



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

(11) PI 0909044-4 B1



(22) Data do Depósito: 11/03/2009

(45) Data de Concessão: 29/12/2020

(54) Título: ANTICORPO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE AO CSF-1R HUMANO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DOS MESMOS

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; A61P 35/00; A61P 37/00; C12N 15/13; C12N 15/63.

(30) Prioridade Unionista: 10/04/2008 US 61/043884; 14/03/2008 EP 08360005.6.

(73) Titular(es): TRANSGÈNE S.A..

(72) Inventor(es): HÉLÈNE HAEGEL; CHRISTINE THIOUDELLET; MICHEL GEIST; BENOÎT GRELLIER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009001733 de 11/03/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/112245 de 17/09/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/09/2010

(57) Resumo: ANTICORPO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS, VETOR, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT DE PARTES, E, USO DE UM ANTICORPO, UMA SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS, UM VETOR, UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA OU UM KIT DE PARTES. A presente invenção fornece anticorpos específicos para o CSF-1R, composições compreendendo os ditos anticorpos e métodos de tratamento usando tais composições.

“ANTICORPO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE AO CSF-1R HUMANO,
COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DOS MESMOS”

DESCRIÇÃO

[001] O CSF-1 (Fator estimulador de colônias-1) é uma citocina expressa particularmente por vários tipos de células. É um fator de diferenciação, crescimento e sobrevivência para células da linhagem de fagócito mononuclear que expressa o receptor para CSF-1 (CSF-1R) (SHERR. Colony-stimulating factor-1, *blood*. 1990, vol.75, no.1, p.1-12). CSF-1R é um receptor de tirosina quinase codificado pelo proto-oncogene *c-fms* que contém um domínio quinase intracelular e uma região extracelular de ligação ao ligante organizada em cinco subdomínios do tipo imunoglobulina. A resposta ao CSF-1 resulta em maiores sobrevivência, crescimento, diferenciação e mudanças reversíveis na função. O próprio gene *c-fms* é um marcador de diferenciação de macrófago. O grau da expressão de *c-fms* é mais forte do que aquela de outros genes específicos de macrófago, incluindo lisozima e uma proteína tirosina fosfatase específica de macrófago. (HUME, et al. Regulation of CSF-1 receptor expression. *Molecular reproduction and development*. 1997, vol.46, no.1, p.46-52).

[002] Além das células da linhagem de fagócito mononuclear, o CSF-1R também é expresso por muitos tipos de tumores humanos. No câncer de mama, a expressão de CSF-1 R está associada a tamanhos maiores de tumor e menor sobrevivência (KLUGER, et al. Macrophage colony-stimulating factor-1 receptor expression is associated with poor outcome in breast cancer by large cohort tissue microarray analysis. *Clinical cancer research*. 2004, vol.10, no.1, p.173-7; SCHOLL, et al. Anti-colony-stimulating factor 1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994, vol.86, no.2, p.120-6). No câncer epitelial de ovário, a maioria dos tumores primários e metástases expressam fortemente o CSF-1R, e as metástases co-

expressam frequentemente CSF-1 e CSF-1R. O CSF-1R também é expresso por macrófagos infiltradores de tumor (CHAMBERS, et al. Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and receptor of CSF-1: a poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. *Clinical Cancer Research*. 1997, vol.3, no.6, p.999-1007). Em cânceres de ovário e endometrial, a análise Northern blot mostra que a grande maioria dos tumores co-expressa CSF-1 e CSF-1R, embora a expressão de CSF-1R seja apenas fracamente detectada em amostras de tecido endometrial normal (BAÏOCCHI, et al. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and its receptor in gynecologic malignancies. *Cancer*. 1991, vol.67, no.4, p.990-6). Em carcinomas cervicais a expressão de CSF-1R é suprarregulada tanto em tumor estromal quanto em tumor epitelial, comparada ao endométrio normal (KIRMA, et al. Elevated expression of the oncogene *c-fms* and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor-1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor-beta 1 in inducing *c-fms* expression. *Cancer res.* 2007, vol.67, no.5, p.1918-26). No carcinoma renal a infiltração de macrófagos associados a tumor que expressa altos níveis de CSF-1R está associada à progressão do tumor (HEMMERLEIN, et al. Expression of acute and late-stage inflammatory antigens, *c-fms*, CSF-1, and human monocytic serine esterase 1, in tumor-associated macrophage of renal cell carcinomas. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2000, vol.49, no.9, p.485-92). CSF-1R é expresso em quase 100 % de neoplasia intraepitelial prostática ou amostras de câncer (IDE, et al. Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, vol.99, no.22, p.14404-9). A expressão de CSF-1R também foi detectada em leucemias mieloblásticas agudas e leucemias linfocíticas crônicas de célula B (RAMBALDI, et al. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and *c-fms* genes in human acute myeloblasts leukemia cells. *Journal de Clinical Investigation*. 1988, vol.81, no.4, p.1030-5).

[003] Trabalhos realizados por imuno-histoquímica e hibridização *in situ* demonstraram especificidade da expressão de CSF-1 em células de câncer de mama invasivo, embora tal produção não seja observada em células de tumor intra-canal ou não invasivas (SCHOLL, et al. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994, vol.86, no.2, p.120-6; TANG, et al. M-CSF (monocyte colony stimulating fator) e M-CSF receptor expression by breast tumour cells: M-CSF mediated recruitment of tumour infiltrating monocytes? *Journal of cellular biochemistry*. 1992, vol.50, no.4, p.350-6). A produção de CSF-1 por células de tumor invasivo está correlacionada com seu aumento na concentração no plasma de pacientes, onde pode exceder 1.000 pg/mL comparado com menos de 300 pg/mL em sujeitos normais. Alta concentração sérica está correlacionada com estágios avançados da doença e prognóstico a curto prazo não favorável (SCHOLL, et al. Circulating levels of colony-stimulating factor 1 as a prognostic indicator in 82 patients with epithelial ovarian cancer. *British Journal of cancer*. 1994, vol.69, no.2, p.342-6; SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony-stimulating fator CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast Cancer research and tratamento*. 1996, vol.39, no.3, p.275-83). Além do mais, demonstrou-se que CSF-1 estimula mobilidade e invasividade de células de tumor (DORSCH, et al. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European Journal of immunology*. 1993, vol.23, no.1, p.186-90; WANG, et al. Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Journal of immunology*. 1988, vol.141, no.2, p.575-9; FILDERMAN₁ et al. Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) enhances invasiveness in CSF-1Receptor-positive carcinoma cell lines. *Cancer res.*. 1992, vol.52, no.13, p.3661-6).

[004] CSF-1 também apresenta um efeito quimiotático em precursores da linhagem mielóide que facilita a infiltração de monócitos no tumor. Entretanto, a presença destes monócitos não é suficiente para observar a destruição do tumor pelo sistema imune (DORSCH, et al. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European Journal of immunology*. 1993, vol.23, no.1, p.186-90). Parece que, em elevados teores séricos comumente observado em pacientes que sofrem de tumores de mama, ovários ou pâncreas, CSF-1 orienta a diferenciação destes monócitos em macrófagos e não em células dendríticas capazes de apresentar antígenos tumorais e, assim, iniciam uma resposta imune citotóxica eficiente direcionada contra células de tumor (SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast Cancer research and treatment*. 1996, vol.39, no.3, p.275-83; BARON, et al. Modulation of MHC class II transport and lysosome distribution by macrophage-colony stimulating factor in human dendritic cells derived from monocytes. *Journal of cell science*. 2001, vol.114, no.pt5, p.999-1010).

[005] CSF-1 também é essencial para proliferação e diferenciação de osteoclastos (CECCHINI, et al. Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. *Molecular reproduction and development*. 1997, vol.46, no.1, p.75-83). Os osteoclastos são células multinucleadas que expressam o CSF-1R que deriva de precursores hematopoiéticos que são principalmente responsáveis pela degradação do osso mineralizado durante o desenvolvimento, homeostase e reparo ósseo. Em vários distúrbios do esqueleto, tais como osteoporose, hipercalcemia de malignidade, artrite reumatóide, metástases de tumor e doença de Paget, a reabsorção óssea por osteoclastos excede na formação óssea por osteoblastos, o que leva à menor massa óssea, fragilidade do esqueleto e fratura óssea (BRUZZANITI, et al.

Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in endocrine*. 2006, vol.7, no.1-2, p.123-39). Por exemplo, pacientes com câncer de mama avançado desenvolvem frequentemente metástase para os ossos. A metástase óssea resulta em dor intratável e um elevado risco de fraturas em virtude de perda óssea dirigida pelo tumor (osteólise), que é causada por maior atividade osteoclástica (CICEK, et al. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics. *Cancer metastasis reviews*. 2006, vol.25, no.4, p.635-44). Observa-se que a osteólise está ligada a um nível elevado de CSF-1 circulante (KITAURA, et al. *The Journal of clinical investigation*. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. 2005, vol.115, no.12, p.3418-27).

[006] A via de CSF-1 também está envolvida na mediação da inflamação intestinal em doença tal como doença do intestino inflamatório (MARSHALL, et al. Blockade of colony stimulating factor-1 (CSF-I) leads to inhibition of DSS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2007, vol.13, no.2, p.219-24), na mediação da proliferação de macrófago durante rejeição aguda de aloenxerto (JOSE, et al. Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allograft rejection. *American Journal of transplantation*. 2003, vol.3, no.3, p.294-300), e na replicação de HIV-1 no macrófago infectado (KUTZA, et al. Macrophage colony-stimulating factor antagonists inhibit replication of HIV-1 in human macrophages. *Journal of immunology*. 2000, no.164, p.4955-4960).

[007] Por estas razões, a inibição da atividade de CSF-1 por vários compostos foi proposta para o tratamento de câncer e degradação óssea.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[008] WO 01/30381 diz respeito ao uso de inibidores da atividade de CSF-1 na produção de medicamentos para o tratamento de doenças tumorais. As duas abordagens propostas para a inibição da atividade

de CSF-1 são a própria supressão da atividade de CSF-1 e a supressão da atividade do CSF-1R. Anticorpos neutralizantes contra CSF-1 ou seu receptor são preferidos como os inibidores da atividade de CSF-1.

[009] WO 03/059395 descreve a combinação de produtos que compreendem uma substância capaz de inibir a atividade de CSF-1 e uma substância com uma atividade citotóxica para o tratamento de câncer.

[010] WO 2005/068503 revela um método para prevenir e tratar osteólise, metástase do câncer e perda óssea associada à metástase do câncer administrando um anticorpo contra CSF-1 a um sujeito.

[011] EP 1488792 A diz respeito ao uso de compostos de quinazolina de arila ou heteroarila mono e/ou bicíclica que exibem inibição seletiva de diferenciação, proliferação ou liberação mediadora inibindo efetivamente a atividade de tirosina quinase de CSF-1R. Este pedido também diz respeito ao uso de tais compostos para a fabricação de um medicamento para inibir proliferação celular anormal.

[012] US 2005059113 diz respeito a anticorpos e porções de ligação de antígeno destes que se ligam especificamente à CSF-1a. A invenção também diz respeito a anticorpos anti-CSF-1 humanos e porções de ligação de antígeno destes. Este pedido da invenção também fornece métodos de terapia de gene usando moléculas de ácido nucleico que codificam as moléculas de imunoglobulina pesada e/ou leve que compreendem os anticorpos anti-CSF-1 humanos.

REVELAÇÃO DA INVENÇÃO

[013] A presente invenção diz respeito a um anticorpo que se liga especificamente ao CSF-1R.

[014] Da maneira usada em todo o pedido, as preposições "a" e "o" são usadas no sentido de que significam "pelo menos um", "pelo menos um primeiro", "um ou mais" ou "uma pluralidade" dos componentes ou etapas referenciados, a menos que o contexto dite claramente de outra

forma. Por exemplo, o termo "uma célula" inclui uma pluralidade de células, incluindo misturas destas.

[015] O termo "e/ou" sempre aqui usado inclui o significado de "e", "ou" e "toda ou qualquer outra combinação dos elementos conectados pelo dito termo".

[016] O termo "cerca de" ou "aproximadamente", da maneira aqui usada, significa em 20 %, preferivelmente em 10 %, e mais preferivelmente em 5 % de um dado valor ou faixa.

[017] Da maneira aqui usada, pretende-se que as palavras "compreendendo" e "compreendem" signifiquem que os kits de partes, produtos, composições e métodos incluam componentes ou etapas referenciados, mas não excluam outros. "Que consiste essencialmente em", quando usado para definir produtos, composições e métodos pode significar que exclui outros componentes ou etapas de qualquer significância essencial. Assim, uma composição que consiste essencialmente nos componentes citados não excluiria contaminantes traço e carreadores farmacêuticamente aceitáveis. "Que consiste em" pode significar que exclui mais do que elementos traço de outros componentes ou etapas.

[018] Da maneira aqui usada, o termo "liga-se especificamente a" refere-se a uma reação de ligação que é determinante da presença de uma proteína alvo na presença de uma população heterogênea de proteínas e outros compostos biológicos. Assim, em condições de ensaio projetadas, o anticorpo de acordo com a invenção se liga preferencialmente a pelo menos parte do CSF-1R e não se liga em uma quantidade significativa a outros componentes presentes em uma amostra teste. A ligação específica entre o anticorpo de acordo com a invenção e o CSF-1R alvo significa que a afinidade de ligação é de pelo menos 10^3 M^{-1} , e preferivelmente 10^5 M^{-1} , 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} ou 10^{10} M^{-1} .

[019] Da maneira aqui usada, o termo "CSF-1R" refere-se

ao receptor CSF1 humano. O receptor CSF-1 humano foi sequenciado e sua sequência de aminoácidos são representados em SEQ ID NO: 29.

[020] Da maneira aqui usada, "anticorpo" ou "Ab" é usado no sentido mais amplo. Portanto, um "anticorpo" ou "Ab" pode ser de ocorrência natural ou sintetizado, tais como anticorpos monoclonais (Abms) produzidos por tecnologia de hibridoma convencional, tecnologia recombinante e/ou um fragmento funcional destes. Sabe-se que os anticorpos da presente invenção incluem ambas as moléculas de imunoglobulina intactas, por exemplo, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal (Abm), um anticorpo monoespecífico, um anticorpo biespecífico, um anticorpo poliespecífico, um anticorpo humano, um anticorpo animal (por exemplo, anticorpo camelídeo), anticorpos quiméricos, bem como porções, fragmentos, regiões, peptídeos e derivados destes (fornecidos por qualquer técnica conhecida, tais como, mas sem limitação, clivagem enzimática, síntese de peptídeo ou técnicas recombinantes), tais como, por exemplo, desprovidos de imunoglobulina de cadeias leves (ver, por exemplo, US 6.005.079), Fab, Fab¹, F(ab')₂, Fv, Fvsc, fragmento de anticorpo, diacorpo, Fd, regiões CDR, ou qualquer porção ou sequência de peptídeos do anticorpo que é capaz de se ligar a antígeno ou epítipo. Sabe-se que um anticorpo é "capaz de se ligar a" uma molécula se ele for capaz de reagir especificamente com a molécula para ligar por meio disso a molécula no anticorpo. Os fragmentos de anticorpo ou porções podem precisar do fragmento Fc de anticorpo intacto, remover mais rapidamente da circulação, e podem ter menos tecido não específico de ligação do que um anticorpo intacto. Exemplos de anticorpo podem ser produzidos a partir de anticorpos intactos usando métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, por clivagem proteolítica com enzimas tal como papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos F(ab')₂). Ver, por exemplo, Wahl et al., 24 J. Nucl. Med. 316-25 (1983). Porções de anticorpos podem ser obtidas por quaisquer dos métodos

anteriores, ou podem ser obtidas expressando uma porção da molécula recombinante. Por exemplo, a(s) região(s) CDR de um anticorpo recombinante pode(m) ser isolada(s) e subclonada(s) no vetor de expressão apropriado.

[021] Da maneira aqui usada, o termo "região variável" refere-se à região variável, ou domínio, da cadeia leve (VL) ou cadeia pesada (VH) que contém os determinantes para especificidade de reconhecimento de ligação. Os domínios variáveis estão envolvidos no reconhecimento de antígeno e formam o sítio de ligação de antígeno. Da maneira aqui usada, o termo "região de arcabouço" refere-se à porções de regiões variáveis de cadeia leve e pesada que são pelo menos 85 % homólogos (isto é, sem ser a CDR's) entre anticorpos diferentes na mesma espécie. Da maneira aqui usada, o termo "homólogo" refere-se a uma comparação dos aminoácidos de dois polipeptídeos que, quando alinhados usando o algoritmo de Smith-Waterman (SMITH, et al. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*. 1981, no.147, p.195-7), apresentam aproximadamente o percentual projetado dos mesmos aminoácidos. Por exemplo, "85 % homólogos" refere-se a uma comparação dos aminoácidos de dois polipeptídeos que, quando alinhados de maneira ideal, apresentam 85 % de identidade de aminoácido. A região variável tanto da cadeia pesada quanto da leve é dividida em segmentos compreendendo quatro sub-regiões de arcabouço (FR1, FR2, FR3, e FR4), interrompida por três alongamentos de sequências hipervariáveis, ou as regiões que determinam a complementaridade (CDR's), da maneira definida na base de dados de Kabat (Kabat et al., op. cit), com a CDR1 posicionada entre FR1 e FR2, CDR2 entre FR2 e FR3, e CDR3 entre FR3 e FR4. Sem especificar as sub-regiões particulares como FR1, FR2, FR3 ou FR4, uma região de arcabouço, da maneira referida por outros, representa as FR's combinadas na região variável de uma cadeia de imunoglobulina única de ocorrência natural. Da maneira

aqui usada, uma FR representa uma das quatro sub-regiões, e FR's representa duas ou mais das quatro sub-regiões que constituem uma região de arcabouço. As sequências das regiões de arcabouço de cadeias leves ou pesadas diferentes são relativamente conservadas em uma espécie. A região de arcabouço de um anticorpo são as regiões de arcabouço combinadas das cadeias leve e pesada constituintes e serve para posicionar e alinhar as CDR's. As CDR's são responsáveis principalmente por formar o sítio de ligação de um anticorpo que confere especificidade e afinidade de ligação a um epítopo de um antígeno. As regiões variáveis das cadeias H ou L que fornecem as regiões de antígeno de ligação são menores do que as sequências intituladas "hipervariáveis" em decorrência de sua variabilidade extrema entre anticorpos de especificidade diferente. Tais regiões hipervariáveis também são referidas como "regiões que determinam complementaridade" ou "regiões". Estas regiões CDR são responsáveis pela especificidade básica do anticorpo para uma estrutura antigênica determinante particular. As CDRs representam alongamentos não contíguos de aminoácidos nas regiões variáveis, mas independente da espécie, observa-se que a localização posicional destas sequências de aminoácidos críticas nas regiões de cadeia pesada e leve variáveis apresenta localizações similares nas sequências de aminoácidos das cadeias variáveis. As cadeias pesadas e leves variáveis de todos os anticorpos apresentam cada qual 3 regiões CDR, cada qual não contígua com as outras (denominadas L1, L2, L3, H1 H2, H3) para as respectivas cadeias leves (L) e pesadas (H). As regiões CDR aceitas foram descritas por Kabat et al, 252 J. Biol. Chem. 6609-16 (1977), e alças de CDR podem ser identificadas aplicando estas regras durante um exame de uma sequência linear de aminoácidos. Entretanto, as regras para definir a alça H3 de CDR podem variar (ver capítulo 4, Antibody Engineering: Methods & Protocols, (Lo, ed. Humana Press, Totowa, NJ, 2004)), e os limites atuais de algumas alças H3 de CDR podem não ser identificadas sem técnicas experimentais, tais como

dicroísmo circular, ressonância magnética nuclear ou cristalografia de raios-X. Em todas as espécies de mamíferos, os peptídeos de anticorpo contêm regiões constantes (isto é, altamente conservadas) e variáveis e, nesta última, existem as CDRs e as assim denominadas "regiões de arcabouço" preparadas de sequências de aminoácidos na região variável da cadeia pesada ou leve, mas fora das CDRs. As regiões CDR também podem ser definidas usando a nomenclatura Chothia (CHOTHIA & LESK. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (1987) J Mol Biol. 20 de agosto de 1987; 196(4):901-17). Portanto, em certas modalidades, as CDRs são CDRs definidas por Kabat e, em outras modalidades, as CDRs são CDRs definidas por Chothia. Com relação à determinante antigênico reconhecido pelas regiões CDR do anticorpo, isto é também referido como o "epítopo". Em outras palavras, epítopo refere-se àquela porção de qualquer molécula capaz de ser reconhecida e ligada por um anticorpo (a região de ligação de anticorpo correspondente pode ser referida como um parátopo). Em geral, epítopos consistem em agrupamentos superficiais quimicamente ativos de moléculas, por exemplo, cadeias laterais de aminoácidos ou açúcar, e apresentam características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específica.

[022] O termo "anticorpo monoclonal" ou "Abm", da maneira aqui usada, refere-se a um anticorpo que é derivado de um clone único. Anticorpos monoclonais podem ser preparados usando técnicas de hibridoma tais como aquelas reveladas em HARLOW. Antibodies: A Laboratory manual. 2ª edição. Cold Spring Harbor: Laboratory press, 1988. e HAMMERLING, et al. Monoclonal antibodies and T Cell Hybridomas. New York: Elsevier, 1981. p.563-681.

[023] Da maneira aqui usada, o termo "anticorpo humano" refere-se a um anticorpo com regiões variáveis e constantes derivado ou que combina de maneira muito próxima com sequências de imunoglobulina de

linhagem germinal humana. O anticorpo humano da invenção pode incluir resíduo de aminoácido não codificados por sequências de imunoglobulina de linhagem germinal humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou sítio específica *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). Assim, da maneira aqui usada, o termo "anticorpo humano" refere-se a um anticorpo no qual substancialmente cada parte da proteína é substancialmente similar a um anticorpo de linhagem germinal humana. "Substancialmente similar" refere-se a um anticorpo com uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos 80, preferivelmente 85, mais preferivelmente 90 e ainda mais preferivelmente 95 % homóloga à sequência de ácidos nucleicos de um anticorpo de linhagem germinal humana.

[024] Da maneira aqui usada, o termo "Fab" refere-se às regiões de moléculas de anticorpo que incluem a região variável da cadeia pesada e cadeia leve e que exibem atividade de ligação. "Fab" inclui agregados de uma cadeia pesada e uma leve (comumente conhecidos como Fab), se quaisquer dos anteriores são covalentemente ou não covalentemente agregados, contanto que a agregação seja capaz de reagir seletivamente com um antígeno particular ou família de antígeno. O fragmento Fab é um heterodímero compreendendo um VL e um segundo polipeptídeo compreendendo os domínios VH e CH1. Em uma modalidade preferida, o anticorpo é um fragmento Fab'. Os fragmentos Fab' diferem de fragmentos Fab, nos quais o fragmento Fab' contém poucos resíduos nas terminações carbóxi do domínio de CH1 de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da "região da dobradiça" do anticorpo.

[025] "F(ab')₂" refere-se a um fragmento de anticorpo obtido pelo tratamento com pepsina de um anticorpo ou à proteína equivalente obtida por outras técnicas, tais como tecnologias recombinantes. O fragmento F(ab')₂ apresenta dois sítios de combinação de antígeno e ainda é capaz de se ligar de maneira cruzada a um antígeno.

[026] "Fv" é o fragmento mínimo de anticorpo que contém um reconhecimento completo de antígeno e sítio de ligação. Esta região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em associação firme não covalente. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação de antígeno na superfície do dímero VH VL. Coletivamente, as seis CDRs conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável único (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicas para um antígeno) apresenta a capacidade de reconhecer e se ligar ao antígeno, embora em uma afinidade menor do que todo o sítio de ligação.

[027] "Fv de cadeia única" ou "Fvsc" compreendem os domínios VH e VL de anticorpo, em que estes domínios estão presentes em uma cadeia única de polipeptídeo. Preferivelmente, o Fvsc compreende adicionalmente um ligante de polipeptídeo entre os domínios VH e VL que capacitam o Fvsc a formar a estrutura desejada para ligação de antígeno (LENNARD. Standard protocols for the construction of scFv libraries. *Methods in molecular biology*. 2002, no.178, p.59-71).

[028] Da maneira aqui usada, o termo "fragmento de anticorpo" refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que mantêm a capacidade de se ligar especificamente ao CSF-1R.

[029] A palavra "diacorpos" refere-se a fragmento pequeno de anticorpos com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia de polipeptídeo (VH VL). Usando um ligante que é muito curto para permitir o pareamento os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parar com os domínios complementares de uma outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno. Os diacorpos podem se ligar a um minério mais

do que a um epítipo. Os diacopos são descritos mais completamente em POLJAK. Production and structure of diabodies. *Structure*. 1994, vol.2, no.12, p.1121-3, HUDSON, et al. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of immunological methods*. 1999, vol.231, no.1-2, p.177-89. e KIPRIYANOV. Generation of bispecific and tandem diabodies. *Methods in molecular biology*. 2002, no.178, p.317-31.

[030] Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados por meio da digestão proteolítica de anticorpos intactos. Entretanto, estes fragmentos podem agora ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos Fab, Fv e Fvsc de anticorpo podem ser todos expressos secretados de *E. coli*, permitindo assim a produção de grandes quantidades destes fragmentos. Técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão aparentes aos versados na técnica. Em outras modalidades, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia única (Fvsc).

[031] Da maneira aqui usada, "anticorpos de domínio" (Abds) consistem nas menores unidades de ligação funcionais de anticorpos, que correspondem às regiões variáveis tanto de cadeias pesadas (VH) quanto leves (VL) dos anticorpos. Os anticorpos de domínio apresentam um peso molecular de aproximadamente 13 kDa, ou menos que um décimo do tamanho de um anticorpo completo.

[032] Da maneira aqui usada, "Fd" refere-se a um fragmento de anticorpo que consiste nos domínios VH e CH1.

[033] A palavra "anticorpo" ou "Ab" também refere-se a outro fragmento de anticorpo bem conhecido pelos versados na técnica, por exemplo, aqueles descritos em HOLLIGER, et al. Engineered fragments of antibody and the rise of single domains. *Nature biotechnology*. 2005, vol.23, no.9, p.1126-36 e HOOGENBOOM, et al. Natural and designer binding sites

made by phage display technology. *Immunology today*. 2000, vol.21, no.8, p.371-8.

[034] De acordo com uma modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende:

(i) pelo menos uma CDR em que a dita CDR compreende pelo menos cinco aminoácidos consecutivos da sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2, da sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2 ou da sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2;

ou,

(ii) pelo menos uma CDR em que a dita CDR compreende pelo menos cinco aminoácidos consecutivos da sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4, da sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4 ou da sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[035] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende pelo menos uma CDR em que a dita CDR é, independentemente de uma outra, selecionada do grupo de CDRs compreendendo pelo menos cinco aminoácidos consecutivos:

-da sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

-da sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2,

-da sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2,

-da sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-da sequência que inicia na posição 66 e que termina na

posição 76 de SEQ ID NO:4

-ou da sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[036] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende 2, 3, 4 ou 5 e ainda mais preferivelmente 6 CDRs, em que as ditas CDRs são, independentemente de uma outra, selecionadas do grupo de CDRs compreendendo pelo menos cinco aminoácidos consecutivos:

-da sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

-da sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2,

-da sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2,

-da sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-da sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4

-ou da sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[037] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende:

(iii) 2 e ainda mais preferivelmente 3 CDRs, em que as ditas CDRs são, independentemente de uma outra, selecionadas do grupo de CDRs compreendendo pelo menos cinco aminoácidos consecutivos:

-da sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

-da sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2,

-da sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2,

ou

(iv) 2 e ainda mais preferivelmente 3 CDRs, em que as ditas CDRs são, independentemente de uma outra, selecionadas do grupo de CDRs compreendendo pelo menos cinco aminoácidos consecutivos:

-da sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-da sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4

-ou da sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende:

(i) pelo menos uma CDR selecionada, independentemente de uma outra, do grupo da CDR da maneira apresentada:

-na sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

-na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2 e

-na sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2; ou

(ii) pelo menos uma CDR selecionada, independentemente de uma outra, do grupo da CDR da maneira apresentada:

-na sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4 e

-na sequência que inicia na posição 109 e que termina na

posição 117 de SEQ ID NO:4.

[038] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende pelo menos uma CDR selecionada, independentemente de uma outra, do grupo da CDR da maneira apresentada:

- na sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

- na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2,

- na sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2,

- na sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

- na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4 e

- na sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[039] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende 2, 3, 4 ou 5 e ainda mais preferivelmente 6 CDRs selecionadas, independentemente de uma outra, do grupo da CDR da maneira apresentada:

- na sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

- na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2,

- na sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2,

- na sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4 e

-na sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[040] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende:

(iv) 2 e ainda mais preferivelmente 3 CDRs, em que as ditas CDRs são, independentemente de uma outra, selecionadas do grupo das CDRs da maneira apresentada:

-na sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

-na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2,

-na sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2, ou

(iv) 2 e ainda mais preferivelmente 3 CDRs, em que as ditas CDRs são, independentemente de uma outra, selecionadas do grupo das CDRs da maneira apresentada:

-na sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4,

-na sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[041] De acordo com uma modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende (i) pelo menos uma CDR compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 11, 12, ou 13; ou (ii) pelo menos uma CDR compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada

em qualquer uma das SEQ ID NOs: 14, 15 ou 16.

[042] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende pelo menos uma CDR compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

[043] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende 2, 3, 4, 5 e ainda mais preferivelmente 6 CDRs compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

[044] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende (i) pelo menos uma CDR da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 11, 12 ou 13; ou (ii) pelo menos uma CDR apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 14, 15 ou 16.

[045] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende pelo menos uma CDR da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

[046] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende 2, 3, 4, 5 e ainda mais preferivelmente 6 CDRs da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

[047] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende (i) pelo menos uma CDR compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 17, 18 ou 19; ou (ii) pelo menos uma CDR compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 20, 21 ou 22.

[048] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende pelo menos uma CDR compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 20, 21 ou 22.

[049] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende 2, 3, 4, 5 e ainda mais preferivelmente 6 CDRs compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 20, 21 ou 22.

[050] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende (i) pelo menos uma CDR da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 17, 18 ou 19; ou (ii) pelo menos uma CDR da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 20, 21 ou 22.

[051] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende pelo menos uma CDR apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 20, 21 ou 22.

[052] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende 2, 3, 4, 5 e ainda mais preferivelmente 6 CDRs da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 20, 21 ou 22.

[053] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende (i) pelo menos uma CDR compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 23, 24 ou 25; ou (ii) pelo menos uma CDR compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 26, 27 ou 28.

[054] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo

da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende pelo menos uma CDR compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27 ou 28.

[055] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende 2, 3, 4, 5 e ainda mais preferivelmente 6 CDRs compreendendo uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27 ou 28.

[056] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende (i) pelo menos uma CDR da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 23, 24 ou 25; ou (ii) pelo menos uma CDR da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 26, 27 ou 28.

[057] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende pelo menos uma CDR da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27 ou 28.

[058] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende 2, 3, 4, 5 e ainda mais preferivelmente 6 CDRs da maneira apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27 ou 28.

[059] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a dita região variável compreende as CDRs da maneira apresentada:

- na sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

- na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2 e

-na sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2.

[060] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a dita região variável compreende as CDRs da maneira apresentada:

-na sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4 e

-na sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[061] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a dita região variável compreende as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 11, 12 e 13.

[062] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a dita região variável compreende as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 14, 15 e 16.

[063] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a dita região variável compreende as três CDRs apresentadas em SEQ ID NOs: 17, 18 e 19.

[064] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a dita região variável compreende as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 20, 21 e 22.

[065] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo

da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a dita região variável compreende as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 23, 24 e 25.

[066] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a dita região variável compreende as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 26, 27 e 28.

[067] Em modalidades preferidas, a dita região variável compreende adicionalmente uma, mais preferivelmente duas, ainda mais preferivelmente três e definitivamente de maneira preferível quatro regiões de arcabouço e, mais preferivelmente, FR humana. Da maneira aqui usada, uma "FR humana" é uma região de arcabouço que é pelo menos 75 % homóloga à região de arcabouço de um anticorpo humano de ocorrência natural.

[068] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a região variável compreende uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em SEQ ID NO:6.

[069] Em uma modalidade mais preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a região variável é da maneira apresentada em SEQ ID NO:6.

[070] Em uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a região variável compreende uma sequência de aminoácidos da maneira apresentada em SEQ ID NO:9.

[071] Em uma outra modalidade mais preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende uma região variável, em que a região variável é da maneira apresentada em SEQ ID NO:9.

[072] Em uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende duas regiões variáveis, em que as regiões variáveis são, independentemente de uma outra, selecionadas do grupo de

(i) regiões variáveis compreendendo as CDRs da maneira apresentada:

-na sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

-na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2 e

-na sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2;

(ii) regiões variáveis compreendendo a CDR da maneira apresentada:

-na sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4 e

-na sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4;

(ii) regiões variáveis compreendendo as três CDRs apresentadas em SEQ ID NOs: 11, 12 e 13;

(iii) regiões variáveis compreendendo as três CDRs apresentadas em SEQ ID NOs: 14, 15 e 16;

(iv) regiões variáveis compreendendo as três CDRs apresentadas em SEQ ID NOs: 17, 18 e 19;

(v) regiões variáveis compreendendo as três CDRs apresentadas em SEQ ID NOs: 20, 21 e 22;

(vi) regiões variáveis compreendendo as três CDRs

apresentadas em SEQ ID NOs: 23, 24 e 25

e

(vii) regiões variáveis compreendendo as três CDRs apresentadas em SEQ ID NOs: 26, 27 e 28.

[073] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende:

(i) uma primeira região variável, em que a dita região variável compreende:

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2 e

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2; e

(ii) uma segunda região variável, em que a dita região variável compreende:

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4 e

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[074] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende:

(i) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 11, 12 e 13, e

(ii) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 14, 15 e 16.

[075] De acordo com uma modalidade preferida, o

anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende:

(i) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 17, 18, e 19, e

(ii) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 20, 21 e 22.

[076] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende:

(i) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 23, 24 e 25, e

(ii) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 26, 27 e 28.

[077] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende:

(i) uma região variável da maneira apresentada em SEQ ID NO:6 e

(ii) uma região variável da maneira apresentada em SEQ ID NO:9.

[078] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende:

(i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2 e

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2;

e

(ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo:

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na

posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4 e

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[079] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende (i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 11, 12 e 13, e (ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 14, 15 e 16.

[080] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende (i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 17, 18 e 19, e (ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 20, 21 e 22.

[081] De acordo com uma outra modalidade, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende (i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 23, 24 e 25, e (ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 26, 27 e 28.

[082] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende (i) uma região variável de cadeia pesada da maneira apresentada em SEQ ID NO:6 e (ii) uma região variável de cadeia leve da maneira apresentada em SEQ ID NO:9.

[083] De acordo com uma outra modalidade preferida, o

anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e é um Fvsc, em que o dito Fvsc compreende:

(i) regiões variáveis compreendendo:

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

-a CDR apresentada na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2 e

-a CDR apresentada na sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2;

e

(ii) uma região variável compreendendo:

-a CDR apresentada na sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-a CDR apresentada na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4 e

-a CDR apresentada na sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[084] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e é um Fvsc, em que o dito Fvsc compreende:

(i) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 11, 12, e 13, e

(ii) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 14, 15 e 16.

[085] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e é um Fvsc, em que o dito Fvsc compreende:

(i) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 17, 18 e 19, e

(ii) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 20, 21 e 22.

[086] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e é um Fvsc, em que o dito Fvsc compreende:

(i) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 23, 24 e 25, e

(ii) uma região variável compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 26, 27 e 28.

[087] De acordo com uma modalidade mais preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e é um Fvsc, em que o dito Fvsc compreende:

(i) uma região variável da maneira apresentada em SEQ ID NO:6 e

(ii) uma região variável da maneira apresentada em SEQ ID NO:9.

[088] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e é um Fvsc, em que o dito Fvsc compreende:

(i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

-a CDR apresentada na sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

-a CDR apresentada na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2 e

-a CDR apresentada na sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2

e

(ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo:

-a CDR apresentada na sequência que inicia na posição 44 e

que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-a CDR apresentada na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4 e

-a CDR apresentada na sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[089] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e é um Fvsc, em que o dito Fvsc compreende:

(i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 11, 12 e 13, e

(ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 14, 15 e 16.

[090] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e é um Fvsc, em que o dito Fvsc compreende:

(i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 17, 18 e 19, e

(ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 20, 21 e 22.

[091] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e é um Fvsc, em que o dito Fvsc compreende:

(i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 23, 24 e 25, e

(ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 26, 27 e 28.

[092] De acordo com uma modalidade mais preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e é um Fvsc, em que o dito Fvsc compreende:

(i) a região variável de cadeia pesada da maneira apresentada em SEQ ID NO:6 e

(ii) a região variável de cadeia leve da maneira apresentada em SEQ ID NO:9.

[093] Ainda em uma modalidade mais preferida, é fornecido o Fvsc em que pelo menos um aminoácido é substituído (de acordo com a tabela 1 e tabela 2) na sequência de aminoácidos da maneira apresentada em SEQ ID NO 6 e 9. Em uma modalidade definitivamente preferida, é fornecido o anticorpo humano em que todos os aminoácidos representados na tabela 1 e tabela 2 são substituídos (de acordo com a tabela 1 e tabela 2) na sequência de aminoácidos da maneira apresentada em SEQ ID NO 6 e 9.

[094] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende a cadeia pesada da maneira apresentada em SEQ ID NO:2.

[095] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende a cadeia leve da maneira apresentada em SEQ ID NO:4.

[096] De acordo com uma modalidade mais preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende a cadeia pesada da maneira apresentada em SEQ ID NO:2 e a cadeia leve da maneira apresentada em SEQ ID NO:4.

Ainda de acordo com uma modalidade mais preferida, o anticorpo da invenção se liga especificamente a CSF-1R e compreende duas cadeias pesadas da maneira apresentada em SEQ ID NO:2 e duas cadeias leves da maneira apresentada em SEQ ID NO:4. Este anticorpo particular será denominado CXIIG6 em todo o presente pedido.

[097] De acordo com uma outra modalidade preferida, a presente invenção diz respeito a um anticorpo humano, que se liga

especificamente a CSF-1R, compreendendo:

(i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 45 e que termina na posição 54 de SEQ ID NO:2,

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 87 de SEQ ID NO:2 e

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 117 e que termina na posição 126 de SEQ ID NO:2;

e

(ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo:

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 44 e que termina na posição 56 de SEQ ID NO:4,

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 66 e que termina na posição 76 de SEQ ID NO:4 e

-a CDR da maneira apresentada na sequência que inicia na posição 109 e que termina na posição 117 de SEQ ID NO:4.

[098] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito a um anticorpo humano, que se liga especificamente a CSF-1R, compreendendo:

(i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 11, 12 e 13, e

(ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 14, 15 e 16.

[099] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito a um anticorpo humano, que se liga especificamente a CSF-1R, compreendendo:

(i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 17, 18 e 19, e

(ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo as três

CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 20, 21 e 22.

[0100] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito a um anticorpo humano, que se liga especificamente a CSF-1R, compreendendo:

(i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 23, 24 e 25, e

(ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo as três CDRs da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 26, 27 e 28.

[0101] De acordo com uma modalidade preferida, a presente invenção diz respeito a um anticorpo humano, que se liga especificamente a CSF-1R, compreendendo:

(i) a região variável de cadeia pesada apresentada em SEQ ID NO:6 e

(ii) a região variável de cadeia leve apresentada em SEQ ID NO:9.

[0102] Em uma modalidade mais preferida, é fornecido o anticorpo humano em que pelo menos um aminoácido é substituído (de acordo com a tabela 1 e tabela 2) na sequência de aminoácidos da maneira apresentada em SEQ ID NO: 6 e 9. Ainda em uma modalidade mais preferida, é fornecido o anticorpo humano em que todos os aminoácidos representados na tabela 1 e tabela 2 são substituídos (de acordo com a tabela 1 e tabela 2) na sequência de aminoácidos da maneira apresentada em SEQ ID NO: 6 e 9.

Tabela 1

SEQ ID NO:6	Posição	Substituição preferida
K	3	Q
E	5	V
M	18	L
K	19	R
W	33	Y
S	40	A
E	42	G

M	43	K
A	49	G
E	50	R
I	51	T
A	59	T
F	61	E
E	64	A
S	79	N
V	81	L
R	89	K
P	90	T, A
G	94	A
I	95	V
T	99	A
N	107	Y, V
T	113	L
L	114	V

Tabela 2

SEQ ID NO:9	Posição	Substituição preferida
A	9	S
V	13	A
E	17	D
T	18	R
E	27	Q
N	28	G
Q	40	P, D
S	43	A
Q	45	K
V	48	L
H	49	Y
N	53	R
A	55	E
D	56	S
Q	70	D
Y	71	F
S	72	T
K	74	T
N	76	S
S	80	P
G	84	A
S	85	T
H	90	Q
G	100	Q

[0103] O anticorpo, mais especificamente o anticorpo humano de acordo com a invenção pode ser de isotipos diferentes, tais como IgG, IgA, IgM ou IgE. Em uma modalidade preferida, o anticorpo, mais especificamente o anticorpo humano de acordo com a invenção é um IgG.

[0104] Em uma modalidade relacionada, o anticorpo humano compreende uma região constante modificada ou não modificada de uma IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana. Em uma modalidade preferida, a região constante é IgG1 ou IgG4 humana, que pode ser opcionalmente modificada para aumentar ou diminuir certas propriedades.

[0105] No caso de IgG1, modificações na região constante, particularmente a região de dobradiça ou CH2, podem aumentar ou diminuir a função efetora, incluindo atividade ADCC e/ou CDC. Em outras modalidades, uma região constante de IgG2 é modificada para diminuir a formação de

agregado anticorpo-antígeno. No caso de IgG4, modificações na região constante, particularmente a região da dobradiça, podem reduzir a formação de meio-anticorpo.

[0106] A afinidade de ligação desejada pode ser mantida mesmo sabendo que um ou mais dos aminoácidos no anticorpo são mutados. Estes variantes apresentam pelo menos um aminoácido no anticorpo substituído por um resíduo diferente. De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo que se liga especificamente a CSF1, da maneira descrita anteriormente, na qual pelo menos um dos aminoácidos compreendidos na CDR(s) é substituído de maneira conservativa. As substituições conservativas são mostradas na tabela 3.

Tabela 3

Aminoácido original	Substituição conservativa preferida	Substituição conservativa mais preferida
A	V, L, I	V
R	K, Q, N	K
N	Q, H, D, K, R	Q
D	E, N	E
C	S, A	S
Q	N, E	N
E	D, Q	D
G	A	A
H	N, Q, K, R	R
I	L, V, M, A, F	L
L	I, V, M, A, F	I
K	R, Q, N	R
M	L, F, I	L
F	W, L, V, I, A, Y	Y

Aminoácido original	Substituição conservativa preferida	Substituição conservativa mais preferida
P	A	A
S	T	T
T	V, S	S
W	Y, F	Y
Y	W, F, T, S	F
V	L, M, F, A	L

[0107] A presente invenção também diz respeito a um processo de modificar o anticorpo da invenção por maturação de afinidade.

[0108] Da maneira aqui usada, "maturação de afinidade" refere-se à substituição de um ou mais aminoácidos compreendidos em uma ou mais CDRs, a dita substituição resultante em uma melhoria na afinidade do anticorpo com CSF-1R, comparada a um anticorpo pai que não possui aquela(s) substituição(s). Os processos de maturação de afinidade são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, métodos revelados em MARKS, et al. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology*. 1992, vol.10, no.7, p.779-83; BARBAS, et al. *In vitro* evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994, vol.91, no.9, p.3809-13; SCHIER. identification of

functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. *Gene*. 1996, vol.169, no.2, p.147-55; YELTON. Affinity maturation of the BR96 anti-carcinoma antibody by codon-based mutagenesis. *J. Immunol.* 1995, vol.155, no.4, p.1994-2004; JACKSON, et al. *In vitro* antibody maturation. Improvement of a high affinity, neutralizing antibody against IL-1 beta. *J. Immunol.* 1995, vol.154, no.7, p.3310-9. e HAWKINS, et al. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking maturation of affinity. *Journal of molecular biology*. 1992, vol.226, no.3, p.889-96.

[0109] A presente invenção também diz respeito a um anticorpo, que se liga especificamente a CSF-1R, obtido por maturação de afinidade da maneira previamente descrita.

[0110] Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece variantes do anticorpo previamente descrito, com uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 %, preferivelmente pelo menos 85 %, mais preferivelmente pelo menos 90 %, e ainda mais preferivelmente pelo menos 98 % homóloga à sequência de aminoácidos do anticorpo previamente descrito.

[0111] Em uma outra modalidade, o anticorpo de acordo com a invenção liga-se especificamente a mais de um epítopo. Por exemplo, o anticorpo de acordo com a invenção pode se ligar a dois epítopos diferentes de CSF-1R. Alternativamente, o anticorpo de acordo com a invenção pode ser capaz de se ligar a CSF-1R e a uma outra molécula. Da maneira aqui usada, anticorpos que se ligam especificamente a mais de um epítopo podem ser anticorpos reticulados. Por exemplo, um anticorpo pode ser acoplado à avidina, o outro à biotina. Anticorpos reticulados podem ser preparados usando quaisquer métodos de reticulação convenientes bem conhecidos na técnica. Técnicas para gerar anticorpos biespecíficos de fragmentos de anticorpo também foram descritas, ver, por exemplo, BRENNAN, et al. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal

immunoglobulin G1 fragments. *Science*. 1985, vol.229, no.4708, p.81-3. e SHALABY, et al. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protoonogene. *The Journal of experimental medicine*. 1992, vol.175, no.1, p.217-25. KOSTELNY, et al. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J. Immunol*. 1992, vol.148, no.5, p.1547-33.

[0112] De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo que se liga especificamente a mais de um epítipo de acordo com a invenção é um diacorpo.

[0113] De acordo com uma outra modalidade preferida, o anticorpo que se liga especificamente a mais de um epítipo de acordo com a invenção é um anticorpo linear, da maneira descrita em ZAPATA, et al. Engineering linear F(ab')₂ fragments for efficient production in *Escherichia coli* and enhanced antiproliferative activity. *Protein engineering*. 1995, vol.8, no.10, p.1057-62.

[0114] O anticorpo de acordo com a invenção pode ser glicolisado ou não glicolisado.

[0115] Da maneira aqui usada, o termo "glicosilação" refere-se à presença de unidades de carboidrato que são covalentemente anexadas ao anticorpo.

[0116] Em uma outra modalidade, o anticorpo de acordo com a invenção é conjugado a um agente radiosensibilizador, um receptor e/ou um agente citotóxico

[0117] Da maneira aqui usada, o termo "radiosensibilizador" refere-se a uma molécula que prepara células mais sensíveis para terapia de radiação. Radiosensibilizador inclui, mas sem limitação, metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, E09, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodeoxiuridina (BUdR), 5-iododesoxiido (IUdR),

bromodesoxicitidina, fluordesoxiuridina (FUdR), hidroxiuréia e cisplatina.

[0118] Da maneira aqui usada, o termo "receptor" refere-se a um composto de se ligar especificamente a um ligante. De acordo com uma modalidade preferida da invenção o receptor é biotina.

[0119] Da maneira aqui usada, o termo agente citotóxico refere-se a um composto que é tóxico diretamente nas células, impedindo sua reprodução ou crescimento. De acordo com uma modalidade preferida, o agente citotóxico usado no contexto da presente invenção é escolhido do grupo compreendendo agente terapêutico para câncer, toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos destes) ou um isótopo radioativo.

[0120] Em uma outra modalidade, o anticorpo de acordo com a invenção é conjugado a um agente de rotulagem.

[0121] Da maneira aqui usada, "um agente de rotulagem" refere-se a um composto detectável. O agente de rotulagem pode ser ele mesmo detectável (por exemplo, rótulos de radioisótopo ou rótulos fluorescentes) ou, no caso de um rótulo enzimático, pode catalisar modificação química de um composto de substrato que é detectável.

[0122] Da maneira aqui usada, o termo "conjugado" significa que o anticorpo de acordo com a invenção e o agente de rotulagem são covalentemente ou não covalentemente ligados.

[0123] "Ligação covalente" refere-se ao acoplamento por meio de grupos funcionais reativos, opcionalmente com o uso intermediário de um reticulador ou outro agente de ativação (ver, por exemplo, HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996.). O anticorpo de acordo com a invenção e/ou o agente conjugado podem ser modificados a fim de permitir seu acoplamento, por exemplo, por meio de substituição em um grupo carbonila ativado (incluindo aqueles ativados *in situ*) ou em um imidoéster, por meio da adição em um grupo carbonila

insaturado, por aminação redutiva, substituição nucleofílica em um átomo de carbono saturado ou em um heteroátomo, por reação em ciclos aromáticos. Em particular, o acoplamento pode ser realizado usando reagentes de reticulação homobifuncionais ou heterobifuncionais. Reticuladores homobifuncionais incluindo glutaraldeído, ácido succínico e bis-imidoéster do tipo DMS (dimetil suberimidato) podem ser usados para acoplar grupos amina que podem estar presentes nas várias frações. Inúmeros exemplos que são fornecidos em HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p.118-228., são bem conhecidos pelos versados na técnica. Reticuladores heterobifuncionais incluem aqueles tanto com grupos reativos de amina e reativos de sulfidril, reativos de carbonila e reativos de sulfidril e grupos reativos de sulfidril quanto ligantes fotorreativos. Reticuladores heterobifuncionais adequados são, por exemplo, descritos em HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p.229-285. São exemplos, por exemplo, SPDP (propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio)), SMBP (butirato de succinimidil-4-(p-maleimidofenil)), SMPT (succinimidiloxycarbonil-metil:(-2-piridilditio) tolueno), MBS (M maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster), SIAB (aminobenzoato de N-succinimidil (4 iodoacetil)), GMBS (i-maleimidobutirilóxi) succinimida éster), SIAX (hexonato de succinimidil-6-iodoacetil amino, SIAC (succinimidil-4-iodoacetil amino metil), NPIA (iodoacetato de p-nitrofenil). Outros exemplos são usados para acoplar moléculas contendo carboidrato (por exemplo, glicoproteínas env, anticorpos) a grupos reativos com sulfidril. Exemplos incluem MPBH (ácido 4-(4-N maleimidofenil)butírico hidrazida) e PDPH (4-(N-maleimidometil) cicloexano-1-carboxil-hidrazida (M2C2H e 3-2(2-piridilditio) proprionil hidrazida).

[0124] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito a uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o anticorpo da invenção.

[0125] O termo "sequência de ácidos nucleicos" refere-se a uma sequência linear de nucleotídeos. Os nucleotídeos são tanto uma sequência linear de polirribonucleotídeos ou polidesoxirribonucleotídeos, ou uma mistura de ambos. Exemplos de polinucleotídeos no contexto da presente invenção incluem DNA de fita simples e fita dupla, RNA de fita simples e fita dupla e moléculas híbridas que apresentam tanto as misturas de DNA quanto de RNA de fita simples e fita dupla. Adicionalmente, os polinucleotídeos da presente invenção podem ter um ou mais nucleotídeos modificados.

[0126] De acordo com uma modalidade preferida da invenção, a sequência de ácidos nucleicos de acordo com a invenção é compreendida em um vetor.

[0127] O vetor pode ser de origem plasmidial ou viral e, onde apropriado, pode ser combinado com uma ou mais substâncias que melhoram a eficácia e/ou estabilidade transfeccional do vetor. Estas substâncias são amplamente documentadas na literatura que é disponível aos versados na técnica (ver, por exemplo, FELGNER, et al. Cationic liposome mediated transfection. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 1989, vol.32, p.115-21; HODGSON, et al. Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction. *Nature biotechnology*. 1996, vol.14, no.3, p.339-42.; REMY, et al. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjugate chemistry*. 1994, vol.5, no.6, p.647-54). A título de ilustração não limitante, as substâncias podem ser polímeros, lipídeos, em particular lipídeos catiônicos, lipossomos, proteínas nucleares ou lipídeos neutros. Estas substâncias podem ser usadas sozinhas ou em combinação. Uma combinação que pode ser prevista é aquela de um vetor de plasmídeo recombinante que é combinado com lipídeos catiônicos (DOGS, DC-CHOL, espermina-chol, spermidina-chol, etc.), lisofosfolipídeos (por exemplo, hexadecilfosfocolina) e lipídeos neutros (DOPE).

[0128] De acordo com uma modalidade preferida, os

lipídeos catiônicos que podem ser usados na presente invenção são os lipídeos catiônicos descritos em EP 901463 B e mais preferivelmente pcTG90.

[0129] A escolha dos plasmídeos que podem ser usados no contexto da presente invenção é muito ampla. Eles podem ser vetores de clonagem e/ou vetores de expressão. De uma maneira geral, são conhecidos pelos versados na técnica e, embora inúmeros deles sejam disponíveis comercialmente, também é possível construí-los ou modificá-los usando as técnicas de manipulação genética. Exemplos que podem ser mencionados são os plasmídeos que são derivados de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagene), pREP4, pCEP4 (Invitrogene) ou p Poli (LATHE, et al. Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts. *Gene*. 1987, vol.57, no.2-3, p.193-201.). Preferivelmente, um plasmídeo que é usado no contexto da presente invenção contém uma origem de replicação que garante que a replicação seja iniciada em uma célula produtora e/ou uma célula hospedeira (por exemplo, a de origem CoIEI será escolhida por um plasmídeo que pretende-se que seja produzido em *E. coli* e o sistema oriP/EBNA1 será escolhido se for desejado que o plasmídeo possa ser auto-replicado em uma célula hospedeira de mamífero, LUPTON, et al. Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Molecular and cellular biology*. 1985, vol.5, no.10, p.2533-42.; YATES, et al. Stable replication of plasmides derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*. 1985, vol.313, no.6005, p.812-5). O plasmídeo pode compreender adicionalmente um gene de seleção que permite que as células transfectadas sejam selecionadas ou identificadas (complementação de uma mutação auxotrófica, gene que codifica resistência a um antibiótico, etc.). Naturalmente, o plasmídeo pode conter elementos adicionais que melhoram sua manutenção e/ou sua estabilidade em uma dada célula (sequência *cer*, que promove a manutenção de um plasmídeo na forma

monomérica (SUMMERS, et al. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: CoIE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*. 1984, vol.36, no.4, p.1097-103, sequências para integração no genoma celular).

[0130] Com relação a um vetor viral, é possível prever um vetor que é derivado de um poxvírus (vírus da vacínia, em particular MVA, poxvírus de canários, etc.), de um adenovírus, de um retrovírus, de um herpesvírus, de um alfavírus, de um vírus espumoso ou de um vírus associado a adenovírus. É possível usar vetores virais de replicação competente ou de replicação deficiente. Será dada preferência para usar um vetor que não integra. Com relação a isto, vetores adenovirais e vetores que derivam de poxvírus, e mais preferivelmente de vírus da vaccínia e MVA, são particularmente muito adequados para implementar a presente invenção.

[0131] De acordo com uma modalidade preferida, o vetor viral de acordo com a invenção deriva de um vírus vaccínia de Ankara modificado (MVA). Os vetores e métodos de MVA para produzir tais vetores são descritos completamente nas patentes européias EP 83286 A e EP 206920 A, bem como em SUTTER, et al. Nonreplicating vacínia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proa Natl. Acad. ScL U.S.A.*. 1992, vol.89, no.22, p.10847-51. De acordo com uma modalidade mais preferida, a sequência de ácidos nucleicos de acordo com a invenção pode ser inserida na deleção I, II, III, IV, V e VI do vetor MVA e ainda mais preferivelmente na deleção III (MEYER, et al. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vacínia virus MVA and their influence on virulence. *The Journal of general virology*. 1991, vol.72, no.Pt5, p.1031 -8.; SUTTER, et al. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vacínia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine*. 1994, vol.12, no.11, p.1032-40).

[0132] Os retrovírus apresentam a propriedade de infectar

e, em muitos casos, integrar, dividir células e, com relação a isso, são particularmente apropriados para uso com relação à câncer. Um retrovírus recombinante de acordo com a invenção contém em geral as sequências LTR, uma região de encapsidação e a sequência de nucleotídeos de acordo com a invenção, que é colocada no controle do LTR retroviral ou de um promotor interno, tais como aqueles descritos a seguir. Os retrovírus recombinantes podem ser derivados de um retrovírus de qualquer origem (murino, primata, felino, humano, etc.) e, em particular, do MoMuLV (vírus da leucemia murina de Moloney), MVS (vírus do sarcoma murino) ou retrovírus murino de Friend (Fb29). São propagados em uma linhagem celular de encapsidação que é capaz de suprir em trans os polipeptídeos virais gag, pol e/ou env, que são exigidos para constituir uma partícula viral. Tais linhagens celulares são descritas na literatura (PA317, Psi CRIP GP + AM12 etc.). O vetor retroviral de acordo com a invenção pode conter modificações, em particular, nas LTRs (substituição da região promotora por um promotor eucarioto) ou na região de encapsidação (substituição por uma região de encapsidação heteróloga, por exemplo, o tipo VL3O) (ver US 5747323).

[0133] Será dada preferência também para usar um vetor adenoviral que necessita de toda ou parte de pelo menos uma região que é essencial para replicação e que é selecionada das regiões E1, E2, E4 e L1-L5 a fim de evitar o vetor que é propagado no organismo hospedeiro ou no ambiente. Uma deleção da região E1 é preferida. Entretanto, ela pode ser combinada com (uma)outra(s) modificação(s)/deleção(s) que afeta(m), em particular, todas ou parte das regiões E2, E4 e/ou L1-L5 até o grau em que as funções essenciais defectivas estão completas em trans por meio de uma linhagem celular complementar e/ou um vírus auxiliar. Com relação a isso, é possível usar vetores de segunda geração do estado da técnica (ver, por exemplo, pedidos internacionais WO 94/28152 e WO 97/04119). A título de ilustração, a deleção da principal parte da região E1 e da unidade de

transcrição de E4 é particularmente muito vantajosa. Com propósito de aumentar as capacidades de clonagem, o vetor adenoviral pode precisar adicionalmente de toda ou parte da região E3 não essencial. De acordo com uma outra alternativa, é possível fazer uso de um vetor adenoviral mínimo que mantém as sequências que são essenciais para encapsidação, ou seja, as ITRs 5' e 3' (Repetição terminal invertida) e a região de encapsidação. Os vários vetores adenovirais, e as técnicas para prepará-los, são conhecidos (ver, por exemplo, GRAHAM, et al. *Methods in molecular biology*. Editado por MURREY. *The human press inc*, 1991. p.109-128).

[0134] Além do mais, a origem do vetor adenoviral de acordo com a invenção pode variar tanto do ponto de vista da espécie quanto do ponto de vista do sorotipo. O vetor pode ser derivado do genoma de um adenovírus de origem humana ou animal (canina, aviária, bovina, murina, ovina, porcina, símio, etc.) ou de um híbrido que compreende fragmentos de genoma adenoviral de pelo menos duas pragens diferentes. Pode ser feita uma menção mais particular dos adenovírus CAV-I ou CAV-2 de origem canina, do adenovírus DAV de origem aviária ou do adenovírus Bad tipo 3 de origem bovina (ZAKHARCHUK, et al. *Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome (EDS-76) adenovirus DNA*. *Archives of virology*. 1993, vol.128, no.1-2, p.171-6.; SPIBEY, et al. *Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of two strains of canine adenovirus type 2*. *The Journal of general virology*. 1989, vol.70, no.Pt 1, p.165-72.; JOUVENNE, et al. *Cloning, physical mapping and cross-hybridization of the canine adenovirus types 1 and 2 genomes*. *Gene*. 1987, vol.60, no.1, p.21 -8.; MITTAL, et al. *Development of a bovine adenovirus type 3-based vector of expression*. *The Journal of general virology*. 1995, vol.76, no. Pt 1, p.93-102.). Entretanto, será dada preferência a um vetor adenoviral de origem humana que é preferivelmente derivado de um adenovírus sorotipo C, em particular um adenovírus sorotipo C tipo 2 ou 5.

[0135] O termo "replicação competente", da maneira aqui usada, refere-se a um vetor viral capaz de replicar em uma célula hospedeira na ausência de qualquer trans-complementação.

[0136] De acordo com uma modalidade preferida da invenção, o vetor de replicação competente é um vetor adenoviral de replicação competente. Estes vetores adenovirais de replicação competente são bem conhecidos pelos versados na técnica. Entre estes, os vetores adenovirais deletados na região E1b que codifica o inibidor 55kD P53, como no vírus ONYX-015 (BISCHOFF, et al. A adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*. 1996, vol.274, no.5286, p.373-6; He HEISE, et al. A adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature Medicine*. 2000, vol.6, no.10, p.1134-9.; WO 94/18992), são particularmente preferidos. Dessa maneira, este vírus pode ser usado para infectar e matar seletivamente células neoplásicas deficientes em p53. Os versados na técnica também podem mutar e romper o gene inibidor de p53 em adenovírus 5 ou outros vírus de acordo com técnicas estabelecidas. Vetores adenovirais deletados na região de ligação E1A Rb também podem ser usados na presente invenção. Por exemplo, o vírus Delta24 que é um adenovírus mutante que carrega uma deleção de 24 pares de bases na região E1A (FUEYO, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect *in vivo*. *Oncogene*. 2000, vol.19, no.1, p.2-12). Delta24 apresenta uma deleção na região de ligação Rb e não se liga à Rb. Portanto, a replicação do vírus mutante é inibida por Rb em uma célula normal. Entretanto, se Rb for inativada e a célula se torna neoplásica, Delta24 não é mais inibido. Ao contrário, o vírus mutante replica e lisa eficientemente a célula deficiente em Rb.

[0137] Um vetor adenoviral de acordo com a presente invenção pode ser gerado *in vitro* em *Escherichia coli* (*E. coli*) por ligação ou

recombinação homóloga (ver, por exemplo, pedido internacional WO 96/17070) ou ainda por recombinação em uma linhagem celular complementar.

[0138] De acordo com uma modalidade preferida da invenção, o vetor compreende adicionalmente os elementos necessários para a expressão do anticorpo de acordo com a invenção.

[0139] Os elementos necessários para a expressão consistem em todos os elementos que possibilitam a sequência de ácidos nucleicos ser transcrita em RNA, e o RNAm ser traduzido em polipeptídeo. Estes elementos compreendem, em particular, um promotor que pode ser regulável ou constitutivo. Naturalmente, o promotor é adequado ao vetor à célula hospedeira escolhida. Exemplos que podem ser mencionados são os promotores eucarióticos do PGK (fosfoglicerato quinase), MT (metalotioneína; MCIVOR. Human purine nucleoside phosphorylase and adenosine deaminase: gene transfer into cultured cells and murine hematopoietic stem cells by using recombinant amphotropic retroviruses. *Molecular and cellular biology*. 1987, vol.7, no.2, p.838-46), α -1 antitripsina, CFTR, agente tensoativo, imunoglobulina, actina (TABIN, et al. Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Molecular and cellular biology*. 1982, vol.2, no.4, p.426-36) e genes SRa (TAKEBE, et al. SR alpha promotor: a efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Molecular and cellular biology*. 1988, vol.8, no.1, p.466-72.), o promotor precoce do vírus SV40 (vírus de símio), LTR de RSV (vírus do sarcoma de Rous), o promotor HSV-I TK, o promotor precoce do vírus CMV (Citomegalovírus), os promotores p7.5K pH5R, pK1 L, p28 e p11 do vírus da vaccínia, promotores quiméricos tal como p11 K7.5 e os promotores adenovirais E1A e MLP. O promotor também pode ser um

promotor que estimula a expressão em uma célula de tumor ou câncer. Pode ser feita uma menção particular dos promotores do gene MUC-I, que é superexpresso nos cânceres de mama e próstata (CHEN, et al. Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promotor. *The Journal of clinical investigation*. 1995, vol.96, no.6, p.2775-82), do gene CEA (que corresponde ao antígeno de carcinoma embrionário), que é superexpresso em cânceres de cólon (SCHREWE, et al. Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. *Molecular and cellular biology*. 1990, vol.10, no.6, p.2738-48) do gene da tirosinase, que é superexpresso em melanomas (VILE, et al. Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer res.* 1993, vol.53, no.17, p.3860-4), do gene ERBB-2, que é superexpresso em cânceres de mama e pancreático (HARRIS, et al. Gene therapy for cancer using tumour-specific prodrug activation. *Gene therapy*. 1994, vol.1, no.3, p.170-5) e do gene α -fetoproteína, que é superexpresso em cânceres de fígado (KANAI, et al. *In vivo* gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. *Cancer res.* 1997, vol.57, no.3, p.461-5). O promotor precoce de citomegalovírus (CMV) é particularmente muito preferido.

[0140] Entretanto, quando um vetor que deriva de um vírus de vaccínia (por exemplo, como um vetor MVA) é usado, o promotor do gene 7.5K de timidina quinase e o promotor pH5R são particularmente preferidos.

[0141] Os elementos necessários podem, além do mais, incluir elementos adicionais que melhoram a expressão da sequência de ácidos nucleicos de acordo com a invenção ou sua manutenção na célula hospedeira, sequências de intron, sequências de sinal de secreção, sequências

de localização nuclear, sítios internos para o reinício da tradução do tipo IRES, sequências poli A de terminação de transcrição, líderes tripartidos e origens de replicação podem, em particular, se mencionados. Estes elementos são conhecidos pelos versados na técnica. Entre sequência sinal de secreção, as sequências que codificam os polipeptídeos da maneira apresentada em SEQ ID NO 5 e/ou 8 são particularmente preferidos.

[0142] O vetor recombinante de acordo com a invenção também pode compreender um ou mais genes adicionais de interesse, o que é possível para estes genes serem colocados no controle dos mesmos elementos regulatórios (cassetes policistronicos) ou de elementos independentes. Genes que, em particular podem ser mencionados são os genes que codificam interleucinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, quimocinas como CCL19, CCL20, CCL21, CXCL-14, interferons, fator de necrose tumoral (TNF), e fatores que agem na imunidade inata e angiogênese (por exemplo, PAI-1, que corresponde ao inibidor do ativador de plasminogênio). Em uma modalidade particular, o vetor recombinante de acordo com a invenção compreende o gene de interesse que codifica IL-2.

[0143] A presente invenção também diz respeito a uma célula compreendendo a sequência de ácidos nucleicos de acordo com a invenção. Em uma modalidade preferida, a célula he de acordo com a invenção é célula eucariótica e, mais preferivelmente, uma célula de mamífero. Células de mamífero disponíveis como hospedeiras para expressão são bem conhecidas na técnica e incluem muitas linhagens celulares imortalizadas, tais como, mas sem limitação, células de ovário de hamster chinês (CHO), células renais de hamster bebês (BHK) e muitas outras. Células eucarióticas adicionais adequadas incluem leveduras e outros fungos.

[0144] A presente invenção também diz respeito a um processo para produzir um anticorpo de acordo com a invenção, compreendendo cultivar a célula de acordo com a invenção em condições que

permitem a expressão do anticorpo e que purificam o anticorpo da célula ou meio que circunda a célula.

[0145] Em uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito a uma composição farmacêutica compreendendo qualquer um dos anticorpos, a sequência de ácidos nucleicos ou o vetor de acordo com a invenção e um carreador farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica compreende adicionalmente um composto de interesse.

[0146] O carreador farmaceuticamente aceitável é preferivelmente isotônico, hipotônico ou fracamente hipertônico e apresenta uma concentração iônica relativamente baixa, tal como, por exemplo, uma solução de sacarose. Além do mais, um carreador como este pode conter qualquer solvente, ou líquido aquoso ou parcialmente aquoso, tal como água estéril não pirogênica. O pH da composição farmacêutica é, além do mais, ajustado e tamponado de maneira a atender as exigências de uso *in vivo*. A composição farmacêutica também pode incluir um diluente, adjuvante ou excipiente farmaceuticamente aceitável, bem como agentes de solubilização, estabilização e conservação. Para administração injetável, uma formulação em solução aquosa, não aquosa ou isotônica é preferida. Pode ser fornecida em uma dose única ou em uma multidose, na forma líquida ou seca (pó, liofilizado e similares) que pode ser reconstituída no momento de uso com um diluente apropriado.

[0147] A presente invenção também diz respeito a um kit de partes que compreende (i) uma composição farmacêutica, um anticorpo, uma sequência de ácidos nucleicos ou um vetor de acordo com a invenção e, (ii) um composto de interesse.

[0148] Da maneira aqui usada, o termo "composto de interesse" diz respeito a um composto terapêutico e, preferivelmente, a um agente terapêutico contra câncer ou um composto usado no tratamento da

diminuição de massa óssea.

[0149] De acordo com uma modalidade preferida, o agente terapêutico contra câncer é escolhido do grupo compreendendo abraxane (Formulação de nanopartícula estabilizada por paclitaxel albumina), adriamicina (cloridrato de doxorubicina), adrucil (fluorouracil), aldara (imiquimod), alemtuzumab, alimta (pemetrexede dissódico), ácido aminolevulínico, anastrozol, aprepitante, arimidex (anastrozol), aromasina (exemestano), arranon (nelarabina), trióxido arsênico, avastina (Bevacizumab), azacitidina, bevacizumab, bexarotene, bortezomib, campath (alemtuzumab), camptosar (cloridrato de irinotecan), capecitabina, carboplatina, cetuximab, cisplatina, clafen (ciclofosfamida), clofarabina, clofarex (clofarabina), clolar (clofarabina), ciclofosfamida, citarabina, citosar-U (citarabina), citoxan (ciclofosfamida), dacogen (decitabina), dasatinib, decitabina, depoCit (citarabina lipossomal), DepoFoam (citarabina lipossomal), cloridrato de dexrazoxano, docetaxel, doxil (cloridrato de doxorubicina lipossômica), cloridrato de doxorubicina, cloridrato de doxorubicina lipossômica, dox-SL (cloridrato de doxorubicina lipossômica), efudex (fluorouracil), ellence (cloridrato de epirubicina), eloxatin (oxaliplatina), emend (aprepitante), cloridrato de epirubicina, erbitux (cetuximab), cloridrato de erlotinib, evacet (cloridrato de doxorubicina lipossômica), evista (cloridrato de raloxifeno), exemestano, faslodex (fulvestrant), femara (letrozol), fluoroplex (fluorouracil), fluorouracil, fulvestrante, gefitinib, cloridrato de gencitabina, gemtuzumab ozogamicina, gemzar (cloridrato de gencitabina), gleevec (mesilato de Imatinib), herceptina (Trastuzumab), hicamtin (cloridrato de topotecano), mesilato de imatinib, imiquimod, iressa (gefitinib), cloridrato de irinotecano, ixabepilona, ixempra (ixabepilona), ceoxifeno (cloridrato de raloxifeno), cepivance (palifermina), ditosilato de lapatinib, lenalidomida, letrozol, levulan (ácido aminolevulínico), lipoDox (cloridrato de doxorubicina lipossômica),

citarabina lipossomal, metazolastona (temozolomida), metotrexato, milosar (azacitidina), milotarg (gemtuzumab ozogamicina), manopartícula de paclitaxel (formulação de nanopartícula estabilizada por paclitaxel albumina), nelarabinae, neosar (ciclofosfamida), nexavar (tosilato de sorafenib), nilotinib, nolvadex (citrato de tamoxifeno), oncaspar (pegaspargase), oxaliplatina, paclitaxel, formulação de nanopartícula estabilizada por paclitaxel albumina, palifermina, panitumumab, paraplat (carboplatina), paraplantina (carboplatina), pegaspargase, pemetrexede dissódico, platinol-AQ (cisplatina), platinol (cisplatina), cloridrato de raloxifeno, revlimid (lenalidomida), rituxan (rituximab), rituximab, Sclerosol Intrapleural Aerosol (talco), tosilato de sorafenibe, espricel (Dasatinib), pó de talco estéril (talco), esteritalco (talco), malato de sunitinibe, sutent (malato de sunitinibe), sinovir (talidomida), talco, citrato de tamoxifeno, tarabina PFS (citarabina), tarceva (cloridrato de erlotinibe), targretina (bexaroteno), tassigna (nilotinibe), taxol (paclitaxel), taxotere (docetaxel), temodar (temozolomida), temozolomida, tensirolimus, talomida (talidomida), talidomida, totect (cloridrato de dexrazoxano), cloridrato de topotecan, torisel (tensirolimus), trastuzumab, trisenox (troóxido arsênico), tykerb (ditosilato de lapatinibe), vectibix (panitumumab), velcade (bortezomib), vidaza (azacitidina), vorinostate, xeloda (capecitabina), zinecarde (cloridrato de dexrazoxana), ácido zoledrônica, zolinza (vorinostate) e zometa (ácido zoledrônico). De acordo com uma modalidade preferida da invenção, o composto usado no tratamento de diminuição de massa óssea é um bifosfonato, moduladores de receptor de estrogênio seletivo (SERMs), um hormônio paratireóide (PTH) (por exemplo, teriparatide (Forteo)), ranelato de estrôncio, Denosumab ou calcitonina, ou uma combinação destes. De acordo com uma modalidade mais preferida, o bifosfonato é escolhido do grupo compreendendo alendronato (fosamax, fosamax mais D), etidronato (didronel), ibandronato (boniva), pamidronato (aredia), risedronato (actonel, actonel W/cálcio), tiludronato (Skelid), e ácido

zoledrônico (reclast, zometa). De acordo com uma modalidade mais preferida, os SERMs são escolhidos do grupo compreendendo raloxifeno (evista), bazedoxifeno/premarina (Aprelal) e tamoxifen.

[0150] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito ao uso do anticorpo, à sequência de ácidos nucleicos, ao vetor, à composição farmacêutica ou ao kit de partes de acordo com a invenção, para o tratamento de doenças associadas a uma maior atividade de osteoclasto. Tal doença compreende, mas sem limitação, endocrinopatias (hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatireoidismo primário ou secundário, hipertireoidismo), hipercalcemia, estados de deficiência (raquitismo/osteomalácia, escorbuto, desnutrição), doenças crônicas (síndromes de mal absorção, insuficiência renal crônica (osteodistrofia renal), doença hepática crônica (osteodistrofia hepática), por medicamento medicamentos (glicocorticóides (osteoporose induzida por glicocorticóide), terapia de privação androgênica, terapia inibidora de aromatase, heparina, álcool), e doenças hereditárias (osteogenese imperfeita, homocistinúria), osteoporose, osteopetrose, inflamação óssea associada a artrite e artrite reumatóide, doença periodontal, displasia fibrosa e/ou doença de Paget.

[0151] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito ao uso do anticorpo, à sequência de ácidos nucleicos, ao vetor, à composição farmacêutica ou ao kit de partes de acordo com a invenção, para o tratamento de doenças associadas à inflamação e/ou autoimunidade. Tais doenças compreendem, mas sem limitação, espondiloartropatia soronegativa (artrite psoriática, espondilite anquilosante, síndrome de Reiter, espondiloartropatia associada à doença intestinal inflamatória), perda de parafusos protéticos, doenças do tecido conectivo (artrite reumatóide juvenil, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e nefrite lúpica, escleroderma, síndrome de Sjogren, doença do tecido conectivo misto, polimiosite, dermatomiosite), doença intestinal inflamatória

(por exemplo, doença de Crohn; colite ulcerativa), doença de Whipple, artrite associada a ileocolite granulomatosa, condições inflamatórias da pele (penfigóide bolhoso autoimune, pênfigo vulgar autoimune, eczema, dermatite), doença pulmonar inflamatória (alveolite, fibrose pulmonar, sarcoidose, asma, bronquite, bronquiolite obliterante), doença renal inflamatória (glomerulonefrite, rejeição a aloenxerto renal, inflamação tubular renal), aterosclerose, vasculite sistêmica (arterite temporal/arterite de célula gigante, arterite de Takayasu, poliarterite nodosa, doença de Kawasaki, granulomatose de Wegener, síndrome de Churg-Strauss, poliangiite microscópica, glomerulonefrite necrotizante, púrpura de Henoch-Schonlein, vasculite crioglobulinêmica essencial e outras vasculites de pequenos vasos, doença de Behcet), doenças de ativação de macrófago (síndrome de ativação de macrófago (MAS), doença de Still do adulto, síndrome hemofagocítica), polimialgia reumática, esclerose biliar primária, colangite esclerosante, hepatite autoimune, Diabetes Mellitus tipo 1, tiroidite de Hashimoto, doença de Graves, esclerose múltipla (MS), síndrome de Guillain-Barre, doença de Addison, e/ou fenômeno de Raynaud, síndrome de Goodpasture.

[0152] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito ao uso do anticorpo, à sequência de ácidos nucleicos, ao vetor, à composição farmacêutica ou ao kit de partes de acordo com a invenção, para o tratamento de câncer.

[0153] Da maneira aqui usada, a palavra "câncer" refere-se, mas sem limitação, à adenocarcinoma, adenocarcinoma de célula acínica, carcinomas adrenocorticais, carcinoma de célula alveolar, carcinoma anaplásico, carcinoma basalóide, carcinoma de célula basal, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogênico, carcinoma renaladino, carcinoma embrionário, carcinoma endometrióide, carcinoma fibrolamolar de célula hepática, carcinomas folicular, carcinomas de células gigantes, carcinoma hepatocelular, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma

leptomeníngea, carcinoma medular, carcinoma melanótico, carcinoma menigial, carcinoma mesometonéfrica, carcinoma linfóide, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de glândula sudorípara, carcinoma de célula transicional, carcinoma de célula tubular, sarcoma ameloblástico, sarcoma angiolítico, sarcoma botrióide, sarcoma estromal endometrial, sarcoma de Ewing, sarcoma fascicular, sarcoma de célula gigante, sarcoma granulocítico, sarcoma imunoblástico, sarcoma juxta cordial osteogênico, sarcoma de tipo árvore, sarcoma leucocítico (leucemia), sarcoma linfático (linfosarcoma), sarcoma medular, sarcoma mielóide (sarcoma granulocítico), sarcoma osteogênico, sarcoma periosteal, sarcoma de célula reticular (linfoma histiocítico), sarcoma de célula redonda, sarcoma de célula em fuso, sarcoma sinovial, sarcoma telangiectático audiotogênico, linfoma de Burkitt, NPDL, NML, NH e linfomas difusos. De acordo com uma modalidade preferida, o método de acordo com a invenção é direcionado ao tratamento de câncer metastático no osso, em que o câncer metastático é de mama, pumão, renal, mieloma múltiplo, tireóide, próstata, adenocarcinoma, malignidades de célula sanguínea, incluindo leucemia e linfoma; cânceres de cabeça e pescoço; cânceres gastrointestinais, incluindo câncer esofágico, câncer de estômago, câncer de cólon, câncer intestinal, câncer cólon-retal, câncer retal, câncer pancreático, câncer hepático, câncer do duto biliar ou da vesícula biliar; malignidades do trato genital feminino, incluindo carcinoma do ovário, cânceres endometriais uterinos, câncer vaginal e câncer cervical; câncer de bexiga; câncer no cérebro, incluindo neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; e câncer de pele, incluindo melanoma maligno ou câncer de célula escamosa.

[0154] A presente invenção diz respeito adicionalmente a um método para melhorar o tratamento de um paciente com câncer que é submetido a tratamento quimioterapêutico com um agente terapêutico contra câncer, que compreende co-tratamento do dito paciente junto com um método da maneira revelada anteriormente.

[0155] A presente invenção diz respeito adicionalmente a um método de melhorar eficácia citotóxica de medicamentos citotóxicos ou radioterapia, que compreende co-tratar um paciente que necessita de tal tratamento junto com um método da maneira revelada anteriormente.

[0156] A presente invenção diz respeito adicionalmente a um método para melhorar o tratamento de um paciente com uma doença associada a uma maior atividade de osteoclasto que é submetido ao tratamento com um bifosfonato, moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs), um hormônio da paratireóide (PTH) (por exemplo, teriparatide (Forteo)), ranelato de estrôncio, denosumab ou calcitonina, ou uma combinação destes, que compreende co-tratamento do dito paciente junto com um método da maneira revelada anteriormente.

[0157] Em uma outra modalidade, o uso de um anticorpo da invenção é contemplado na fabricação de um medicamento para prevenir ou tratar câncer metastático no osso, em um paciente que sofre de câncer metastático. Em uma modalidade relacionada, o câncer metastático é câncer de mama, pulmão, renal, mieloma múltiplo, tireóide, próstata, adenocarcinoma, malignidades de célula sanguínea, incluindo leucemia ou linfoma; cânceres de cabeça e pescoço; cânceres gastrointestinais, incluindo câncer de esôfago, câncer de estômago, câncer de cólon, câncer intestinal, câncer cólon-retal, câncer retal, câncer pâncreático, câncer hepático, câncer do duto biliar ou da vesícula biliar; malignidades do trato genital feminino, incluindo carcinoma de ovário, cânceres endometriais uterinos, câncer vaginal, ou câncer cervical; câncer de bexiga; câncer no cérebro, incluindo neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; ou câncer de pele, incluindo melanoma maligno ou câncer de célula escamosa.

[0158] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito ao uso do anticorpo, à sequência de ácidos nucleicos, ao vetor, à composição farmacêutica ou ao kit de partes de acordo com a

invenção, na fabricação de um medicamento.

[0159] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito ao uso do anticorpo, à sequência de ácidos nucleicos, ao vetor, à composição farmacêutica ou ao kit de partes de acordo com a invenção, na fabricação de um medicamento para tratar um paciente com câncer.

[0160] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito ao uso do anticorpo, à sequência de ácidos nucleicos, ao vetor, à composição farmacêutica ou ao kit de partes de acordo com a invenção, na fabricação de um medicamento para tratar um paciente com uma doença associada à maior atividade de osteoclasto.

[0161] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito ao uso do anticorpo, à sequência de ácidos nucleicos, ao vetor, à composição farmacêutica ou ao kit de partes de acordo com a invenção, na fabricação de um medicamento para tratar um paciente com uma doença inflamatória, mais especificamente uma doença intestinal inflamatória.

[0162] De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção diz respeito ao uso do anticorpo, à sequência de ácidos nucleicos, ao vetor, à composição farmacêutica ou ao kit de partes de acordo com a invenção, na fabricação de um medicamento para tratar um paciente que sofre de artrite reumatóide.

[0163] A administração do anticorpo, da sequência de ácidos nucleicos, do vetor, da composição farmacêutica ou do kit de partes de acordo com a invenção, pode ser realizada por qualquer meio conhecido pelos versados na técnica. As vias de administração preferidas incluem, mas sem limitação, intradérmica, subcutânea, oral, parenteral, intramuscular, intranasal, sublingual, intratraqueal, inalação, ocular, vaginal e retal. De acordo com uma modalidade preferida, o anticorpo, a sequência de ácidos

nucleicos, o vetor, a composição farmacêutica ou o kit de partes de acordo com a invenção, são distribuídos sistemicamente.

[0164] A administração pode ocorrer em uma dose única ou uma dose repetida uma ou várias vezes após um certo intervalo de tempo. Desejavelmente, o anticorpo, a sequência de ácidos nucleicos, o vetor, a composição farmacêutica ou o kit de partes de acordo com a invenção, são administrados 1 a 10 vezes em intervalos semanais.

[0165] Para orientação geral, a dosagem adequada para o anticorpo é cerca de 2mg/kg a 30mg/kg, 0,1 mg/kg a 30 mg/kg ou 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. A dosagem adequada para o vetor de acordo com a invenção varia de cerca de 10^4 a 10^{10} pfu (unidades formadoras de placa), desejavelmente de cerca de 10^5 e 10^8 pfu para vetor de MVA, contanto que varie de cerca de 10^5 a 10^{13} iu (unidades infecciosas), desejavelmente de cerca de 10^7 e 10^{12} iu para vetor a base de adenovírus. Uma composição que baseia-se nos plasmídeos vetores pode ser administrada em doses entre 10 µg e 20 mg, vantajosamente entre 100 µg e 2 mg.

[0166] Quando o uso ou o método de acordo com a invenção é para o tratamento de câncer, o método ou uso da invenção pode ser realizado junto com uma ou mais modalidades terapêuticas convencionais (por exemplo, radiação, quimioterapia e/ou cirurgia). O uso de abordagens terapêuticas múltiplas fornece o paciente com uma intervenção de base mais ampla. Em uma modalidade, o método da invenção pode ser precedido ou seguido por uma intervenção cirúrgica. Em uma outra modalidade, pode ser precedido ou seguido por radioterapia (por exemplo, radiação gama). Os versados na técnica podem formular facilmente protocolos e parâmetros de terapia de radiação apropriada que podem ser usados (ver, por exemplo, PEREZ. Principles and practice of radiation oncology. 2ª edição. LIPPINCOTT, 1992)

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E DESENHOS

[0167] A figura 1 representa a coloração específica de células NIH/3T3 transfectadas com CSF-1R por Abm CXIIG6.

[0168] A figura 2 mostra a inibição de ligação de CSF-1 na superfície celular CSF-1R na presença de Abm CXIIG6.

[0169] A figura 3 mostra o bloqueio específico de CSF-1R humano solúvel por Abm CXIIG6 (“ctrl” significa controle; “neg SN” significa sobrenadante de hibridoma de controle negativo).

[0170] A figura 4 mostra a inibição de diferenciação e secreção de osteoclasto humano de matriz-metaloprotease-9 (MMP-9) na presença de Abm CXIIG6 (“Ctrl” significa controle; “CXIIG6 SN” significa sobrenadante do hibridoma CXIIG6; “neg SN” significa sobrenadante de hibridoma de controle negativo).

[0171] A figura 5 mostra a reatividade não cruzada de Abm CXI IG6 com outros receptores de tirosina quinase com homologia à CSF-1R (“SN” significa sobrenadante do hidridoma).

[0172] A figura 6 mostra a sequência de ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 1) e sequência de aminoácidos deduzidos (SEQ ID NO: 2) da cadeia pesada CXIIG6. As sequências oligoiniciadoras incluindo sítios de restrição para clonagem adicionadas às sequências de nucleotídeos são sublinhadas. Os sítios de restrição são mostrados em *itálico* e sublinhados. As sequências de aminoácidos do domínio V são destacadas em **negrito**.

[0173] A figura 7 mostra a sequência de ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 3) e sequência de aminoácidos deduzidos (SEQ ID NO: 4) da cadeia leve CXIIG6. As sequências oligoiniciadoras incluindo sítios de restrição para clonagem adicionadas às sequências de nucleotídeos são sublinhadas. Os sítios de restrição são mostrados em *itálico* e sublinhados. As sequências de aminoácidos dos domínios V são destacadas em **negrito**.

[0174] A figura 8 mostra o constructo de plasmídeo pTG17753.

[0175] A figura 9 mostra o constructo de plasmídeo pTG17727.

[0176] A figura 10 mostra o constructo de plasmídeo pOptiVEC™.

[0177] A figura 11 mostra o constructo de plasmídeo pTG17895.

[0178] A figura 12 mostra o constructo de plasmídeo pTG17812.

[0179] A figura 13 mostra o constructo de plasmídeo pTG17868.

[0180] A figura 14 mostra o constructo de plasmídeo pTG17869.

[0181] A figura 15 mostra variantes de cadeia leve de CXIIIG6 humanizados.

[0182] A figura 16 mostra variantes de cadeia pesada de CXIIIG6 IgG1 humanizados.

[0183] A figura 17 mostra o bloqueio específico de CSF-1R humano solúvel por CXIIIG6 murino recombinante e CXIIIG6 IgGL quimérico.

[0184] A figura 18 mostra a inibição de diferenciação e secreção de osteoclasto humano de matriz-metaloprotease-9 (MMP-9) na presença de CXIIIG6 murino recombinante e CXIIIG6 IgGL quimérico.

MODO(S) PARA REALIZAR A INVENÇÃO

[0185] *Coloração específica de células NIH/3T3 transfectadas com CSF-1R por Abm CXIIIG6*

[0186] A linhagem celular B4-800-5 foi gerada por transfecção estável de células NIH/3T3 com um plasmídeo de expressão que codifica o CSF-1R humano de comprimento total. A expressão de CSF-1R de superfície celular em células B4-800-5 foi verificada por imunocoloração

indireta com o Abms 61701 CSF-1R anti-humano (IgG1 de camundongo, R&D Systems) ou 2-4A5-4 (IgG_{1,K}, GeneTex), comparada aos isotipos controles (Figura 1, painéis superiores e médios). Os sobrenadantes da cultura de hibridoma CXI I G6 ou de um hibridoma de controle negativo foram usados para imunocoloração de células B4-800-5 ou células NIH/3T3 parentais (Figura 1, painéis inferiores).

[0187] A análise de citometria de fluxo mostrou que os sobrenadantes da cultura de hibridoma CXIIG6 coraram seletivamente células B4-800-5 o que demonstra a especificidade de Abm para CSF-1R de superfície celular.

[0188] *Inibição de ligação de CSF-1 à CSF-1R de superfície celular*

[0189] 3×10^5 células THP-1 (linhagem celular de leucemia monocítica positiva para CSF-1R humana) foram incubadas por 30 minutos a 4 °C na presença de ambos os sobrenadantes de cultura de hibridoma, soro de um camundongo inalterado ou um imunizado com anti-CSF-1R (diluição 1:1.000), Abm anti-CSF-1R 2-4A5-4 (GeneTex) ou uma IgG1 de rato controle (10 µg/mL) ou sem reagente. Após duas lavagens com PBS frio, as células foram incubadas com 1 µg/mL de CSF-1 humana biotilado recombinante por 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes e incubadas adicionalmente por 30 minutos a 4 °C com 10 µg/mL de estreptavidina-Alexa Flúor 488 (Invitrogen). Após a lavagem com PBS e fixação com 4 % de paraformaldeído, a coloração da célula foi analisada por citometria de fluxo.

[0190] Menores intensidades de fluorescência comparadas às amostras controle refletem a inibição de ligação de CSF-1 à CSF-1R de superfície celular. O soro de um camundongo imunizado com CSF-1R bloqueia a ligação de CSF-1 às células THP-1 (Figura 2). Embora o sobrenadante de hibridoma de controle negativo ou um Abm irrelevante não

mostre nenhum efeito, o sobrenadante da cultura do hibridoma CXI IG6 inibe a ligação de CSF-1 às células THP-1 (Figura 2, painel inferior à direita), assim como Abm 2-4A5-4 (painel inferior à esquerda).

[0191] *Localização de sítio de ligação Abm CXIIG6.*

[0192] Para identificar o sítio de ligação de Abm CXI IG6 no CSF-1R, um Western blot foi realizado usando forma solúveis do CSF-1R humano compreendendo tanto os cinco domínios extracelulares do tipo imunoglobulina (Met 1 a Glu 512, R&D Systems) quanto apenas os três domínios do tipo imunoglobulina N-terminal da região extracelular de CSF-1R (Met 1 a Ser 290), ambos fundidos em suas extremidades de terminação C na região Fc de uma IgG1 humana. Uma forma solúvel do EGFR fundido à Fc de IgG1 humana (R&D Systems) foi usada como um controle negativo.

[0193] Cem nanogramas de cada receptor solúvel foram submetidos à eletroforese em condições nativas antes da transferência para folha de nitrocelulose e sondados com ambos os sobrenadantes de hibridoma, pAb *c-fms*/CSF-1R H300 de coelho (Santa Cruz Biotechnology), Abm 61701 de camundongo (R&D Systems) ou soro de camundongos inalterados ou imunizados com CSF-1R.

[0194] Ambas as formas solúveis do CSF-1R foram detectadas como bandas amplas quando sondadas com pAb *c-fms*/CSF-1R H300, Abm 61701 ou soro do camundongo imunizado. Nenhum dos sinais detectáveis foram observados no soro de camundongo inalterado ou um sobrenadante de hibridoma de controle negativo. O sobrenadante do hibridoma CXI IG6 reconheceu CSF-1R₁₋₂₉₀:Fc, bem como CSF-1R₁₋₅₁₂:Fc, mas não reconheceu EGFR:Fc, o que indica que CXIIG6 se liga especificamente a um epítipo que está nos três domínios N-terminais do tipo imunoglobulina (entre resíduos 1 a 290) do CSF-1R humano.

[0195] *Bloqueio específico de CSF-1R humano solúvel por CXIIG6 Abm*

[0196] A linhagem celular M-NFS-60 de leucemia mielóide de murino dependente de CSF-1 (# CRL-1838, ATCC) foi usada para avaliar a atividade bloqueadora do sobrenadante do hibridoma CXIIG6 em CSF-1R humano e murino. Cinco nanogramas de CSF-1R humano solúvel (CSF-1R₁₋₅₁₂:Fc da R&D Systems) foram pré-incubados em microplacas de 96 poços brancas com diluições seriadas tanto de sobrenadantes de hibridoma, Abm 61701 (R&D Systems) quanto de Abm murino isotipo controle. Células 10E4 M-NFS-60 cultivadas por toda a noite na ausência de CSF-1 foram então adicionadas nos poços da cultura junto com 0,1 ng de CSF-1 humana em um volume de ensaio final de 100 µL. As culturas foram incubadas por 48 horas a 37 °C e a proliferação foi quantificada por incorporação de BrdU usando um ELISA de proliferação celular (Roche).

[0197] CSF-1R humano solúvel inibiu completamente a proliferação de células M-NFS-60 mediada por CSF-1 humana, da maneira mostrada na presença de sobrenadante de hibridoma negativo que contém ou não um IgG1 controle negativo (Figura 3; média +/-SEM de 3 poços). Ao contrário, sobrenadante de hibridoma CXIIG6 e Abm 61701 controle positivo foram ambos capazes de restaurar a proliferação celular de uma maneira dose-dependente, mostrando que foram capazes de neutralizar CSF-1R humano solúvel.

[0198] Neste ensaio, a proliferação de célula M-NFS-60 ativa na presença de diluições baixas de sobrenadante do hibridoma CXIIG6 mostrou que Abm CXIIG6 foi capaz de bloquear o CSF-1R murino expresso por células M-NFS-60. Além do mais, em um ensaio de proliferação de MNFS-60 auxiliado por CSF-1 murino realizado na ausência de CSF-1R solúvel, o tratamento com CSF-1R anti-camundongo Abm AFS98 (eBioscience) resultou em uma grande diminuição dependente da concentração do crescimento celular (dados não mostrados). O sobrenadante do hibridoma CXIIG6, como anticorpos controle negativo e sobrenadante de

hibridoma negativa, não causou nenhuma redução na proliferação celular. Estes resultados demonstram que Abm CXIIG6 alveja especificamente CSF-1R humano.

[0199] *Inibição de diferenciação e secreção de osteoclasto humano de matriz-metaloprotease-9 (MMP-9)*

[0200] Os osteoclastos foram gerados a partir de monócitos humanos obtidos por elutrição de PBMCs de um doador de sangue saudável. Resumindo, os monócitos foram semeados em 2 x células 10E4 por poço em placas de 96 poços e tratados por 45 minutos ambos com sobrenadante de cultura de hibridoma, Abms CSF-1R 61701 anti-humano (R&D Systems) ou 2-4A5-4 (GeneTex), Abm CSF-1 26730 anti-humano (R&D Systems), controles isotipo murino ou de rato, ou soros de camundongos inalterados e imunizados com CSF-1R diluídos em meio de cultura de hibridoma. O meio a-MEM completo foi adicionado aos poços da cultura com ou sem CSF-1 humano e RANKL (PeproTech, 25 e 40 ng/mL respectivamente). Os sobrenadantes de hibridoma, Abms ou/e meio com ou sem citocinas foram reabastecidos a cada 3 dias por 9 dias. Os sobrenadantes da cultura condicionada foram colhidos no dia 9 e ensaiados para MMP-9 humano total usando um ensaio de ELISA (R&D Systems). A formação do osteoclasto foi avaliada corando com fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP) usando o kit de fosfatase ácida de leucócito da Sigma-Aldrich.

[0201] CSF-1 + RANKL induziram monócitos a diferenciar em osteoclastos, definidos como células positivas para TRAP multinucleadas grandes, contanto que nenhum osteoclasto positivo para TRAP fossem obtidos na ausência de citocinas. A adição de 0,5 µg/mL de anti-CSF-1 Abm 26730 anulou completamente a diferenciação de osteoclasto, da maneira mostrada pela falta de secreção de MMP-9. Anti-CSF-1R Abms 61701 ou 2-4A5-4 na mesma concentração e soro de camundongo imunizado (diluição 1:1.000) inibiram a formação de osteoclasto apenas parcialmente

(Figura 4; com (+) ou sem (-) citocinas; média +/-SEM de 3 poços; *: média de 2 poços). O tratamento com sobrenadante de cultura de hibridoma de CXIIG6 diluído 1:20 ou 1:100 reduziu significativamente o nível da produção de MMP-9, comparada a dois sobrenadantes de hibridoma de controle negativos (A, B). Estes resultados demonstram que Abm CXIIG6 inibe a diferenciação de osteoclastos de monócitos humanos bloqueando a função de CSF-1R de superfície celular.

[0202] *Inibição da fosforilação dependente de CSF-1 de CSF-1R*

[0203] A linhagem celular B4-800-5 obtida por transfecção estável de células NIH/3T3 com um plasmídeo que expressa CSF-1R humano foi usada para investigar o efeito do sobrenadante de hibridoma de CXHG6 na fosforilação de CSF-1R dependente de CSF-1. As células foram semeadas em 2×10^5 células por placa de Petri de 60 mm e cultivadas por 48 a 72 horas. Após privação de soro por 1 hora a 37 °C, as células foram tratadas por 1 hora a 37 °C com meio de cultura que contém tanto sobrenadante de hibridoma CXIIG6, Abm 2-4A5-4 (NeoMarkers) quanto Abms isotipo controle (diluído em sobrenadante de hibridoma negativo), e a seguir estimuladas com 100 ng/mL de hCSF-1 ou não estimuladas por 5 minutos a 37 °C. As camadas de células foram então lisadas e as proteínas totais foram extraídas. Dez µg de proteína foram analisadas sondando por Western blots tanto com o pAb *c-fms*/CSF-1R H300 de coelho quanto com o pAb p-*c-fms*/CSF-1R de coelho (Tyr708)-R (Santa Cruz Biotechnology), seguido por imunoglobulinas^{HRP} anti-coelho de cabra.

[0204] Na ausência de CSF-1, nem o sobrenadante de hibridoma de CXIIG6 nem o Abm 2-4A5-4 induziram a fosforilação de receptor, da maneira observada com o anticorpo específico para CSF-1R fosforilado na posição 708, mostrando que Abm CXIIG6 sozinho não exerce um efeito agonista. Mediante estimulação com CSF-1, a quantidade de CSF-

1R diminuiu em isotipo as células tratadas com controle comparado com células não estimuladas, e CSF-1R foi fosforilado em Tyr708 (dados não mostrados). O pré-tratamento com sobrenadante de hibridoma de CXIIG6 ou com Abm 2-4A5-4 não melhoram o desaparecimento de CSF-1R. A fosforilação de CSF-1R diminuiu após tratamento com sobrenadante de hibridoma de CXIIG6 ou com Abm 2-4A5-4. Estes resultados mostram que Abm CXIIG6 é capaz de bloquear a fosforilação de CSF-1R dependente de CSF-1.

[0205] *Reatividade cruzada de Abm CXIIG6*

[0206] A reatividade cruzada de Abm CXI IG6 foi testada por ELISA em uma série de receptores solúveis purificados que pertencem à subfamília tipo III dos receptores de tirosina quinase e que mostram homologia com CSF-1R em seus domínios extracelulares do tipo Ig: VEGFR-1, VEGFR-2, Flt-3 e PDGFR β solúveis (todos os quatro expressos como proteínas de fusão Fc), bem como PDGFR α e SCFR (kit-c) foram obtidos da R&D Systems e usados para revestir uma placa de ELISA. EGFR solúvel (R&D Systems), da subfamília EGFR dos receptores de tirosina quinase, foi usado como um controle negativo.

[0207] Os sobrenadantes da cultura tanto de hibridoma CXIIG6 (CXIIG6 SN) ou um hibridoma de controle negativo, quanto do anti-CSF-1R IgG1 61701 de camundongo (R&D Systems) foram incubados na placa de ELISA revestida em concentração de anticorpo de 500 ng/mL. Após lavagem da placa de ELISA, os anticorpos ligados foram revelados usando anti-canmundo Ig de cabra conjugado com peroxidase (Sigma) e a OD_(450 - 540 nm) foi medida. Os resultados representados na figura 5 mostram que assim como Abm 61701, CXIIG6 se liga fortemente à CSF-1R, embora nenhum sinal específico fosse detectado em qualquer outro receptor de tirosina quinase. Isto mostra que, entre os vários receptores de tirosina quinase tipo III testados, CXI IG6 é específico para CSF-1R.

[0208] *Construção de vetores de expressão a partir de Abm CXIIG6*

[0209] O kit expresso de anticorpo OptiCHO™ (Invitrogen, Catálogo No.12762-019) foi usado para a clonagem dos genes que codificam as cadeias pesadas e leves de CXI IG6 a fim de produzir o Abm CXIIG6 na linhagem celular de mamífero DG44. O kit expresso de anticorpo OptiCHO™ inclui: (1) O vetor pOptiVEC™, um plasmídeo bicistrônico que permite a clonagem do gene de interesse à jusante do promotor CMV. A transcrição do gene de interesse é separada do marcador de seleção auxotrófico diidrofolato redutase (DHFR) por um sítio de entrada de ribossomo interno (IRES), permitindo a transcrição do gene de interesse e do marcador de seleção no mesmo RNAm; (2) O vetor pcDNA™3.3 que permite a clonagem do gene de interesse à jusante do promotor CMV. O pcDNA™3.3 contém um gene de resistência à neomicina permitindo a seleção usando Geneticin®. Os vetores pOptiVEC™ e pcDNA™3.3 contêm a sequência TK poli-A que direciona o próprio processamento da extremidade 3' do RNAm do gene de interesse.

[0210] Os oligoiniciadores específicos (ver tabela 4) foram sintetizados e usados para a amplificação por PCR e clonagem dos genes de cadeia pesada e leve de CXIIG6 total (respectivamente SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:3; ver respectivamente figura 6 e figura 7). Os oligoiniciadores anteriores incluíram a sequência consensual de Kozak para tradução eucariótica eficiente (KOZAK M. A analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res. 1987,15(20): 8125-8148.).

Tabela 4

Oligoiniciador	Sequência
OTG18929	GCCGCCACCATGTACTTGGGACTGAACTATGTATTC (SEQ ID NO :30)

OTG18930	GGAGATCTTCATTTACCCGGAGTCCGGGA
	(SEQ ID NO :31)
OTG18931	GCCGCCACCATGAGTGTGCCCACTCAGGTCCTG
	(SEQ ID NO :32)
OTG18932	GCCCGGGCTAACACTCATTCTGTTGAAGCTC
	(SEQ ID NO :33)

[0211] A cadeia pesada de CXIIIG6 foi amplificada por PCR usando OTG18929 e OTG18930 com plasmídeo pTG17753 (Figura 8) como molde, e clonada no vetor pOptiVEC™-TOPO® (kit pOptiVEC™-TOPO® TA Cloning®, Invitrogen, Catálogo no.12744-017-01) e nos vetores pcDNA™3.3-TOPO® (kit pcDNA™3.3-TOPO® TA Cloning®, Invitrogen, Catálogo No.K8300-01) para obter respectivamente pTG17786 e pTG17789.

[0212] A cadeia leve de CXIIIG6 foi amplificada por PCR usando OTG18931 e OTG18932 com plasmídeo pTG17727 (Figura 9) como molde, e clonada no vetor pOptiVEC™-TOPO® (kit pOptiVEC™-TOPO® TA Cloning®, Invitrogen, Catálogo no.12744-017-01) e nos vetores pcDNA™3.3-TOPO® (kit pcDNA™3.3-TOPO® TA Cloning®, Invitrogen, Catálogo No.K8300-01) para obter respectivamente pTG17788 e pTG17787.

[0213] A sequência de nucleotídeos de todo o cassete de expressão, incluindo promotor CMV e sinal TK poliA de pTG17786, pTG17787, pTG17788 e pTG17789 foram sequenciadas e observadas de acordo com suas sequências teóricas.

[0214] *Geração de anticorpos quiméricos a partir de Abm CXIIIG6*

[0215] Os domínios variáveis de Abm CXI IG6 foram combinados com regiões constantes humanas.

[0216] Para gerar a cadeia leve quimérica (denominada cadeia CXIIIG6 Ig_k quimérica), uma sequência teórica foi projetada unindo a sequência que codifica o domínio VK CXI IG6 (de SEQ ID NO:3) na sequência que codifica a região IGKC humana (acesso ao GenBank número:

J00241). Este fragmento de DNA XbaI NotI mantém a mesma sequência não traduzida na extremidade 5', incluindo sequência Kozak, como aquela usada na versão de murino (como em pTG17787 e pTG17788, da maneira descrita anteriormente). A sequência de cadeia leve CXIIG6 quimérica foi otimizada por códon para expressão em CHO, montada a partir de oligonucleotídeos sintéticos, e subclonada em pOptiVEC™ (Figura 10) por meio de XbaI NotI por GeneArt AG. A sequência de ácidos nucleicos otimizada por códon de cadeia leve de CXIIG6 quimérica obtida (regiões variáveis e constantes) é da maneira apresentada em SEQ ID NO:34. O plasmídeo obtido foi denominado PTG17895 (Figura 11).

[0217] Para gerar as cadeias pesadas de IgG1 e IgG4 quiméricas (respectivamente denominadas cadeias CXIIG6 IgG1 quimérica e CXIIG6 IgG4 quimérica), as sequências teóricas foram projetadas unindo a sequência que codifica o domínio VH CXIIG6 (de SEQ ID NO:1) nas sequências que codificam tanto a região IGHG1C humana (acesso ao GenBank número: J00228) quanto a IGHG4C humana (acesso ao GenBank número: K01316). Estes fragmentos de DNA XbaI NotI mantêm a mesma sequência não traduzida na extremidade 5', incluindo a sequência Kozak, como aquela usada na versão de murino (como em pTG17786 e pTG17789, da maneira descrita anteriormente). As cadeias pesadas de CXI I G6 quimérico foram então otimizadas por códon para expressão em CHO, sintetizadas e clonadas em pTG17812 (Figura 12) por meio de XbaI NotI por GeneArt AG. As sequências de ácidos nucleicos otimizadas por códon de cadeia pesada de CXIIG6 IgG1 quimérica obtidas (regiões variáveis e constantes) são da maneira apresentada em SEQ ID NO:35 e os plasmídeos obtidos foram denominados pTG17868 (Figura 13). A sequência de ácidos nucleicos otimizada por códon de cadeia pesada de CXIIG6 IgG4 quimérica obtidas (regiões variáveis e constantes) é da maneira apresentada em SEQ ID NO:36 e os plasmídeos obtidos são denominados pTG17869 (Figura 14).

[0218] *Geração de anticorpos humanos a partir de Abm CXIIG6*

[0219] Para gerar os variantes de cadeia leve humanizados, as substituições de aminoácido de acordo com a tabela 2 foram realizadas na região variável de cadeia leve da maneira apresentada em SEQ ID NO:9.

[0220] As sequências de DNA foram projetadas unindo sequências modificadas que carregam substituições do domínio VK CXIIG6 (de SEQ ID NO:3) na sequência que codifica a região IGKC humana (acesso ao GenBank número: J00241). Este fragmento de DNA XbaI NotI mantém a mesma sequência não traduzida na extremidade 5', incluindo a sequência Kozak como aquela usada na versão de murino (como em pTG17787 e pTG17788, da maneira descrita anteriormente). As sequências de cadeia leve de CXIIG6 humanizado foram então otimizadas por códon para expressão em CHO, montadas a partir de oligonucleotídeos sintéticos e clonadas em pOptiVEC™ (Figura 10) por meio de Xba/Not/por GeneArt AG. Os variantes e plasmídeos de cadeia leve CXIIG6 humanizado obtidos estão listados na figura 15.

[0221] Para gerar os variantes de cadeia pesada humanizados, as substituições de aminoácido de acordo com a tabela 1 foram realizados na região variável de cadeia pesada da maneira apresentada em SEQ ID NO:6.

[0222] As sequências de DNA foram projetadas unindo sequências modificadas que carregam substituições do domínio VH CXIIG6 (de SEQ ID NO:1) nas sequências que codificam a região IGHG1C humana (acesso ao GenBank número: J00228). Os fragmentos de DNA XbaI ApaI mantêm a mesma sequência não traduzida na extremidade 5', incluindo a sequência Kozak da maneira usada na versão de murino (como em pTG17786 e pTG17789, da maneira descrita anteriormente). As sequências de DNA foram então otimizadas por códon para a expressão em CHO, sintetizadas e

clonadas em pTG17812 (Figura 12) por meio de XbaI Apal para o GeneArt AG. Os variantes e plasmídeos de cadeia pesada de CXIIG6 IgG1 humanizada obtidos são listados na figura 16.

[0223] *Atividades inibitórias in vitro de CXIIG6 de murino recombinante e CXIIG6 IgG1 quimérico*

[0224] Para determinar se CXIIG6 de murino recombinante purificado (da maneira previamente descrita) e seu variante IgG1 quimérico (CXIIG6 IgG1 quimérico da maneira previamente descrita) foram capazes de bloquear CSF-1R humano solúvel, estudos de resposta a dose foram realizados na proliferação de célula M-NFS-60 e modelos de diferenciação de osteoclasto (da maneira previamente descrita). IgG2a de murino policlonal purificada da Rockland (Rockland, 010-0141) e uma IgG1 quimérica produzida pelo requerente foram testadas em paralelo, como anticorpos controle. O efeito de bloqueio foi avaliado expondo células às faixas de concentração de anticorpos anti-CSF-1R ativos, como mensurado por ligação de antígeno em um ensaio biossensor de SPR. A comparação entre Abms CXIIG6 e seu respectivo Abm controle foi realizada carregando quantidades iguais de anticorpo total (ensaio de biossensor SPR de ligação de Fc fraca).

[0225] Bioensaio de M-NFS-60: No bioensaio de M-NFS-60, as células foram tratadas com 0,23 ng/mL a 0,5 µg/mL de Abms CXIIG6 ativo (CXIIG6 de murino recombinante; CXIIG6 IgG1 quimérico) ou concentrações correspondentes de Abms controle na presença de 50 ng/mL de CSF-1R humano solúvel e 1 ng/mL de CSF-1 humano por 48 horas. Os resultados representados na figura 17 mostram que o crescimento celular M-NFS-60 aumentou em resposta ao aumento das concentrações de ambos Abms CXIIG6 (CXIIG6 de murino recombinante; CXIIG6 IgG1 quimérico) demonstrando que eles antagonizaram a ligação de CSF-1R solúvel à CSF-1 (média +/-SEM de poços triplicados). CXIIG6 IgG1 quimérico foi tão efetivo quanto CXIIG6 de murino recombinante na restauração da proliferação

celular. IgG2a de murino controle e IgG1 quimérico não apresentaram nenhum efeito na neutralização de CSF-1 por CSF-1R solúvel com relação a sua respectiva faixa de concentração.

[0226] Bioensaio de osteoclasto: No bioensaio de osteoclasto, monócitos humanos elutriados foram incubados por 8 dias com 0,85 ng/mL a 0,62 µg/mL de Abms CXIIG6 ativo (IgG1 CXIIG6 de murino recombinante; IgG1 CXIIG6 quimérico) na presença de 25 ng/mL de CSF-1 (ImmunoTools) e 40 ng/mL de RANKL. O meio e todos os agentes adicionados foram reabastecidos no dia 4 e 6 e MMP-9 total foi mensurado em meios de cultura condicionados do dia 6 a 8. Os resultados representados na figura 18 mostram que em comparação com anticorpos controle, CXIIG6 de murino recombinante e seu variante quimérico (IgG1 CXIIG6 quimérico) reduziram cada qual significativamente a produção de MMP-9 que diferenciou em paralelo o osteoclasto, indicando que o retardo do crescimento ocorreu (Figura 18; média +/-SEM de poços triplicados).

[0227] Obtidos juntos, estes resultados demonstram adicionalmente que IgG1 CXIIG6 de murino e CXIIG6 quimérico recombinantes purificados inibem a superfície celular, bem como CSF-1R humano solúvel.

Referências

- WO 01/30381
- WO 03/059395
- WO 2005/068503
- EP 1488792 A
- US 2005059113
- EP 901463 B
- EP 83286 A
- EP 206920 A
- US 5747323

- WO 94/28152
- WO 97/04119
- WO 94/18992
- WO 96/17070
- SHERR. Colony-stimulating factor-1 receptor, blood. 1990, vol.75, no.1, p.1-12.
- HUME, et al. Regulation of CSF-1 receptor expression. Molecular reproduction and development. 1997, vol.46, no.1, p.46-52.
- KLUGER, et al. Macrophage colony-stimulating factor-1 receptor expression is associated with poor outcome in breast cancer by large cohort tissue microarray analysis. *Clinical Cancer research*. 2004, vol.10. no.1, P-173-7.
- SCHOLL, et al. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994, vol.86, no.2, p.120-6.
- CHAMBERS, et al. Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: a poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. *Clinical Cancer research*. 1997, vol.3, no.6, p.999-1007.
- BAÏOCCHI, et al. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and its receptor in gynecologic malignancies. *Cancer*. 1991, vol.67, no.4, p.990-6.
- KIRMA, et al. Elevated expression of the oncogene c-fms and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor-1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor-beta1 in inducing c-fms expression. *Cancer res.*. 2007, vol.67, no.5, p.1918-26.
- HEMMERLEIN, et al. Expression of acute and late-stage inflammatory antigens, c-fms, CSF-1, and human monocytic serine esterase 1, in tumor-associated macrophages of renal cell carcinomas. *Cancer*

immunology, immunotherapy. 2000, vol.49, no.9, p.485-92.

- IDE, et al. Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, vol.99, no.22, p.14404-9.

- RAMBALDI, et al. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and c-fms genes in human acute myeloblastic leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1988, vol.81, no.4, p.1030-5.

- SCHOLL, et al. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994, vol.86, no.2, p.120-6.

- TANG, et al. M-CSF (monocyte colony stimulating factor) and M-CSF receptor expression by breast tumour cells: M-CSF mediated recruitment of tumour infiltrating monocytes?. *Journal of cellular biochemistry*. 1992, vol.50, no.4, p.350-6.

- SCHOLL, et al. Circulating levels of colony-stimulating factor 1 as a prognostic indicator in 82 patients with epithelial ovarian cancer. *British journal of cancer*. 1994, vol.69, no.2, p.342-6.

- SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast Cancer research and treatment*. 1996, vol.39, no.3, p.275-83.

- DORSCH, et al. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology*. 1993, vol.23, no.1, p.186-90.

- WANG, et al. Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Journal of immunology*. 1988, vol.141, no.2, p.575-9.

- FILDERMAN, et al. Macrophage colony-stimulating factor

(CSF-1) enhances invasiveness in CSF-1 receptor-positive carcinoma cell lines. *Cancer res.*. 1992, vol.52, no.13, p.3661-6.

- DORSCH, et al. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology*. 1993, vol.23, no.1, p.186-90.

- SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast Cancer research and treatment*. 1996, vol.39, no.3, p.275-83.

- BARON, et al. Modulation of MHC class II transport and lysosome distribution by macrophage-colony stimulating factor in human dendritic cells derived from monocytes. *Journal of cell science*. 2001, vol.114, no.pt5, p.999-1010.

- CECCHINI, et al. Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. *Molecular reproduction and development*. 1997, vol.46, no.1, p.75-83.

- BRUZZANITI, et al. Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in endocrine*. 2006, vol.7, no.1-2, p.123-39.

- CICEK, et al. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics. *Cancer metastasis reviews*. 2006, vol.25, no.4, p.635-44.

- KITAURA, et al. *The journal of clinical investigation*. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. 2005, vol.115, no.12, p.3418-27.

- MARSHALL, et al. Blockade of colony stimulating factor-1 (CSF-I) leads to inhibition of DSS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2007, vol.13, no.2, p.219-24.

- JOSE, et al. Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allograft rejection. *American journal of transplantation*. 2003, vol.3, no.3, p.294-300.

- KUTZA, et al. Macrophage colony-stimulating factor antagonists inhibit replication of HIV-1 in human macrophages. *Journal of immunology*. 2000, no.164, p.4955-4960.
- SMITH, et al. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*. 1981, no.147, p.195-7.
- HARLOW. Antibodies: A Laboratory manual. 2ª edição. Cold Spring Harbor: Laboratory press, 1988.
- HAMMERLING, et al. Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas. New York: Elsevier, 1981. p.563-681.
- SMITH, et al. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*. 1981, no.147, p.195-7.
- LENNARD. Standard protocols for the construction of scFv libraries. *Methods in molecular biology*. 2002, no.178, p.59-71.
- POLJAK. Production and structure of diabodies. *Structure*. 1994, vol.2, no.12, p.1121-3.
- HUDSON, et al. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of immunological methods*. 1999, vol.231, no.1-2, p.177-89.
- KIPRIYANOV. Generation of bispecific and tandem diabodies. *Methods in molecular biology*. 2002, no.178, p.317-31.
- HOLLIGER, et al. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology*. 2005, vol.23, no.9, p.1126-36.
- HOOGENBOOM, et al. Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunology today*. 2000, vol.21, no.8, p.371-8.
- MARKS, et al. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology*. 1992, vol.10, no.7, p.779-83.

- BARBAS, et al. In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994, vol.91, no.9, p.3809-13.
- SCHIER. Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. *Gene*. 1996, vol.169, no.2, p.147-55.
- YELTON. Affinity maturation of the BR96 anti-carcinoma antibody by codon-based mutagenesis. *J. immunol.*. 1995, vol.155, no.4, p.1994-2004.
- JACKSON, et al. In vitro antibody maturation. Improvement of a high affinity, neutralizing antibody against IL-1 beta. *J. immunol.*. 1995, vol.154, no.7, p.3310-9.
- HAWKINS, et al. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *Journal of molecular biology*. 1992, vol.226, no.3, p.889-96.
- SMITH, et al. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*. 1981, no.147, p.195-7.
- BRENNAN, et al. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science*. 1985, vol.229, no.4708, p.81-3.
- SHALABY, et al. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *The Journal of experimental medicine*. 1992, vol.175, no.1, p.217-25.
- KOSTELNY, et al. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J. immunol.* 1992, vol.148, no.5, p.1547-33.
- ZAPATA, et al. Engineering linear F(ab')₂ fragments for efficient production in *Escherichia coli* and enhanced antiproliferative

activity. *Protein engineering*. 1995, vol.8, no.10, p.1057-62.

- HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996.
- HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p.118-228.
- HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p.229-285.
- FELGNER, et al. Cationic liposome mediated transfection. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 1989, vol.32, p.115-21.
- HODGSON, et al. Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction. *Nature biotechnology*. 1996, vol.14, no.3, p.339-42.
- REMY, et al. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjugate chemistry*. 1994, vol.5, no.6, p.647-54.
- LATHE, et al. Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts. *Gene*. 1987, vol.57, no.2-3, p.193-201.
- LUPTON, et al. Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Molecular and cellular biology*. 1985, vol.5, no.10, p.2533-42.
- YATES, et al. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*. 1985, vol.313, no.6005, p.812-5.
- SUMMERS, et al. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColEI encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*. 1984, vol.36, no.4, p.1097-103.
- SUTTER, et al. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*. 1992, vol.89, no.22, p.10847-51.
- MEYER, et al. Mapping of deletions in the genome of the

highly attenuated vacinia virus MVA and their influence on virulence. *The Journal of general virology*. 1991, vol.72, no.Pt5, p.1031 -8.

- SUTTER, et al. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vacinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine*. 1994, vol.12, no.11, p.1032-40.

- GRAHAM, et al. Methods in molecular biology. Edited by MURREY. *The human press inc*, 1991. p.109-128.

- ZAKHARCHUK, et al. Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome (EDS-76) adenovirus DNA. *Archives of virology*. 1993, vol.128, no.1-2, p.171-6.

- SPIBEY, et al. Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of two strains of canine adenovirus type 2. *The Journal of general virology*. 1989, vol.70, no.Pt 1, p.165-72.

- JOUVENNE₁ et al. Cloning, physical mapping and cross-hybridization of the canine adenovirus types 1 and 2 genomes. *Gene*. 1987, vol.60, no.1, p.21-8.

- MITTAL, et al. Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector. *The Journal of general virology*. 1995, vol.76, no. Pt 1, p.93-102.

- BISCHOFF, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*. 1996, vol.274, no.5286, p.373-6.

- HEISE, et al. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature Medicine*. 2000, vol.6, no.10, p.1134-9.

- FUEYO, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*. 2000, vol.19, no.1, p.2-12.

- MCIVOR. Human purine nucleoside phosphorylase and adenosine deaminase: gene transfer into cultured cells and murine hematopoietic stem cells by using recombinant amphotropic retroviruses. *Molecular and cellular biology*. 1987, vol.7, no.2, p.838-46.
- TABIN, et al. Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Molecular and cellular biology*. 1982, vol.2, no.4, p.426-36.
- TAKEBE, et al. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Molecular and cellular biology*. 1988, vol.8, no.1, p.466-72.
- CHEN, et al. Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promoter. *The Journal of clinical investigation*. 1995, vol.96, no.6, p.2775-82.
- SCHREWE, et al. Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. *Molecular and cellular biology*. 1990, vol.10, no.6, p.2738-48.
- VILE, et al. Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer res.*. 1993. vol.53, no.17, p.3860-4.
- HARRIS, et al. Gene therapy for cancer using tumour-specific prodrug activation. *Gene therapy*. 1994, vol.1, no.3, p.170-5.
- KANAI, et al. In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. *Cancer res.* 1997, vol.57, no.3, p.461-5.
- PEREZ. Principles and practice of radiation oncology. 2^a edição. LIPPINCOTT, 1992.

[0228] • KOZAK M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1987,15(20): 8125-8148.

• CHOTHIA and LESK. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (1987) *J Mol Biol.* 1987 Aug 20;196(4):901-17.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo que se liga especificamente ao CSF-1R humano, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo compreende uma região variável compreendendo as três CDRs definidas nas SEQ ID NOs: 11, 12 e 13 e uma região variável compreendendo as três CDRs definidas nas SEQ ID NOs: 14, 15 e 16.

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região variável compreende um, mais preferencialmente dois, ainda mais preferencialmente três e definitivamente preferencialmente quatro FR (s) humanos.

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região variável compreendendo as três CDRs definidas nas SEQ ID NOs: 11, 12 e 13 compreende uma sequência de aminoácidos definida na SEQ ID NO: 6.

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região variável compreendendo as três CDRs definidas nas SEQ ID NOs: 14, 15 e 16 compreende uma sequência de aminoácidos definida na SEQ ID NO: 9.

5. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável da cadeia pesada, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, e uma região variável da cadeia leve, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 9.

6. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida região variável de cadeia pesada compreende as seguintes substituições de aminoácidos K3Q, E5V, M18L e P90A.

7. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida região variável de cadeia pesada compreende as seguintes substituições de aminoácidos K3Q, E5V, M18L, K19R, S40A, E42G, M43K, R89K, P90T, I95V, T113L e L114V.

8. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida região variável da cadeia leve compreende as seguintes substituições de aminoácidos A9S, E17D, T18R, Q40P, S43A, Q45K, A55E, D56S, Q70D, S72T, K74T, N76S, S80P, S85T e G100Q.

9. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida região variável da cadeia leve compreende as seguintes substituições de aminoácidos A9S, V13A, E17D, T18R, Q40P, K74T, N76S e S80P.

10. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida região variável da cadeia leve compreende as seguintes substituições de aminoácidos A9S, V13A, E17D, T18R, Q40P, S43A, Q45K, V48L, D56S, Q70D, S72T, K74T, N76S, S80P, G84A, S85T e G100Q.

11. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo é escolhido a partir do grupo que compreende anticorpo monoclonal, anticorpo humano, Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, fragmento de anticorpo, diacorpo e Fd.

12. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo é um anticorpo monoclonal.

13. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo tem uma afinidade de ligação de pelo menos 10^9 M^{-1} .

14. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo é conjugado com um agente de radiosensibilizador, um receptor e/ou um agente citotóxico.

15. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

16. Uso do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14 ou da composição farmacêutica como definida na reivindicação 15, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratar doenças selecionadas do grupo consistindo em endocrinopatias (hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatireoidismo primário ou secundário, hipertireoidismo), hipercalcemia, estados de deficiência (raquitismo/osteomalácia, escorbuto, desnutrição), doenças crônicas (síndromes de mal absorção, insuficiência renal crônica (osteodistrofia renal), doença hepática crônica (osteodistrofia hepática), por medicamento medicamentos (glicocorticóides (osteoporose induzida por glicocorticoide), terapia de privação androgênica, terapia inibidora de aromatase, heparina, álcool), e doenças hereditárias (osteogênese imperfeita, homocistinúria), osteoporose, osteopetrose, inflamação óssea associada a artrite e artrite reumatóide, doença periodontal, displasia fibrosa e/ou doença de Paget.

17. Uso do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14 ou da composição farmacêutica como definida na reivindicação 15, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratar câncer.

18. Uso do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14 ou da composição farmacêutica como definida na reivindicação 15, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para prevenir ou tratar câncer metastático nos ossos em paciente que sofre de câncer metastático.

19. Uso do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14 ou da composição farmacêutica como definida na reivindicação 15, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratar um paciente com uma doença inflamatória intestinal.

20. Uso do anticorpo como definido em qualquer uma das

reivindicações 1 a 14 ou da composição farmacêutica como definida na reivindicação 15, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratar um paciente que sofre de artrite reumatóide.

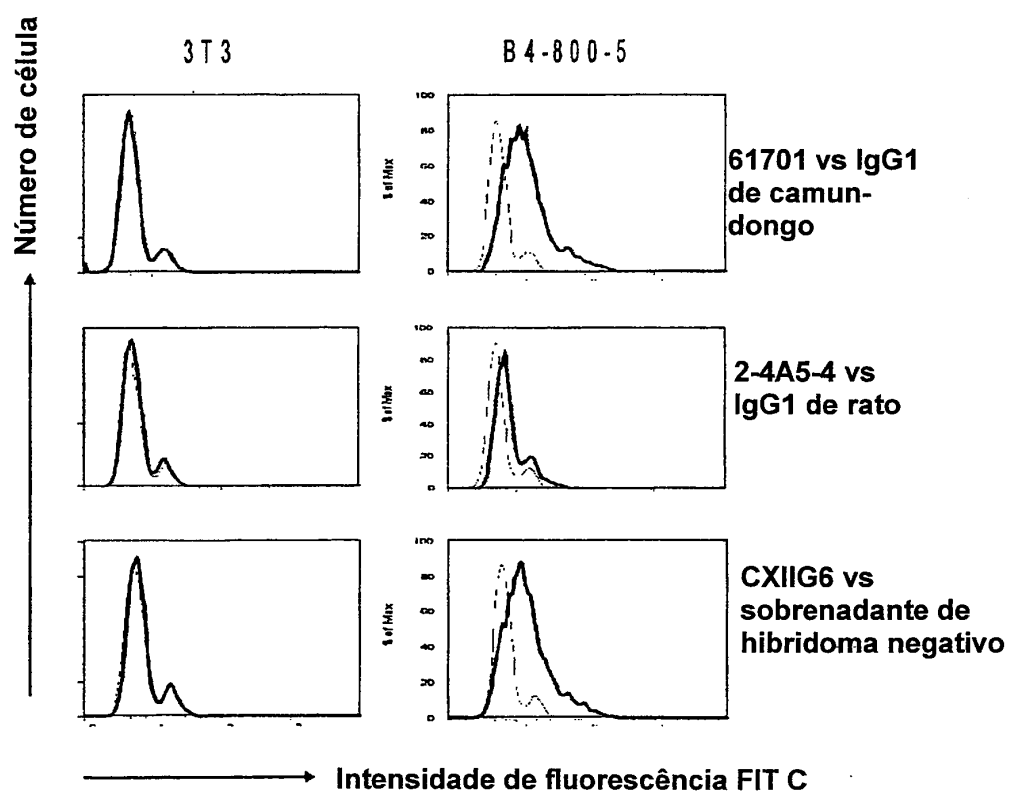


Fig. 1

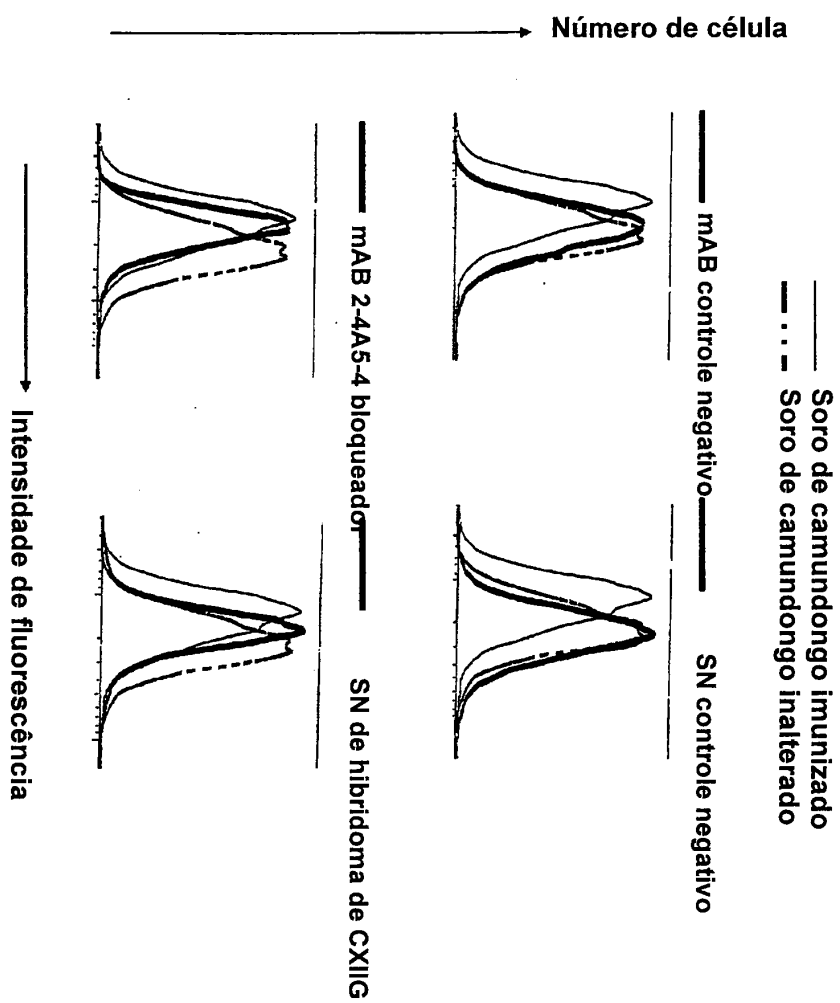


Fig. 2

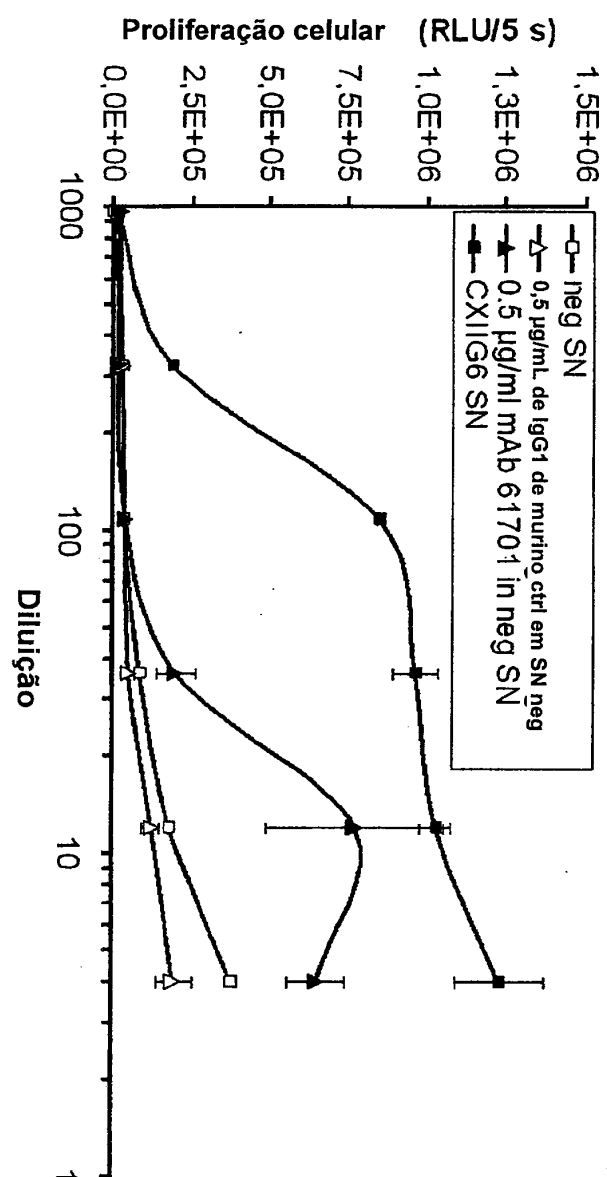


Fig. 3

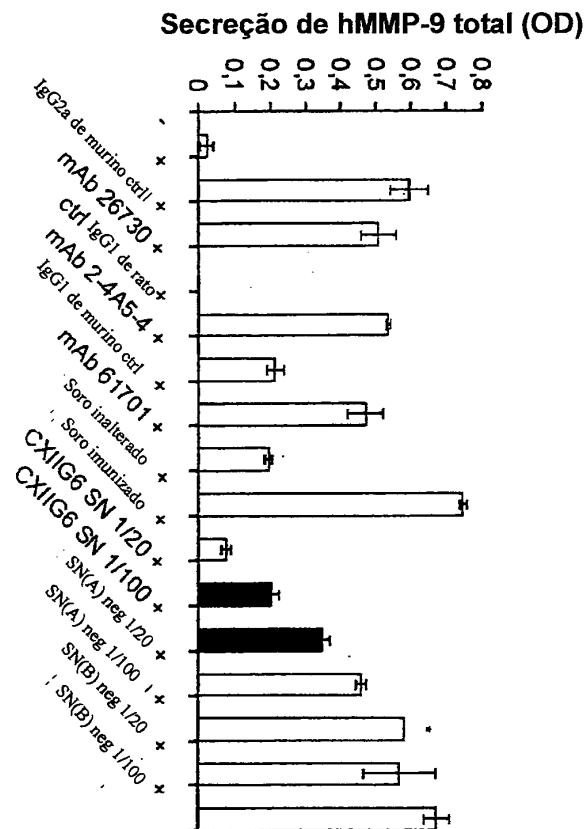


Fig. 4

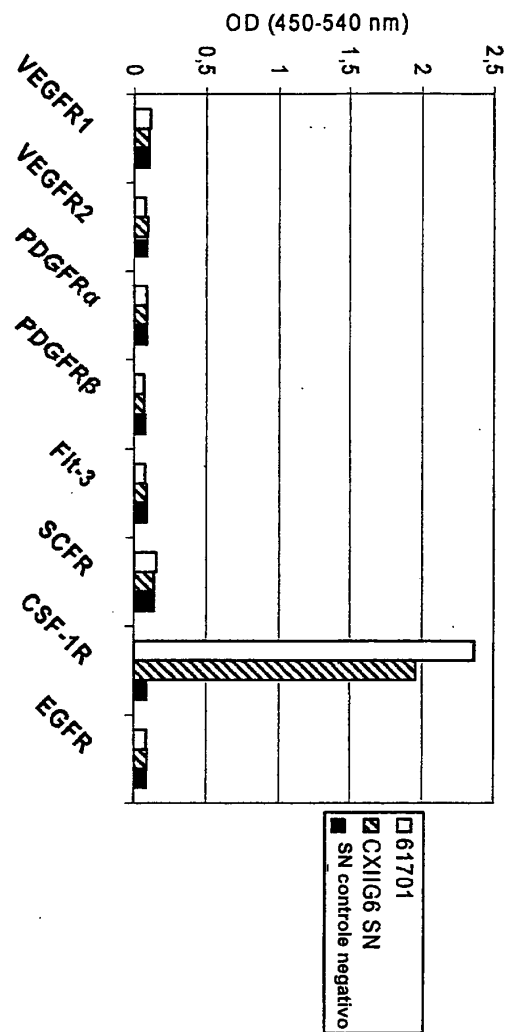


Fig. 5

SfiI
 GGCCCGCCGGCCAGTGACAGACACAGACATAGAACATTACAGATGTACTTGGGACTGA 60
 M Y L G L N
 ACTATGTATTCATAGTTTTCTCCTAAATGGTGTCCAGAGTGAAGTGAAGCTTGAGGAGT 120
 Y V F I V F L L N G V Q S E V K L E E S
 CTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGATCCATGAACTCTCTTGTGCTGCCTCTGGAT 180
 G G G L V Q P G G S M K L S C A A S G F
 TCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGATGGGACTTGAGT 240
 T F S D A W M D W V R Q S P E M G L E W
 GGGTGTCTGAAATTAGAAGCAAAGCTAATAATCATGCAACATTCTATGCTGAGTCTGTGA 300
 V A E I R S K A N N H A T F Y A E S V K
 AAGGGAGGTTCAACATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAAATGAACA 360
 G R F T I S R D D S K S S V Y L Q M N S
 GCTTAAGACCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTACAGGGTAAAGGTAGGCTTTGACA 420
 L R P E D T G I Y Y C T R V K V G F D N
 ACTGGGGCCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCT 480
 W G Q G T T L T V S S A K T T A P S V Y
 ATCCACTGGCCCTGTGTGTGGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGG 540
 P L A P V C G D T T G S S V T L G C L V
 TCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGTG 600
 K G Y F P E P V T L T W N S G S L S S G
 GTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGACGTCTGACCTCTACACCTCAGCAGCTCAGTGA 660
 V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T

XhoI
 CTGTAACTCTGAGCACCTGGCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCACCCGGCAA 720
 V T S S T W P S Q S I T C N V A H P A S
 GCAGCACCAAGGTGGACAAGAAATGAGCCAGAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCCTC 780
 S T K V D K K I E P R G P T I K P C P P
 CATGCAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAA 840
 C K C P A P N L L G G P S V F I F P P K
 AGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATG 900
 I K D V L M I S L S P I V T C V V V D V
 TGACGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACA 960
 S E D D P D V Q I S W F V N N V E V H T
 CAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCACTGCCC 1020
 A Q T Q T H R E D Y N S T L R V V S A L
 TCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACA 1080
 P I Q H Q D W M S G K E F K C K V N N K
 AAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTC 1140
 D L P A P I E R T I S K P K G S V R A P
 CACAGGTATATGTCTTGCCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGA 1200
 Q V Y V L P P P E E E M T K K Q V T L T
 CCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGA 1260
 C M V T D F M P E D I Y V E W T N N G K
 AAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAAGTCTTGACTCTGATGGTTCTTACTTCA 1320
 T E L N Y K N T E P V L D S D G S Y F M
 TGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAAGAAATAGCTACTCCTGTT 1380
 Y S K L R V E K K N W V E R N S Y S C S
 CAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGG 1440
 V V H E G L H N H H T T K S F S R T P G

NotI
 GTAAATGAGCTCAGCACCCACAAAACCTCTCAGGTCCAAAGAGACACCCACGCGGCCGC 1498
 K *

Fig. 6

SfiI
GGCCCAGCCGGCCGGAGTCAGCCTCACACTGATCACACACAGACATGAGTGTGCCCACTC 60
M S V P T Q
AGGTCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGACATCCAGATGACTC 120
V L G L L L L W L T D A R C D I Q M T Q
AGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAA 180
S P A S L S V S V G E T V T I T C R A S
GTGAGAATATTTACAGTAATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGC 240
E N I Y S N L A W Y Q Q K Q G K S P Q L
TCCTGGTCCATGCTGCAACAACTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTG 300
L V H A A T N L A D G V P S R F S G S G
GATCAGGCACACAGTATTCCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGGAGTT 360
S G T Q Y S L K I N S L Q S E D F G S Y
ATTACTGTCAACATTTTGGGGTACTCCTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGTTGGAAA 420
Y C Q H F W G T P R T F G G G T K L E I
TCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAA 480
K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L T
CATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATG 540
S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V
TCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATC 600
K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D Q
AGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGT 660
D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E Y
ATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTG 720
E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V
TCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGAGACAAAGGTCCTGAGACGCCACCACCAGCT 788
K S F N R N E C *

NotI
GCGGCCGC 788

Fig. 7

pTG17753

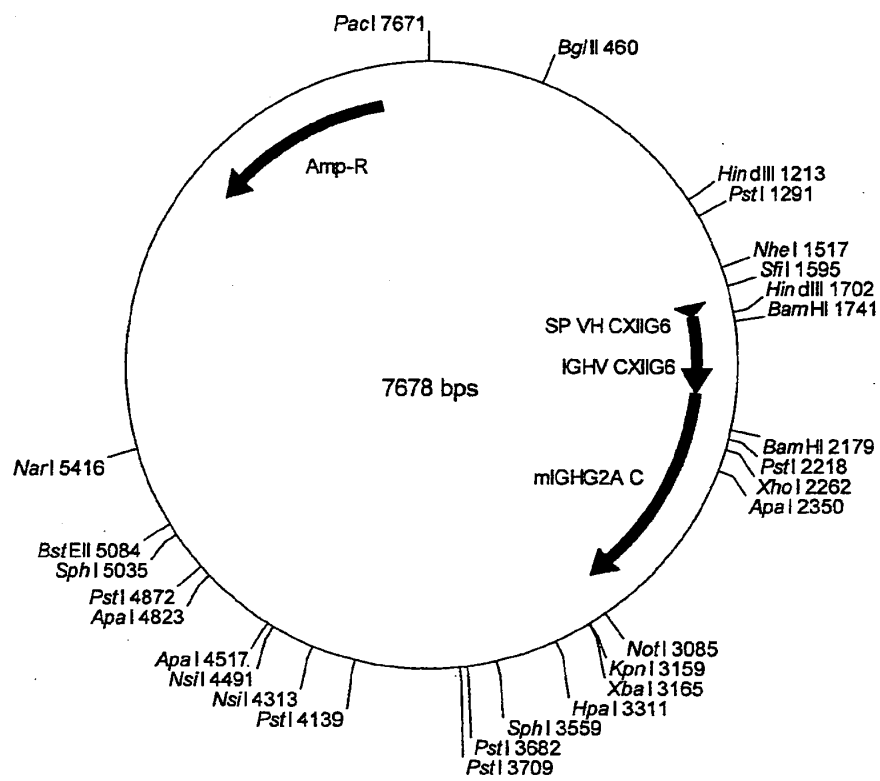


Fig. 8

pTG17727

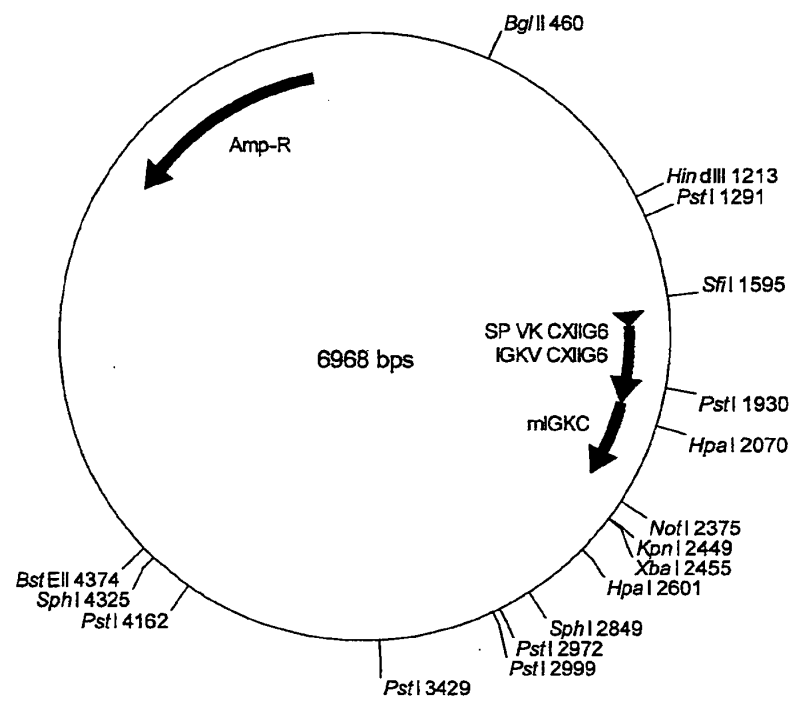


Fig. 9

pOptiVEC™

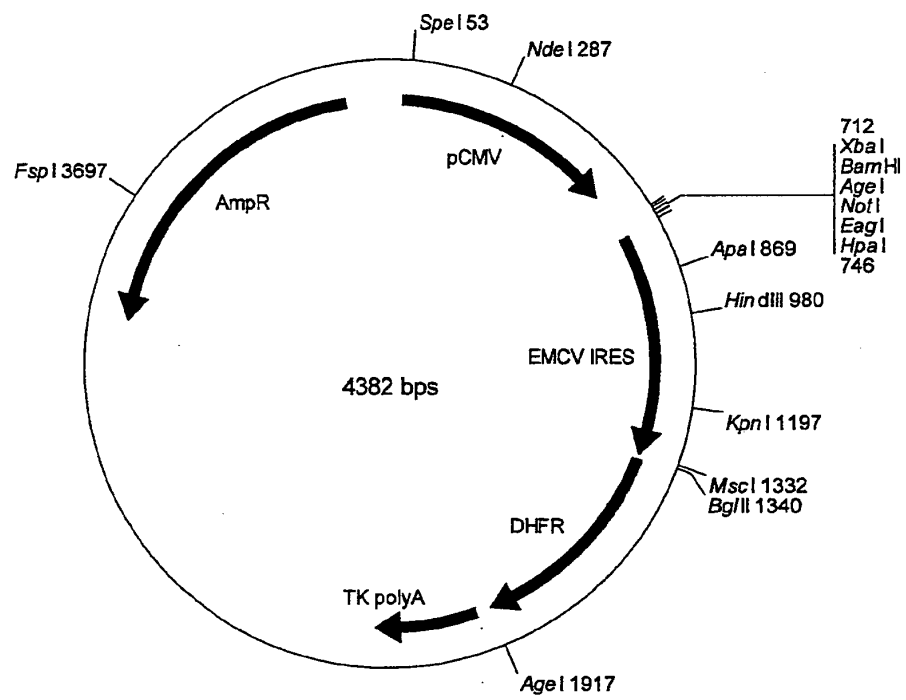


Fig. 10

pTG17895

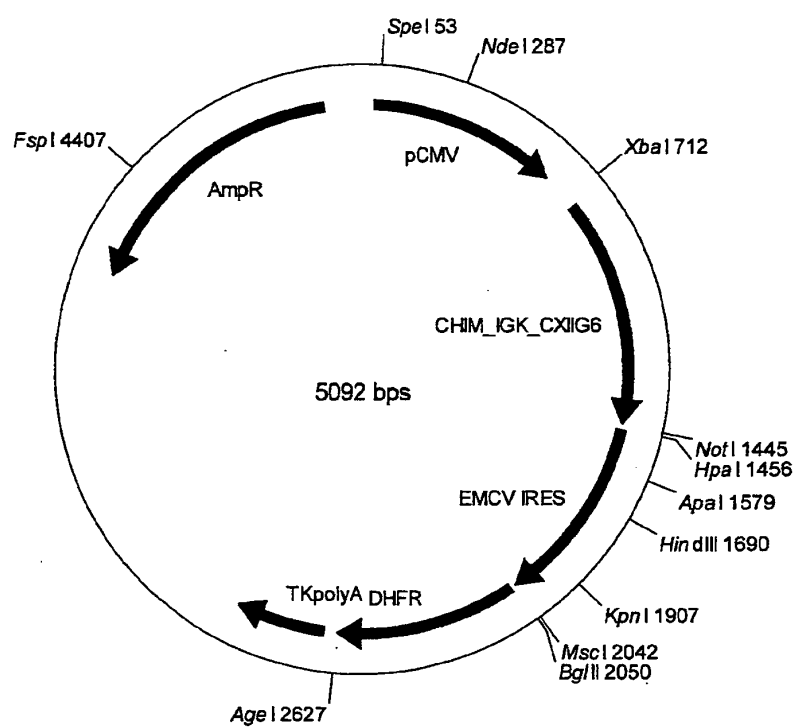


Fig. 11

pTG17812

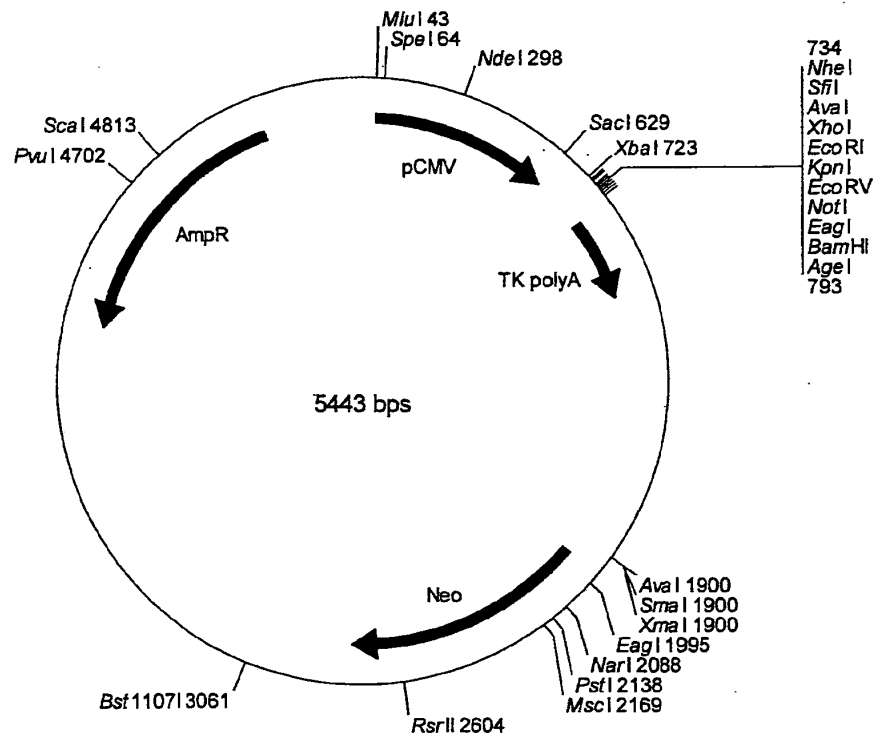


Fig. 12

pTG17868

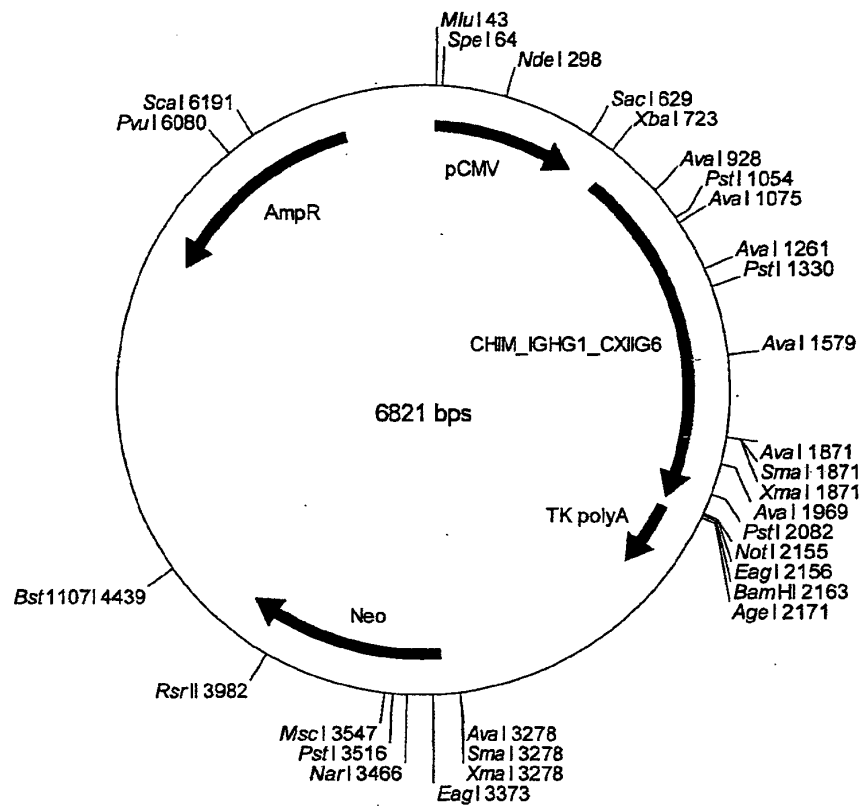


Fig. 13

pTG17869

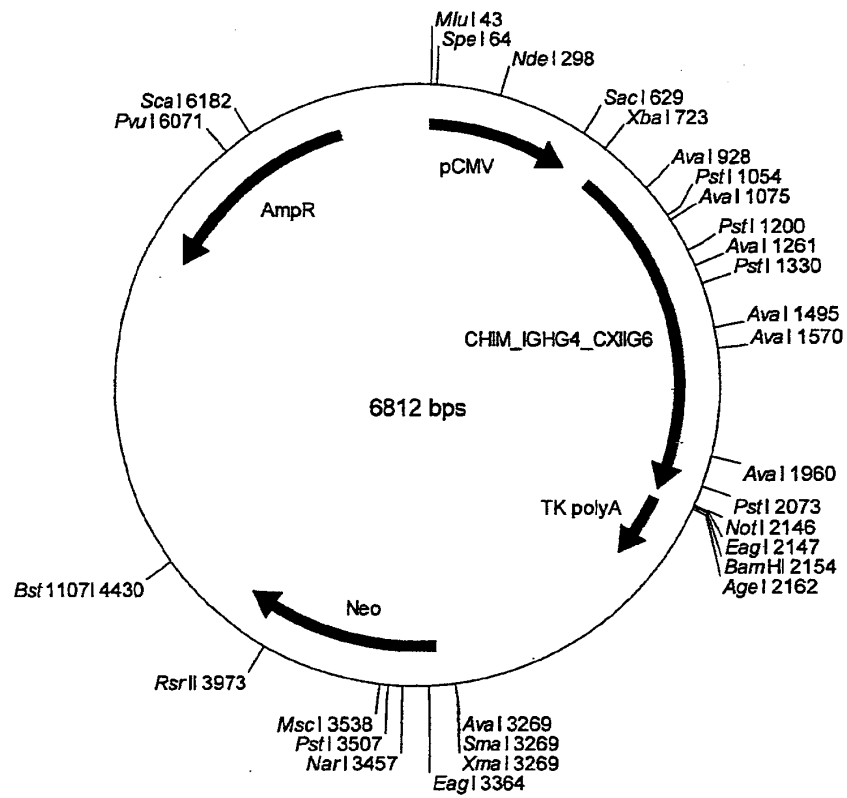


Fig. 14

		Aminoácidos substituídos em CXIIIG VL																			
K1	PTGI7896	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K	V48L	H49Y	N53R	A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q
K2	PTGI7897	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L	H49Y	N53R	A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S		G84A	S85T	G100Q
K3	PTGI7899	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L		N53R	A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S		G84A	S85T	G100Q
K4	PTGI7900	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K		H49Y	N53R	A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S			S85T	G100Q
K5	PTGI7901	A9S		E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K				A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P		S85T	G100Q
K6	PTGI7902	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K				A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S			S85T	G100Q
K7	PTGI7903	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K					D56S	Q70D			N76S				G100Q
K8	PTGI7904			E17D																	
K9	PTGI7905	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L				D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S		G84A	S85T	G100Q
K10	PTGI7906	A9S		E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K					D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P		S85T	G100Q
K11	PTGI7907	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K					D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S			S85T	G100Q
K12	PTGI7947	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40D										K74T	N76S	S80P			G100Q
K13	PTGI7948	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40D	S43A	Q45K	V48L				D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q
K14	PTGI7949	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P										K74T	N76S	S80P			G100Q
K15	PTGI7950	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K	V48L				D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q

* Aminoácidos em negrito apresentam uma acessibilidade a solvente de cadeia lateral relativa acima de 50 %, sublinhada abaixo de 25 %.

Fig. 15

		Aminoácidos substituídos em CXIG VH																		
H1	PTG17870	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S72N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V	T113L	L114V
H2	PTG17871	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S72N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V	T113L	L114V
H3	PTG17872	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S72N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V	T113L	L114V
H4	PTG17873	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S72N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V
H5	PTG17874	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S72N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V
H6	PTG17875	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S72N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V
H7	PTG17883	K3Q	ESV		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S72N		R89K			I95V	T113L	L114V
H8	PTG17884	K3Q	ESV		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S72N		R89K			I95V	T113L	L114V
H9	PTG17885	K3Q	ESV		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S72N		R89K			I95V	T113L	L114V
H10	PTG17886	K3Q	ESV		K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				T113L	L114V
H11	PTG17887	K3Q	ESV		K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				T113L	L114V
H12	PTG17888	K3Q	ESV		K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				T113L	L114V
H13	PTG17889				K19R										R89K				T113L	L114V
H14	PTG17890				K19R										R89K				T113L	L114V
H15	PTG17891				K19R										R89K				T113L	L114V
H16	PTG17892	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S72N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V
H17	PTG17893	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S72N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V
H18	PTG17894	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S72N	V81L	R89K		G94A	I95V		L114V
H19	PTG17943	K3Q	ESV	M18L												P90A				
H20	PTG17944	K3Q	ESV	M18L	K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				T113L	L114V
H21	PTG17945	K3Q	ESV	M18L	K19R		E42G	M43K				E64A			R89K	P90A			T113L	L114V
H22	PTG17946	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K				E64A			R89K	P90A		I95V	T113L	L114V
H23	PTG17968	K3Q	ESV	M18L	K19R		E42G	M43K							R89K				T113L	L114V
H24	PTG17969	K3Q	ESV	M18L	K19R		E42G	M43K							R89K	P90A			T113L	L114V
H25	PTG17970	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K							R89K	P90A		I95V	T113L	L114V
H26	PTG17985	K3Q	ESV	M18L	K19R		E42G	M43K							R89K	P90T			T113L	L114V
H27	PTG17986	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K							R89K	P90T		I95V	T113L	L114V

* Aminoácidos em negrito apresentam uma acessibilidade a solvente de cadeia lateral relativa acima de 50 %, sublinhada abaixo de 25 %.

Fig. 16

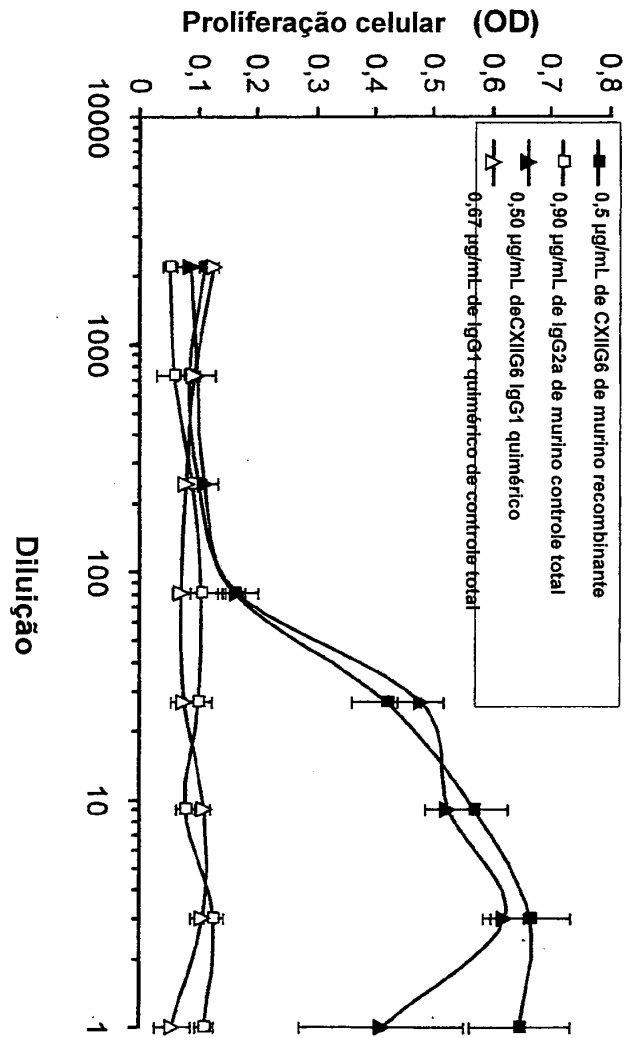


Fig. 17

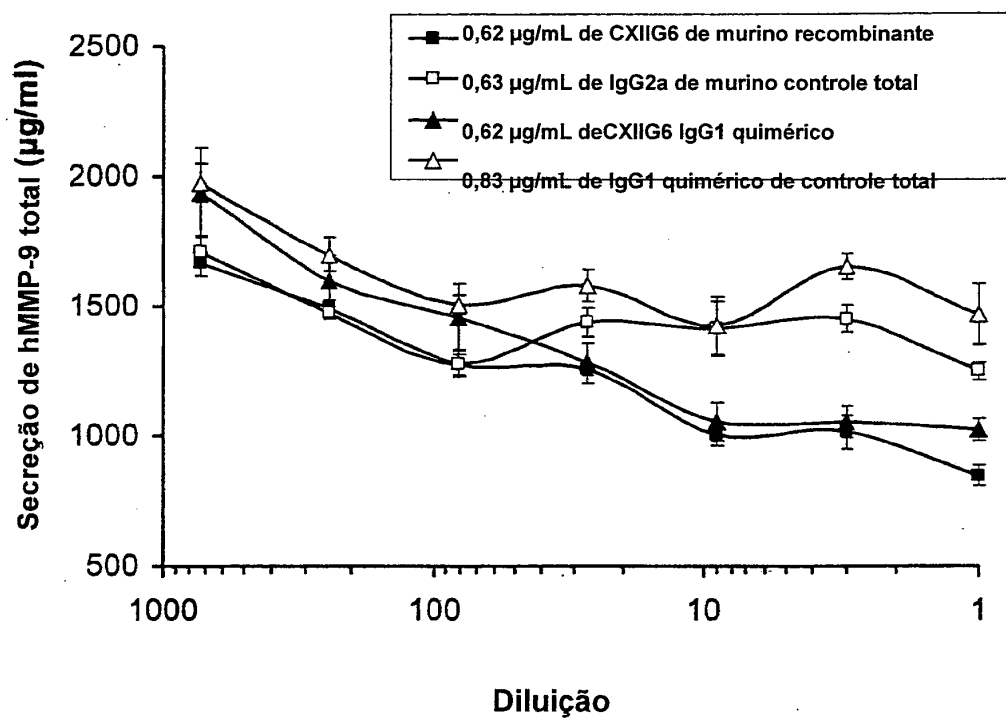


Fig. 18