas. O presente invento refere-se também a métodos de produção de anticorpos anti-IL-5, composições farmacêuticas compreendendo estes anticorpos e métodos de utilização dos anticorpos e das suas composições para diagnóstico e tratamento. O presente invento proporciona também métodos de terapia génica utilizando moléculas de ácido nucleico codificando as moléculas pesadas e/ou leves de imunoglobulina que constituem os anticorpos anti-IL-5 humanos. O presente invento refere-se também a métodos de terapia génica e animais transgénicos compreendendo moléculas de ácido nucleico do presente invento.